



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

**FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE *Sporothrix* spp. POR q-PCR *IN HOUSE*
EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM DERMATOLOGIA NO AMAZONAS**

GUILHERME CALDAS DE SOUZA

MANAUS

2026

GUILHERME CALDAS DE SOUZA

**FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE *Sporothrix* spp. POR q-PCR
IN HOUSE EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM DERMATOLOGIA NO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicada à Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, como pré-requisito para obtenção de grau de Mestre.

Orientador: **Prof. Dr. André Luiz Leturiondo**

MANAUS

2026

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.

S719f	Souza, Guilherme Caldas de FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>Sporothrix</i> spp. POR q-PCR IN HOUSE EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM DERMATOLOGIA NO AMAZONAS / Guilherme Caldas de Souza. Manaus : [s.n], 2026. 62 f.: color.; 21.0 cm. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia-PPGDE- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2026. Orientador: André Luiz Leturiondo. 1. <i>Sporothrix</i> spp. 2. Esporotricose. 3. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 4. Calmodulina. I. André Luiz Leturiondo (Orient.) II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Título CDU(1997)616.5(043.3)
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO**FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE *Sporothrix* spp. POR q-PCR
IN HOUSE EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM DERMATOLOGIA NO
AMAZONAS****Guilherme Caldas de Souza**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências aplicadas a Dermatologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Alfredo da Matta.

Aprovada em: 11/ 05 / 2026

BANCA JULGADORA:

Dr. André Luiz Leturiondo
Presidente

Dra. Débora Raysa Teixeira de Sousa
Membro

Dra. Valderiza Lourenço Pedrosa
Membro

DEDICATÓRIA

A Deus pela sabedoria, discernimento e por ter segurado minha mão em todos os momentos, pois sem ele nada é possível.

Aos meus pais, Ray Caldas e Davi Manuares, por serem minha base, motivação e sustentação em toda minha trajetória. Pelo incentivo constante, apoio e amor incondicional. Foram os grandes responsáveis pela formação da minha base pessoal e profissional, sendo, para mim exemplos de dedicação, força, integridade e fé. Aos meus irmãos pelo carinho e parceria de sempre.

À minha tia Nisdete Caldas (*in memorian*), por ter sido amável e por ter cuidado de mim em todos os momentos, além do constante incentivo aos estudos.

Ao meu Padrinho Heber Silva por sempre estar disposto a me ajudar de todas as formas e por ter sido um segundo pai até aqui.

Às minhas primas Sinara Caldas e Thays Caldas, por todo o acolhimento, pelos abraços, pelas palavras de conforto, pelas risadas, por terem sido minha família e, principalmente, pelo apoio de sempre.

Ao Igor Tourinho, por sempre me motivar e me incentivar a escrever esta dissertação, por manter pensamentos positivos mesmo quando me faltavam, e pelo apoio e carinho, que foram essenciais ao longo dessa trajetória.

E por fim, a toda minha família paterna e materna que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. André Luiz Leturiondo, pela confiança, pelo incentivo para o meu crescimento pessoal e profissional, bem como por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos, desde a Iniciação Científica até a finalização do mestrado. Por ser uma inspiração profissional constante na minha vida.

À MSc. Camila Gurgel, pelos abraços, ensinamentos, risadas, confiança e incentivo ao meu crescimento profissional, bem como pela empatia com o próximo e por estar sempre disposta a me ajudar.

À Dra. Cynthia Ferreira pela confiança, incentivo e pelos conselhos que levarei por toda a minha vida.

Ao Dr. Felipe Jules e à Dra. Susan Doria, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e auxiliar na escrita desta dissertação, bem como pelo incentivo à pesquisa.

Às minhas amigas (os) da pesquisa, MSc. Michelle Andrade, MSc. Jaqueline Bentes, MSc. Krys Layane, MSc. Izabele Guimarães, MSc. Elora Menezes, MSc. Thamires Bastos, MSc. Patricia Tavares, MSc. José Thiago Lima e MSc. Diogo Matos dos Santos pelos momentos de risadas do dia a dia e por tornarem tudo mais leve. Gratidão por todo conhecimento compartilhado com vocês,

À Dra. Graça Barbosa e à Dra. Carolina Talhari, pelos ensinamentos em pesquisa e na vida acadêmica.

Ao Jamile Izan (DCDE-FUHAM) pelo apoio com os dados, e ao Júlio Cesar (Bibliotecário-FUHAM), por ter me auxiliado com os artigos científicos sempre que necessário.

Ao laboratório de Micologia da FUHAM, em nome da farmacêutica-bioquímica Débora Fernandes e sua equipe de técnicos, Adriano, Jorge e Eleade pelo apoio prestado com as culturas.

Meus sinceros agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEM), pelo incentivo à pesquisa e pela bolsa concedida; a Universidade do Estado do Amazonas (UEA); e à Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM), instituições fundamentais para a conclusão deste estudo.

E, por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste estudo, e aos meus colegas de turma do PPGCAD o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Viver é aceitar que a vida não se faz de linhas retas, mas de processos que nos quebram, nos refazem e, ainda assim, nos presenteiam com a dádiva de continuar.”

Antônio Ricardo (2026)

RESUMO

Introdução: A esporotricose é uma micose subcutânea, crônica, tendo mais de um século a *Sporothrix schenckii* descrita como a única espécie causadora da doença. No entanto, estudos moleculares identificaram aproximadamente 53 espécies do fungo, tais como a *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix globosa*, que formam um clado de interesse clínico. Essas espécies possuem patogenicidades e resposta ao tratamento distintas. No Amazonas ainda se conhece pouco sobre a distribuição do fungo, mas estudos recentes mostraram que apenas a *S. brasiliensis* circula na região. **Objetivo:** O principal objetivo do estudo é identificar quais espécies de *Sporothrix* spp. estão causando esporotricose em pacientes com suspeita da doença, informação importante para entender a epidemiologia da doença. **Metodologia:** Os voluntários foram atendidos na FUHAM (Fundação Hospitalar de Dermatologia Tropical Alfredo da Matta) e a identificação molecular realizado no Laboratório de Biologia Molecular, utilizando q-PCR, com primers e sondas específicas para a identificação de *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*. **Resultados:** Foram diagnosticados clínico-epidemiológico e/ou laboratorial 168 pacientes com esporotricose, com a idade média de 44,4 anos, predominância de sexo feminino (67,3%) e apresentando lesões em sua maioria na forma linfocutânea (70,2%). Na classificação da provável via de transmissão, 41,1% relataram contato direto não traumático com gatos, enquanto 21,4% apresentaram histórico de contato direto traumático. O tempo médio entre o aparecimento da lesão e a coleta foi de 33,3 dias, e na maioria dos pacientes (69%) apresentaram lesão única ulcerada. A única espécie identificada, em amostra de exsudato ou cultura, foi a *S. brasiliensis* (84%). **Conclusão:** A identificação molecular revelou predominância de *Sporothrix brasiliensis* entre os casos analisados, reforçando o papel dessa espécie como principal agente etiológico no município, e destacando sua relevância no cenário epidemiológico atual. A identificação correta da espécie envolvida, particularmente de *S. brasiliensis*, é de importância estratégica, visto que está diretamente associada à maior virulência, transmissibilidade e gravidade clínica.

Palavras-Chaves: *Sporothrix* spp., Esporotricose, Técnicas de Diagnóstico Molecular, Calmodulina

ABSTRACT

Introduction: Sporotrichosis is a chronic subcutaneous mycosis, with *Sporothrix schenckii* described as the sole causative species for over a century. However, molecular studies have identified approximately 53 species of the fungus, such as *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix globosa*, forming a clade of clinical interest. These species have distinct pathogenicities and treatment responses. In the Amazon region, little is known about the fungus's distribution, but recent studies have shown that only *S. brasiliensis* circulates there. **Objective:** The main objective of this study is to identify which *Sporothrix* spp. species are causing sporotrichosis in patients suspected of having the disease, information that is important for understanding the epidemiology of the disease. **Methodology:** Volunteers were treated at FUHAM (Alfredo da Matta Tropical Dermatology Hospital Foundation) and molecular identification was performed at the Molecular Biology Laboratory using q-PCR with primers and probes specific for the identification of *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, and *S. globosa*. **Results:** 168 patients were diagnosed with sporotrichosis clinically-epidemiologically and/or in the laboratory, with a mean age of 44.4 years, predominantly female (67.3%), and mostly presenting lesions in the lymphocutaneous form (70.2%). In the classification of the probable transmission route, 41.1% reported non-traumatic direct contact with cats, while 21.4% presented a history of traumatic direct contact. The mean time between the appearance of the lesion and the collection was 33.3 days, and most patients (69%) presented a single ulcerated lesion. The only species identified, in exudate or culture samples, was *S. brasiliensis* (84%). **Conclusion:** Molecular identification revealed a predominance of *Sporothrix brasiliensis* among the cases analyzed, reinforcing the role of this species as the main etiological agent in the municipality, and highlighting its relevance in the current epidemiological scenario. Correct identification of the species involved, particularly *S. brasiliensis*, is of strategic importance, since it is directly associated with greater virulence, transmissibility, and clinical severity.

Keywords: *Sporothrix* spp., human sporotrichosis, molecular diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microscopia da forma filamentosa do <i>Sporothrix</i> spp.	03
Figura 2 – Microscopia da forma leveduriforme do <i>Sporothrix</i> spp.....	03
Figura 3 – Formas de transmissão da esporotricose	03
Figura 4 – Forma Linfocutânea da esporotricose	11
Figura 5 – Forma Cutânea Fixa da esporotricose	12
Figura 6 – Forma Sistêmica da esporotricose	12
Figura 7 – Cultura - Forma Filamentosa do <i>Sporothrix</i> spp.	14
Figura 8 – Cultura – Forma Leveduriforme do <i>Sporothrix</i> spp.....	14
Figura 9 – Achados histopatológicos da esporotricose.....	16
Figura 10 – Fluxograma da coleta do material biológico	20
Figura 11 – Diluições realizadas na curva padrão	26
Figura 12 – Curva Padrão do teste de qPCR	26
Figura 13 – Gráfico de limite de detecção do teste de qPCR	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers e sondas utilizadas na reação de qPCR.....	22
Tabela 2 – Interpretação para os valores de kappa.....	23
Tabela 3 – Características clínico-epidemiológicas dos pacientes.....	24
Tabela 4 – Performance do teste molecular e do padrão-ouro.....	28
Tabela 5 – Concordância entre a cultura e qPCR	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADE DE MEDIDA

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µg	Micrograma
fg	Fentograma
ng	Nanograma
pb	Pares de base
%	Porcentagem
R ²	Coeficiente de Determinação
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATL	Tissue lysis
CAL	Calmodulina
CF	Cutânea Fixa
CHS1	Quitina Sintase I
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FUHAM	Fundação Hospitalar Alfredo da Matta
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ITS	Espaçador Transcrito Interno
IC	Intervalo de Confiança
LF	Linfocutânea
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Min	Minuto
qPCR	PCR em Tempo Real (<i>Real-Time PCR</i>)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por Minuto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VPP	Verdadeiro Positivo
VPN	Verdadeiro Positivo Negativo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Agente etiológico	1
1.2 Epidemiologia	4
1.3 Formas Clínicas	9
1.4 Diagnóstico.....	11
1.4.1 Cultura.....	11
1.4.2 Histopatologia.....	12
1.4.3 Teste Molecular	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3.OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Descrição do Estudo	18
4.2 Aspectos Éticos.....	18
4.3 Obtenção da Amostra	18
4.4 Critérios de Inclusão.....	19
4.5 Critérios de Exclusão.....	19
4.6 Procedimentos	20
4.6.1 Extração de DNA.....	20
4.6.2 Limite de detecção da qPCR.....	20
4.6.3 Curva Padrão	20
4.6.4 Identificação de espécie por q-PCR	21
4.6.5 Análise de dados	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Curva Padrão	25
5.2 Limite de detecção da qPCR.....	26
5.3 Desempenho no diagnóstico da qPCR e cultura para esporotricose	27
5.4 Identificação das espécies por qPCR <i>in house</i>	29
6. DISCUSSÃO.....	30
7. PRODUTO....	39
8. CONCLUSÃO.....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
10.ANEXOS.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agente etiológico

A esporotricose é uma infecção subcutânea causada por um fungo do gênero *Sporothrix* spp., que afeta o humano e animais, principalmente gatos e cães. Este fungo está presente nos materiais em decomposição, solo e plantas. Trata-se de um micro-organismo termodimórfico apresentando-se tanto na forma filamentosa (Figura 1), normalmente saprófito na natureza ou 25°C *in vitro*, e na forma de levedura (Figura 2) no hospedeiro ou em 35°C a 37°C *in vitro* (1). Acredita-se que a patogenicidade do fungo está relacionada à essa termotolerância, um mecanismo de transição morfológica induzida por variações de temperatura (1).

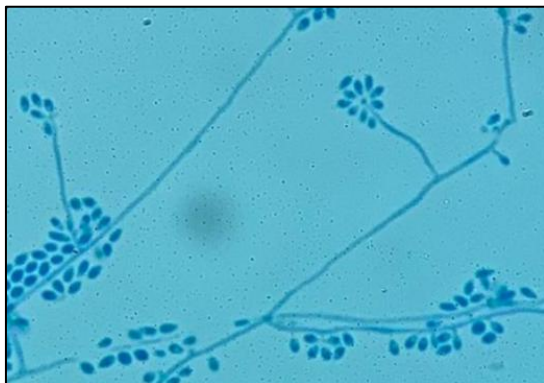


Figura 1: Microscopia da forma filamentosa.
Fonte: Acervo laboratório de Micologia.

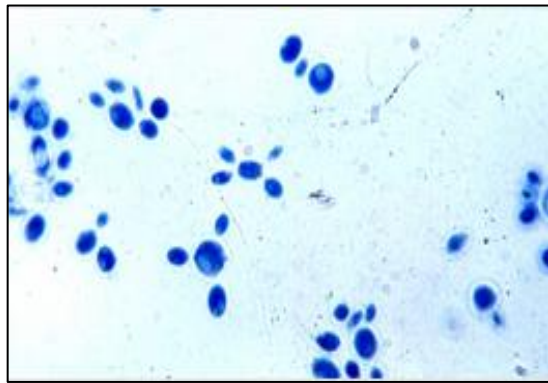


Figura 2: Microscopia da forma leveduriforme.
Fonte: [//institutocador.com.br/micoses-esporotricose/](http://institutocador.com.br/micoses-esporotricose/)

A infecção inicia-se principalmente pela inoculação traumática de material contaminado com conídios na epiderme ou mucosa. A transmissão sapronótica está associada principalmente a atividades de agricultura, trabalhos com manipulação de solo e plantas, como jardinagem e floricultura, que tenha estruturas fúngicas, podendo assim favorecer o contágio. Enquanto na transmissão zoonótica, propágulos do fungo penetram na pele através de

arranhaduras ou mordidas, causados pelo principal animal envolvido, o gato doente (2) (Figura 3).

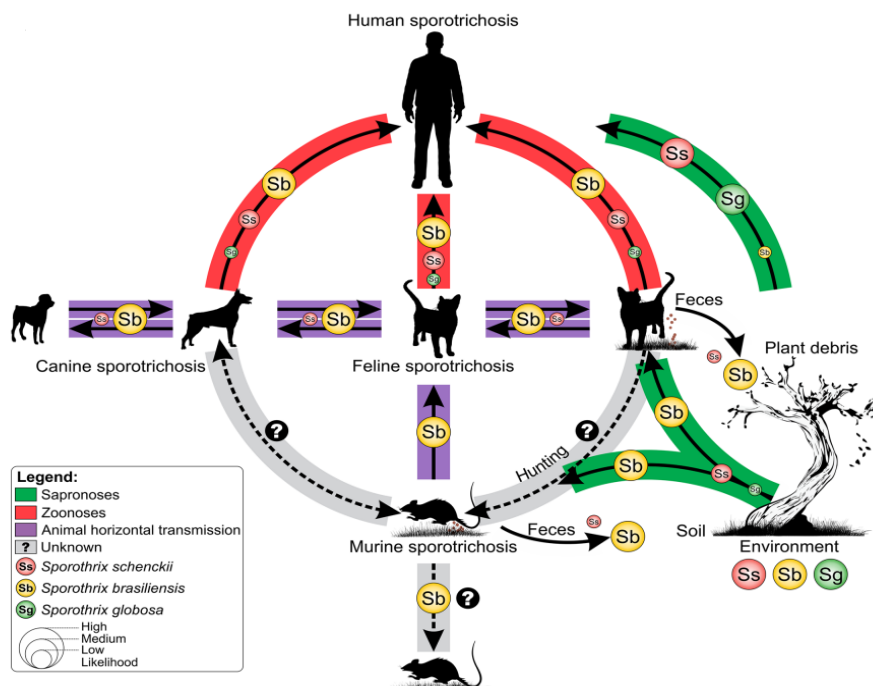


Figura 3: Formas de transmissão da esporotricose. **Fonte:** Rodrigues *et al.* (2016)

Por mais de cem anos a *Sporothrix schenckii*, era a única espécie descrita como causadora da esporotricose em humanos e animais. Análises filogenéticas utilizando sequências dos genes como da calmodulina (CAL) e da região do espaçador transcrito interno (ITS), identificaram novas espécies. O gênero *Sporothrix* compreende aproximadamente 53 espécies, como o clado de interesse clínico composto pelas *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix globosa* (3,4).

A espécie *Sporothrix schenckii* sensu stricto é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. Essa espécie apresenta virulência intermediária e é responsável por manifestações clínicas clássicas, predominantemente na forma linfocutânea. No entanto, apesar de sua importância histórica, atualmente observa-se a redução da sua incidência em determinadas regiões endêmicas, especialmente no Brasil, onde a *S. brasiliensis* têm ganhado relevância epidemiológica (5).

A *Sporothrix globosa*, por sua vez, possui uma distribuição geográfica ampla, com maior prevalência na Ásia. Essa espécie está associada a formas clínicas mais brandas da doença, geralmente restritas à pele, e apresenta menor

virulência em comparação a *S. schenckii* e, principalmente, *S. brasiliensis*. Estudos experimentais demonstraram que *S. globosa* apresenta crescimento mais lento em modelos *in vivo* e menor capacidade de disseminação sistêmica, refletindo na sua patogenicidade (6–8)

A *Sporothrix brasiliensis*, é descrita como a mais virulenta e epidemiologicamente importante no cenário atual, particularmente nas Américas. Originalmente descrita no Brasil, esta espécie é a principal responsável pela constante causa da zoonose observada no Brasil desde a década de 1990 (9,10). A *S. brasiliensis* possui característica morfológica própria, a termotolerância, permitindo uma rápida adaptação para a forma leveduriforme no hospedeiro mamífero. A transição para a forma leveduriforme, que é a forma parasitária invasiva, está diretamente ligada ao processo infeccioso. Além disso, essa espécie produz maiores quantidades de melanina na parede celular, um pigmento que deixa sua coloração mais escura, atuando como um fator de virulência para se proteger de estresses oxidativos gerados por células fagocíticas do hospedeiro, e ajudando na sua resistência a antifúngicos (11).

O avanço de técnicas de sequenciamento genômico tem ajudado a entender melhor as diferenças das bases moleculares que diferenciam as espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* spp. revelando suas informações cruciais sobre seus processos evolutivos, mecanismos de adaptação ao hospedeiro e determinantes da patogenicidade. Teixeira *et al.* (2014), demonstraram que o tamanho do genoma do *S. brasiliensis* apresenta aproximadamente 33,2 Mb, enquanto o da *S. schenckii* compreende cerca de 32,4 Mb, revelando uma identidade genômica sintênica de 97,5% entre ambas as espécies (12).

O genoma mitocondrial de *S. brasiliensis* apresenta 36 Kbp, e uma diferença fundamental entre as duas espécies, é que a *S. brasiliensis* possui endonucleases de homing (HEs), que codificam íntrons parasitários do grupo I. Essa característica genômica, está diretamente associada à expansão do genoma mitocondrial observada nessa espécie, conferindo-lhe sua diferenciação genética, o que pode estar correlacionado à sua maior termotolerância, expressão diferenciada de fatores de virulência e, conseqüentemente, ao seu papel na epidemiologia da esporotricose no Brasil (12)

1.2 Epidemiologia

A esporotricose foi descrita pela primeira vez no final do século XIX, em um contexto histórico marcado pela consolidação da microbiologia e pelo avanço das técnicas de isolamento e cultivo de microrganismos patogênicos. O agente etiológico da doença foi isolado pela primeira vez em 1898 a partir do exsudato purulento de lesão humana. A cultura foi realizada por Benjamin R. Schenck, na Universidade Johns Hopkins, nos Estados Unidos, durante a investigação de um paciente que apresentava lesões cutâneas nodulares com progressão ao longo dos vasos linfáticos, característica clínica típica da forma linfocutânea da doença. Inicialmente, o microrganismo isolado foi classificado como pertencente ao gênero *Sporotrichum*, com base nos conhecimentos taxonômicos disponíveis à época (13).

Dois anos mais tarde, em 1900, Ludvig Hektoen e William Perkins descreveram o segundo caso da esporotricose e, a partir de análises morfológicas mais detalhadas do fungo, concluíram que ele não pertencia ao gênero originalmente proposto. Dessa forma, o agente etiológico foi reclassificado como *Sporothrix schenckii*, em homenagem a Benjamin R. Schenck, reconhecendo sua contribuição pioneira no isolamento e cultivo do fungo responsável pela doença (3).

A esporotricose é uma doença causada, majoritariamente, por três espécies de *Sporothrix* spp., distribuídas pelo mundo. O relato mais conhecido da doença aconteceu na África do Sul em 1940, afetando um grupo de trabalhadores em uma mina de ouro, que foram infectados por propágulos do fungo que cresciam na madeira das minas (14).

Nos Estados Unidos o maior surto ocorreu em 1898, em 15 estados diferentes, afetando 84 pacientes que adquiriram a doença provavelmente quando realizavam atividades ocupacionais, como a agricultura e a jardinagem (15).

A esporotricose é uma micose de importância crescente na China, Zhang *et al* (2015), que por meio de uma meta-análise, descreveram 3299 casos de esporotricose humana no território chinês (16). Estudos posteriores, como o de Song *et al.* (2020), descreveram que a região nordeste concentra a grande maioria dos casos notificados da doença, principalmente nas províncias de Jilin,

Heilongjiang e Liaoning (17). No contexto global, a China ocupa a segunda posição em números absolutos de casos, com 5.679 notificações humanas registradas entre 2018 e 2022, ficando atrás apenas do Brasil, que registrou 7.945 casos no mesmo período (18). A transmissão da doença ocorre predominantemente por via sapronótica, causada principalmente pela *S. globosa*, associada ao manuseio de madeira e solo contaminados, com aumento expressivo de infecção durante o inverno, estação em que há maior demanda por madeira para aquecimento doméstico (19).

A esporotricose no continente africano é classificada como uma micose subcutânea negligenciada e subdiagnosticada, representando um desafio de saúde pública crescente em diversas regiões. A distribuição geográfica da doença é abrangente, com focos hiperendêmicos, com destaque na África do Sul, local do maior surto histórico da doença em mineradores na década de 40, e relatos em Barberton localizado na província de Mpumalanga e em Madagascar (20,21). A doença é subestimada devido à limitada capacidade diagnóstica, à escassez de vigilância epidemiológica e à semelhança clínica com outras dermatoses infecciosas endêmicas da região, como a tuberculose cutânea e leishmaniose tegumentar. A principal forma de transmissão ocorre por inoculação traumática direta do fungo na pele, através de espinhos, farpas e lascas de madeira contaminados, sendo o *S. schenckii* o principal agente etiológico envolvido. Até o momento, a transmissão zoonótica não representa um mecanismo epidemiológico relevante na África (22,23).

A esporotricose na Europa é considerada uma micose subcutânea rara e esporádica, ocorrendo predominantemente sob a forma de casos importados ou episódios isolados associados à exposição ambiental. Diferentemente do que se observa nas regiões endêmicas da América Latina, África e Ásia, o continente europeu não apresenta relatos frequentes da doença, sendo a maioria dos casos relacionada a viagens internacionais, imigração ou atividades ocupacionais (2). Embora os casos em humanos estejam associados a *S. schenckii*, já foram descritos episódios autóctones esporádicos em países como Espanha, Portugal, França, Itália e Reino Unido (18).

Na América Latina é a micose de implantação mais comum, que concentra sua alta notificação na América do Sul, principalmente no Brasil, Colômbia, Peru, Argentina e Venezuela. A epidemiologia do *Sporothrix* spp. nesses países reflete

a distribuição global do clado de espécies clinicamente relevantes para a saúde humana (14).

Estudos que tratam da identificação de espécies em áreas endêmicas da doença, são importantes para correlacionar com os tipos de lesões, virulência e tratamento da doença. Na Colômbia, Muñoz *et al.* (2019), mostraram que a distribuição da doença é observada por todo território colombiano, transmitidos principalmente pela via sapronótica. Esse estudo identificou através de DNA extraído de cultura fúngica as espécies, *S. schenckii* e *S. globosa* (24). Na Venezuela, a esporotricose foi atribuída exclusivamente ao *Sporothrix schenckii*, desde a descrição do primeiro caso no país em 1935. Entretanto, Camacho *et al.* (2015) analisaram isolados de cepa do *Sporothrix* spp. provenientes de diversas regiões venezuelanas e identificaram a circulação de uma segunda espécie. A partir da análise de filogenia molecular e características fenotípicas de aproximadamente 30 isolados, os autores identificaram 30% como *S. globosa* e 70% com *S. schenckii* (25).

No Peru, a doença é relatada desde 1982, sendo causada pela inoculação traumática do fungo a partir de fontes ambientais. Sua incidência é constante, principalmente em Abancay, área pobre na região centro-sul do planalto peruano (26). Estudos regionais realizados em 2024 descreveram que a *S. schenckii* é a principal espécie de fungo associada à doença humana no país, com relatos recentes de transmissão zoonótica, indicando uma mudança na cadeia de transmissão em relação ao que era conhecido no país na década de 80 (27).

A Argentina é um país que enfrenta a doença aproximadamente a mais de três décadas. Etchecopaz *et al.* (2021), relataram que nos últimos anos o país registrou um aumento de casos associados a *S. brasiliensis*, especialmente em regiões próximas às fronteiras com estados brasileiros, onde a transmissão felina é intensa (28). A literatura também relata uma expansão e uma crescente emergência deste fungo no país, corroborando hipóteses que esses acontecimentos estão diretamente relacionados aos surtos que aconteceram no Brasil (20).

O Brasil, concentra sua alta taxa de infecção pela *S. brasiliensis*, transmitida de forma zoonótica, uma característica bem diferente de alguns países vizinhos. Em 1990, o gato doméstico (*Felis catus*) foi introduzido como

hospedeiro altamente infeccioso no ciclo de transmissão (29). Diferente de outros mamíferos, os gatos com esporotricose apresentam uma alta carga fúngica em lesões cutâneas, secreções nasais e unhas, facilitando a transmissão direta para animais e humanos. Esse acontecimento foi o principal fator associado a expansão geográfica e do aumento exponencial de casos observados nas últimas décadas (9).

Historicamente, o Rio de Janeiro foi o primeiro estado brasileiro a relatar casos de esporotricose humana, entre os anos de 1990 e 2000. Nesse período, a cidade foi marcada como epicentro da doença e predominantemente infectada pela *S. brasiliensis* (30). A dimensão do surto ficou evidente entre 1997 e 2007, quando foram diagnosticados e tratados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/Fiocruz) aproximadamente 1.848 casos de esporotricose humana. Destes, 80,3% dos pacientes relataram histórico de contato com gatos domésticos doentes, confirmando que o felino seja o principal animal transmissor da doença (31).

Semelhante ao Rio de Janeiro, a região metropolitana de São Paulo começou a registrar casos esporádicos da doença a partir dos anos 2000. Bittencourt *et al.* (2022), realizaram um estudo analisando dados de prontuários médicos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), referente ao diagnóstico da esporotricose de 2010 a 2018. Nesse período foram diagnosticadas 260 pessoas com a doença, e através de DNA extraído de cultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi identificado somente a *S. brasiliensis* (32)

O estado do Rio Grande do sul possui uma incidência crescente de esporotricose animal e humana desde a década de 90, quando a epidemiologia da doença sofreu mudanças com a introdução do gato como via de transmissão, acompanhando o fenômeno histórico que ocorreu no Rio de Janeiro. Poester *et al.* (2018) analisaram dados do Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande (FAMED-FURG) sobre casos da doença em humanos e animais durante o período de 2010 a 2016. Foram observados 372 casos de esporotricose felina, 34 casos de canina e 83 casos em humanos. Foi o gato doente, em 83% dos casos relatados, o responsável pela transmissão. O estudo não identificou a espécie fúngica envolvida (33), porém Sanchonete *et al.* (2015) confirmaram a emergência de *S. brasiliensis* no Rio Grande do Sul (34).

No Nordeste a disseminação da esporotricose vem ganhando proporções maiores desde 2014, alterando o perfil epidemiológico da doença na região, principalmente nos estados da Paraíba e Pernambuco (35–37). Considerando que a expansão geográfica para o Nordeste do Brasil foi devido à transmissão zoonótica, Silva *et al.* (2022), realizaram um estudo em João Pessoa com 148 pacientes diagnosticados com esporotricose em 2018. A maioria relatou contato com gatos doentes (74,4%), e a única espécie encontrada foi o *S. brasiliensis* (38). No ano de 2021, o governo de Pernambuco publicou um informe epidemiológico sobre o avanço da doença no estado, entre o ano de 2016 e maio de 2021, foram diagnosticados 150 casos da doença (39). Além de Pernambuco e Paraíba, outros estados do Nordeste brasileiro como Rio grande do Norte, Alagoas e Bahia a partir de 2016, passaram a relatar casos da esporotricose humana, onde sua incidência geralmente se caracteriza por uma elevação inicial nas ocorrências envolvendo felinos, seguida por um aumento no número de quadros clínicos em humanos (40).

No norte do Brasil, em particular em Manaus - AM, o primeiro relato foi no final de 2019. A partir desse ano, as notificações da doença aumentaram de forma exponencial e alarmante. De 2020 a agosto de 2023, foram confirmados 679 casos desta micose em humanos (41).

Dados parciais do presente estudo avaliaram 150 casos de esporotricose. A única espécie encontrada nas amostras viáveis foi a *S. brasiliensis* (89,3%), e em 83,3% dos pacientes relataram contato com gatos (42). Dados mais recentes da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS-RCP) informaram que, entre 1º de janeiro e 30 de dezembro de 2025, foram notificados 2.534 casos de esporotricose humana no Amazonas, dos quais 1.996 foram confirmados e 223 seguem em investigação. Os casos confirmados correspondem a pessoas residentes em Manaus (1.862), Presidente Figueiredo (39), Barcelos (31), Iranduba (18), Manacapuru (11), Rio Preto da Eva (11), Maués (9) e Itacoatiara (4) (43).

Todos os estados brasileiros relataram casos de esporotricose humana, exceto Roraima, demonstrando que a emergência desta micose não é restrita ao Sudeste e Sul do país, onde foi relatado os primeiros casos da doença. Essa disseminação é devida a vários fatores como, principalmente, a migração de gatos domésticos infectados junto com os movimentos populacionais, as

condições socioambientais desfavoráveis das grandes áreas urbanas e o descaso do poder público em políticas mais efetivas.

1.3 Formas Clínicas

As lesões dos pacientes apresentam características diferenciadas, decorrentes da interação entre o sistema imune do hospedeiro e o fungo. Fatores como virulência, profundidade do inóculo e o estado imunológico do hospedeiro, são cruciais para determinar o comportamento da doença no humano (44).

A forma linfocutânea (LF) (Figura 4) é uma das apresentações clínicas mais comuns, geralmente aparecendo com duas semanas após o início da infecção. Apresenta-se inicialmente de forma indolor como uma pápula ou pústula eritematosa localizada, que pode ulcerar. Pode ocorrer o aparecimento de uma linfangite nodular ascendente ou descendente, que são pequenos nódulos que percorrem o sistema linfático e que podem levar ao processo de supuração (45).



Figura 4: Forma Linfocutânea. **Fonte:** Acervo laboratório de biologia molecular (BIOMOL).

A cutânea fixa (CF) (Figura 5) é a segunda forma mais comum, afetando apenas uma região do corpo sem acometimento de vasos linfáticos ou órgãos. A lesão inicial é fixa, permanecendo no local da inoculação, e pode evoluir para úlcera. Algumas vezes, pode acontecer a formação de pequenas lesões satélites em torno da lesão inicial. Os indivíduos que apresentam apenas essa forma possuem uma resposta imunológica mais eficiente em relação aos outros pacientes. Em alguns casos é comum que essas lesões sejam semelhantes a leishmaniose tegumentar americana, tuberculose cutânea e micobacteriose atípica, fazendo com que o médico tenha dificuldade para realizar o diagnóstico (45).



Figura 5: Forma Cutânea fixa (CF). **Fonte:** Acervo laboratório de biologia molecular (BIOMOL).

A forma sistêmica (Figura 6) da esporotricose é rara, atinge órgãos e pode ter o aparecimento de lesão cutânea ou não. É provável que a infecção inicial aconteça pela inalação de propágulos do fungo através da respiração pulmonar. Afeta principalmente pacientes imunossuprimidos, indivíduos com HIV/AIDS, indivíduos desnutridos e outras doenças que enfraqueça o sistema imunológico intensificando ainda mais a doença (45).



Figura 6: Forma Sistêmica. **Fonte:** Associação Brasileira de Dermatologia (2022).

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Cultura

O isolamento do fungo é realizado em meios apropriados como o ágar mycosel e ágar sabouraud dextrose. Esse meio ajuda a confirmar a presença de *Sporothrix* spp. com alta precisão, pois a aparência das colônias e as características microscópicas são bem conhecidas e relatadas na literatura.

A forma filamentosa (Figura 7), cresce em uma temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ onde macroscopicamente, os filamentos são visíveis, com colônias úmidas e superfície enrugada, inicialmente parecem brancas, mas que se tornam marrom escuras. A forma leveduriforme (Figura 8), cresce melhor em temperaturas mais elevadas ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), macroscopicamente parecem lisas, brancas cremosas e são compostas de células alongadas em forma de charuto (46).

A literatura clássica indica que a cultura é o método padrão para confirmar o diagnóstico da esporotricose, sendo bastante utilizada em laboratórios especializados por sua confiabilidade para identificar o gênero e por permitir o armazenamento para testes de identificação de espécie mais detalhados no futuro (10).

Embora o exame seja considerado de baixo custo, não possui uma sensibilidade de 100%. Isso se deve principalmente ao tipo de amostra clínica, quantidade do material semeado, contaminação, carga fúngica e tratamento prévio do paciente com qualquer medicamento. O crescimento do fungo pode demorar alguns dias (3 a 8) atrasando o diagnóstico clínico (47).



Figura 7: Cultura, forma filamentosa do *Sporothrix* spp. **Fonte:** Acervo laboratório de micologia.



Figura 8: Cultura, forma leveduriforme do *Sporothrix* spp. **Fonte:** Euzênio Pereira (PPGCAD).

1.4.2 Histopatologia

O exame histopatológico (Figura 9) baseia-se na identificação de alterações inflamatórias características associadas à presença de elementos fúngicos compatíveis com espécies do gênero *Sporothrix*. Nos tecidos humanos, o fungo apresenta-se na forma leveduriforme, com células arredondadas, ovais ou alongadas, frequentemente descritas como leveduras em forma de “charuto”, medindo aproximadamente 2–6 μm e exibindo brotamento de base estreita. Esses elementos podem ser observados tanto no meio extracelular quanto no interior de macrófagos e células gigantes multinucleadas do tipo Langhans (48,49).

O teste possui baixa sensibilidade e especificidade, e do ponto de vista histopatológico, as lesões cutâneas apresentam geralmente um padrão inflamatório granulomatoso supurativo, caracterizado por infiltrado misto de neutrófilos, histiócitos, linfócitos e plasmócitos, frequentemente associado à formação de microabscessos e áreas de necrose. Esse padrão inflamatório é considerado típico das micoses subcutâneas e reflete a resposta imune do hospedeiro à infecção fúngica (50).

Um achado descrito na esporotricose é a presença de corpos asteroides, estruturas constituídas por uma célula leveduriforme central circundada por material eosinofílico radiado, correspondente ao fenômeno de Splendore-Hoeppli. Essas estruturas são geralmente encontradas em áreas de abscesso e representam a deposição de complexos antígeno-anticorpo e detritos celulares ao redor do fungo. Embora considerados sugestivos da doença, os corpos asteroides não são totalmente patognomônicos, podendo também ocorrer em outras infecções ou processos inflamatórios granulomatosos (51).

Um estudo retrospectivo conduzido por Li *et al.* (2025) analisaram 69 casos de esporotricose cutânea causada por *Sporothrix globosa*. Inicialmente, a coloração PAS (Ácido Periódico de Schiff) foi aplicada em 29 amostras de biópsia, nas quais foi possível observar elementos leveduriformes em apenas 13,8% (4/29) das lâminas. No entanto, após a reavaliação microscópica das lâminas previamente analisadas, associada à realização de novos cortes histológicos e à aplicação de coloração PAS padronizada nas demais amostras, incluindo outras 40 biópsias, a taxa de detecção de estruturas fúngicas aumentou significativamente. Dessa forma, foi possível identificar elementos característicos do fungo, como formas leveduriformes e, ocasionalmente, raras hifas, elevando o percentual de positividade para 50,7% dos casos analisados (52).

Entretanto, embora seja uma ferramenta útil, a histopatologia isoladamente não é suficiente para confirmar todos os casos de esporotricose, principalmente devido à baixa carga fúngica frequentemente observada nos tecidos infectados. Dessa forma, em áreas endêmicas ou em situações de surtos, recomenda-se que os achados histopatológicos sejam interpretados por profissionais capacitados e correlacionados com dados clínicos e epidemiológicos. Além disso, sempre que possível, o diagnóstico deve ser

confirmado por meio de métodos complementares, como a cultura micológica ou técnicas moleculares.

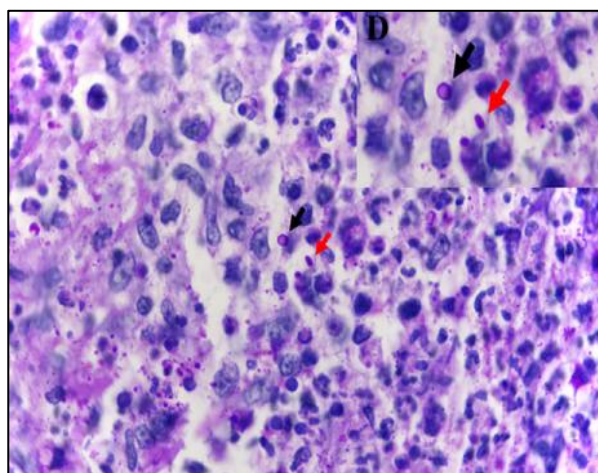


Figura 9: Forma Sistêmica. **Fonte:** Associação Brasileira de Dermatologia (2022).

1.4.3 Teste Molecular

A Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR) e Análise de Polimorfismo de Enzima de Restrição (PCR-RFLP) são métodos que utilizam DNA (Ácido Desoxirribonucleico) para realizar a identificação e detecção do patógeno, mesmo que em mínimas concentrações nas amostras analisadas. São metodologias específicas e sensíveis e são especificamente direcionados ao DNA do patógeno de interesse (9).

O avanço de novas metodologias moleculares aprimorou o conceito de identificar e reclassificar espécies de fungos (53). Para identificar as principais espécies do fungo que causa a esporotricose, deve ser levado em consideração o tipo de amostra biológica processada no laboratório, como por exemplo, o exsudato, a biópsia ou a escarificação da lesão. Elas diferem na sensibilidade em encontrar o patógeno pela técnica molecular (54).

Entre os vários alvos para a detecção do DNA da *Sporothrix* spp., estão a calmodulina (CAL), espaçador transcrito interno (ITS) e β -tubulina (BT2) (9).

Kano *et al.* (2001), foram um dos primeiros pesquisadores a desenvolver um sistema de PCR utilizando coloração por brometo de etídio para a identificação de *S. schenckii*, com base na amplificação do gene quitina sintase

I (CHS1). Nessa metodologia, foram analisadas vinte e duas amostras de DNA provenientes de diferentes microrganismos, dessas, seis correspondiam a isolados de *Sporothrix* spp., o método apresentou resultados satisfatórios, permitindo a identificação correta das seis cepas do fungo avaliada (55).

Della terra *et al.* (2021) desenvolveram e validaram um ensaio de q-PCR multiplex para auxiliar o diagnóstico da esporotricose, usando 70 amostras de exsudato das lesões de gatos com suspeita de esporotricose. O estudo identificou em 69 amostras a *Sporothrix brasiliensis* e demonstrou uma sensibilidade de 98,6% e especificidade de 100% nas amostras analisadas (56).

Todos esses testes foram feitos com diferentes amostras. Geralmente, a maioria dos procedimentos foca no gene da calmodulina, que é considerado o padrão de referência para identificar as espécies, ou na região espaçadora transcrita interna (ITS). A sensibilidade e a precisão desses testes costumam ser bastante altas, acima de 90% (57–60) . No entanto, os métodos moleculares precisam de laboratórios bem equipados e avançados. Além disso, sua aplicação é um pouco limitada devido à falta de kits comerciais disponíveis, à ausência de procedimentos padronizados e ao número reduzido de estudos para validar esses testes em amostras de humanos.

2. JUSTIFICATIVA

Em uma região como o Amazonas, marcada por surtos de grande magnitude, torna-se essencial dispor de métodos diagnósticos que sejam ao mesmo tempo rápidos e precisos. A identificação correta da espécie envolvida, é de importância estratégica para a epidemiologia molecular, visto que as diferentes espécies estão diretamente associada à maior virulência, transmissibilidade e gravidade clínica.

Estudos in vitro de suscetibilidade antifúngica demonstram que diferentes espécies do gênero *Sporothrix* spp. apresentam perfis distintos frente aos principais fármacos utilizados no tratamento da doença, o que pode impactar diretamente a eficácia clínica e o prognóstico dos pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Identificar as espécies clinicamente relevantes de *Sporothrix* spp. por q-PCR *in house* nos pacientes com esporotricose

3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar protocolo de coleta, extração e q-PCR a partir do exsudato da lesão suspeita de esporotricose;
- Identificar o limite de detecção do agente etiológico da esporotricose pelo teste molecular q-PCR *in house*;
- Avaliar parâmetros de eficiência do teste molecular q-PCR *in house* em relação aos pacientes notificados;
- Verificar a concordância do q-PCR *in house* com a cultura
- Identificar a frequência da *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa* em pacientes com suspeita de esporotricose;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição do Estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico, observacional, descritivo e transversal, com pacientes atendidos por demanda espontânea na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM), no período de agosto de 2023 a novembro de 2024. Os testes moleculares foram realizados no laboratório de Biologia da FUHAM.

4.2 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FUHAM sob o número do CAAE: 70506823.9.0000.0002 (Nº do parecer: 6.230.948), de 10 de agosto de 2023, e coordenado pelo prof. Dr. André Luiz Leturiondo (Anexo1). Esta pesquisa faz parte de um estudo maior, desenvolvido na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM), intitulado “Enfrentando a esporotricose no Amazonas: do diagnóstico molecular à resistência medicamentosa”.

Foram incluídos no estudo os pacientes que apresentavam lesões com suspeita de esporotricose, e que aceitaram participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o termo de Autorização de Imagem para a permissão do Registro fotográfico das lesões, com a finalidade de estudar e identificar os padrões clínicos.

4.3 Obtenção da Amostra

As amostras de exsudato foram coletadas de pacientes com lesões suspeitas de esporotricose, utilizando, de forma distinta, uma alça de plástico com extremidade circular de 1 µL (Olen/Kasvi). A primeira coleta foi realizada e semeada imediatamente nos meios ágar Sabouraud e ágar Mycosel, sendo destinada ao exame micológico. Em seguida, na mesma lesão e no mesmo paciente, foi realizada uma nova coleta para identificação molecular. A amostra foi colocada em microtubo de 1,5 mL contendo tampão ATL (Tissue lysis buffer)

do kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN). As amostras dos pacientes foram posteriormente encaminhadas ao laboratório de Micologia e Biologia Molecular, onde foram realizadas, respectivamente, a cultura do fungo e as análises moleculares (Figura 10).

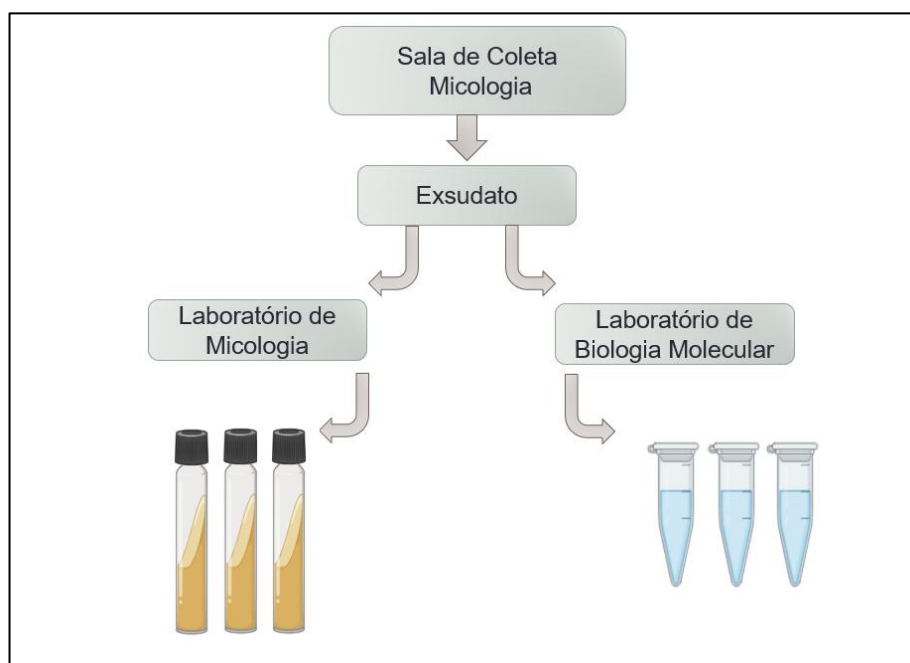


Figura 10: Fluxograma da coleta do material biológico.

4.4 Critérios de Inclusão

- Pacientes maiores de 18 anos que aceitaram participar do projeto.

4.5 Critérios de Exclusão

- Pacientes que não apresentaram amplificação na q-PCR *in house* para o gene humano constitutivo (β -actina);
- Pacientes com o uso de antibióticos, antifúngicos, pomadas ou uso de outras substâncias, nos últimos 7 dias;

4.6 Procedimentos

4.6.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue da QIAGEN, seguindo as instruções do fabricante (Anexo 3). Etapas preliminares foram otimizadas para amostra clínica de exsudato. O material genético extraído foi quantificado pelo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

4.6.2 Limite de detecção da qPCR

O DNA utilizado foi extraído de colônias da cultura e quantificado para conhecer a concentração e o grau de pureza. A Curva de detecção foi construída a partir de cinco pontos de diluições (1:2) seriadas, em triplicata, utilizando água ultrapura (Invitrogen). A reação foi realizada para um volume final de 10 µl, utilizando 2 µl de DNA e com os seguintes reagentes: 5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix a 2X (Thermo Fisher), 0,9 µl de Primer Forward e 0,9 µl de Primer Reverse (Thermo Fisher) a 10 µM, 0,25 µl de Sonda a 10 µM (Thermo Fisher) e 0,95 µl de água ultrapura (Invitrogen). A amplificação foi realizada no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems®), com a seguinte programação: a) 2 minutos a 50°C, seguido de 10 minutos a 95°C (ativação da polimerase e desnaturação inicial), b) 40 ciclos composto de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

4.6.3 Curva Padrão

Para a quantificação do número de cópias do *Sporothrix brasiliensis* foram feitas diluições seriadas, a primeira 1:10 e as outras diluições foram feitas 1:2 (Figura 11), com água ultrapura (Invitrogen), do ácido nucleico purificado de uma colônia do fungo. Foram preparados cinco pontos de diluições gerando padrões de concentrações diferentes, e amplificado por qPCR em triplicata. No final da reação cada ponto gera um valor de cycle threshold (Ct). Quanto maior a concentração de DNA, menor o valor de Ct. A curva padrão foi realizada

conforme concentrações de reagentes do qPCR e Termociclagem realizado na curva de detecção.

4.6.4 Identificação de espécie por q-PCR

A q-PCR (Reação de Cadeia da Polimerase em Tempo Real) foi realizada no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems®) a partir de DNA de isolados de *Sporothrix* spp. ou exsudato das lesões. As sequências de primers e sondas foram baseadas no protocolo descrito por Terra et al. (2022), com adaptações relacionadas ao tipo de amostra utilizada e às concentrações dos reagentes empregados na reação (Tabela 1) (56).

O ensaio para o isolado foi realizado em uma reação final para um volume de 10µl, usando 2µl de DNA com concentração ideal entre 1 ng/µl a 3 ng/µl, conforme Curva Padrão ou a Curva de Detecção. Enquanto nas amostras clínicas foi realizado para um volume final de 20µl e 5µl de DNA, e com os seguintes reagentes: 10 µl de Master Mix 2x (Thermo Fisher), 0,6µl de Primer Forward a 10µM e 0,6µl de Primer Reverse a 10µM (Thermo Fisher), 0,4 µl de Sonda a 10µM (Thermo Fisher) e 3,4 µl de água ultrapura (Invitrogen). As condições de termociclagem foi realizada conforme a Curva de detecção.

As amostras foram testadas em triplicata, sendo consideradas positivas as amostras que apresentam amplificação em pelo menos uma das três triplicata testadas. Todos os testes eram analisados em Baseline de 0,02 e uma cepa de cultura usada como controle positivo para validação da reação.

Tabela 1: Sequência de primer e sonda usada na reação de qPCR

Alvo	Primer e Sonda	Sequência Primer e Sonda (5' – 3')	T _m (°C)	Concentração inicial	Reporter (5')/Quencher (3')
Sporothrix	Sporo-F	CGTCTGAGCGTCTACTTCAACG	60	10µM	-
	Sporo-R	GGACGGCATCCATGGTACC	60	10µM	-

<i>S. brasiliensis</i>	Probe Sbra	CGATCGGCTTTGCTTTGGCCCTAGT	69.4	10µM	FAM/QSY
<i>S. schenckii</i>	Probe Ssch	TCCCACCGTTTGGCAC	70.0	10µM	FAM/MGB
<i>S. globosa</i>	Probe Sglo	CGTCACAGTTTTGGCACGATTCTAAC AATTTT	68.9	10µM	FAM/QSY

4.6.5 Análise de dados

Foram avaliados a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do qPCR e do Padrão-ouro com os casos notificados (clínico-epidemiológico ou laboratorial) e o grupo que não tinha esporotricose. Para avaliação da concordância entre os testes foi usado o GraphPad para calcular o índice Kappa e a interpretação dos valores foi conforme proposto por Landis e Koch (1977) (Tabela 2) (61), os resultados foram calculados e considerando intervalo de confiança de 95% (IC)

Tabela 2: Interpretação para os valores de Kappa

Valor de Kappa	Interpretação
< 0	Sem concordância
0 – 0,19	Concordância ruim
0,20 – 0,39	Concordância baixa
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substancial
0,80 – 1,0	Excelente concordância

5 RESULTADOS

A otimização da coleta das amostras clínicas (exsudato) começou inicialmente com três alçadas do material biológico da lesão mais evidente, resultando em uma concentração média de DNA de 5,4 ng/μL em 30 pacientes. À medida que o número de coletas por lesão foi aumentado e houve o acréscimo do uso de esferas de vidro, a concentração de DNA apresentou aumento progressivo. A partir de seis alçadas da lesão, a concentração média encontrada foi de 10,9 ng/μL (n = 33). Com nove alçadas foi de 15,8 ng/μL (n = 34) e, com doze alçadas, a concentração média encontrada em 71 pacientes foi de 41,4 ng/μL.

Participaram do estudo 201 pacientes com suspeita de esporotricose. A notificação da doença foi baseada em critérios clínico-epidemiológico e/ou laboratorial. Seguindo esses parâmetros, 83,6% (168/201) foram diagnosticados com esporotricose. Os 16,4% (33/201) foram diagnosticados com outras afecções da pele e do tecido subcutâneo, como impetigo, leishmaniose, piodermite e erisipela bolhosa.

Conforme demonstrado na (Tabela 3), entre os 168 casos confirmados de esporotricose, observou-se predominância do sexo feminino (67,3%), com idade média de 44,4 anos (DP ± 15,6), variando de 18 a 79 anos. A análise por faixa etária revelou que a doença está presente em sua maioria em adultos de meia-idade (49-59 anos) em 41,7% dos casos. Em relação a cor, 122 (72,6%) dos pacientes autodeclararam-se pardos e 35 (20,8%) brancos.

Tabela 3: Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com esporotricose (n=168).

Variável	Categoria	n (%)
Sexo	Feminino	113 (67,3%)
	Masculino	55 (32,7%)
Cor	Parda	122 (72,6%)
	Branca	35 (20,8%)
	Preta	6 (3,6%)

	Amarela	5 (3%)
Idade	Média (anos)	44,4 ($\pm$ 15,6)*
Faixa etária	18-39 anos	67 (39,9%)
	40-59 anos	70 (41,7%)
	$\geq$ 60 anos	31 (18,4%)
Forma Clínica[†]	Linfocutânea	118 (70,2%)
	Cutânea Fixa	44 (26,2%)
	Inoculação Múltipla	6 (3,6%)
Região anatômica acometida	Membros superiores	103 (61,3%)
	Membros inferiores	40 (23,8%)
	Tronco	12 (7,1%)
	Face	6 (3,6%)
	Membros Superiores e Inferiores	7 (4,2%)
Contato com Gato	Direto não traumático	69 (41,1%)
	Direto traumático	36 (21,4%)
	Contato indireto	30 (17,8%)
	Nega contato	26 (15,5%)
	Não lembra	7 (4,2)
Tempo de evolução	< 30 dias	80 (47,6%)
	30 a 60 dias	75 (44,6%)
	$\geq$ 61 dias	13 (7,7%)
Número de lesões	Lesão única	116 (69%)
	2 a 4 lesões	46 (27,4%)
	$\geq$ 5 lesões	6 (3,6%)

*DP: Desvio padrão.

† Classificação das lesões clínicas de acordo com Orofino-Costa *et al.* (2022).

Em relação a classificação das lesões, a forma linfocutânea (LF) foi a mais frequente em 70,2% (118/168), caracterizada em sua maioria com lesão localizada e nódulos linfáticos ascendentes, e tendo como região anatômica mais acometida os membros superiores 61,3% (103/168), com ênfase na mão e antebraço (Tabela 3).

Na classificação da provável via de transmissão, 41,1% (69/168) relataram contato direto não traumático com gatos, enquanto 21,4% (36/168), apresentaram arranhaduras e mordidas. O tempo médio entre o aparecimento da lesão inicial e a coleta foi de 33,3 dias. Em relação ao número de lesões por paciente, a média observada foi de 1,5 lesões em 69% (116/168) dos pacientes apresentaram lesão única ulcerada, enquanto 27,4% (46/168) tinham duas a quatro lesões.

5.1 Curva Padrão

Os cinco pontos diluídos apresentaram concentrações variando de 17,5 ng/μl a 1,0 ng/μl por reação (Figura 11). Os valores de Ct obtidos foram apresentados contra o logaritmo da concentração inicial do DNA, resultando em uma curva padrão linear com coeficiente de determinação (R^2) com 0,966, indicando alta correlação entre os dados. A eficiência da curva foi de 95%, dentro dos parâmetros ideais para reações de qPCR (90%-110%), o slope -3,448, compatível com uma amplificação eficiente e reprodutível (Figura 12).

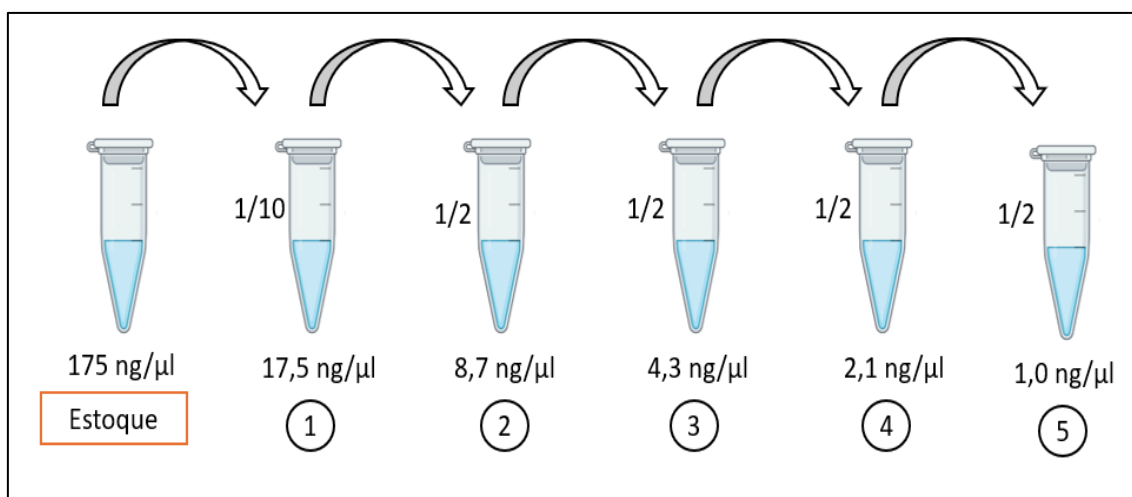


Figura 11: Diluições realizada na curva padrão.

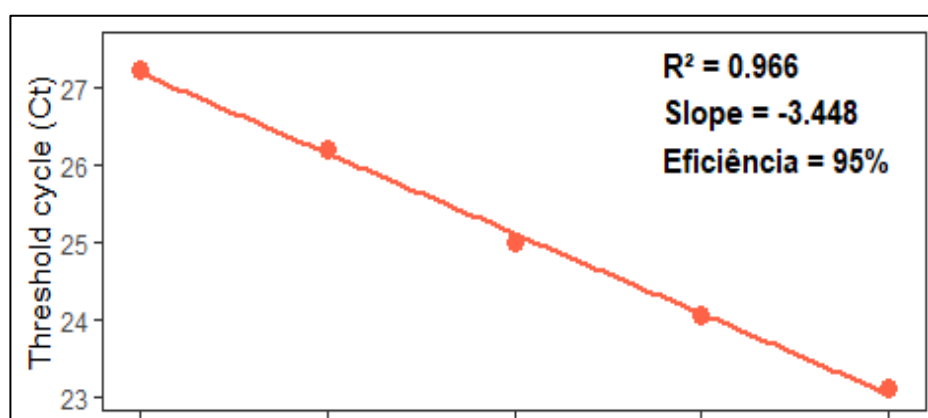


Figura 12: Curva Padrão do Teste

5.2 Limite de detecção da qPCR

Em relação ao limite de detecção do teste realizado, as concentrações de cada reação apresentaram valores de aproximadamente 3,3 ng/μl a 976,5 fg/μl. Ao analisar os resultados da reação, o ensaio apresentou capacidade de detecção até a concentração de 976,5 fg/μl, com o Ct = 37,02 (Figura 13), equivalente a 27 cópias por microlitro (μl) do genoma da *Sporothrix brasiliensis*.

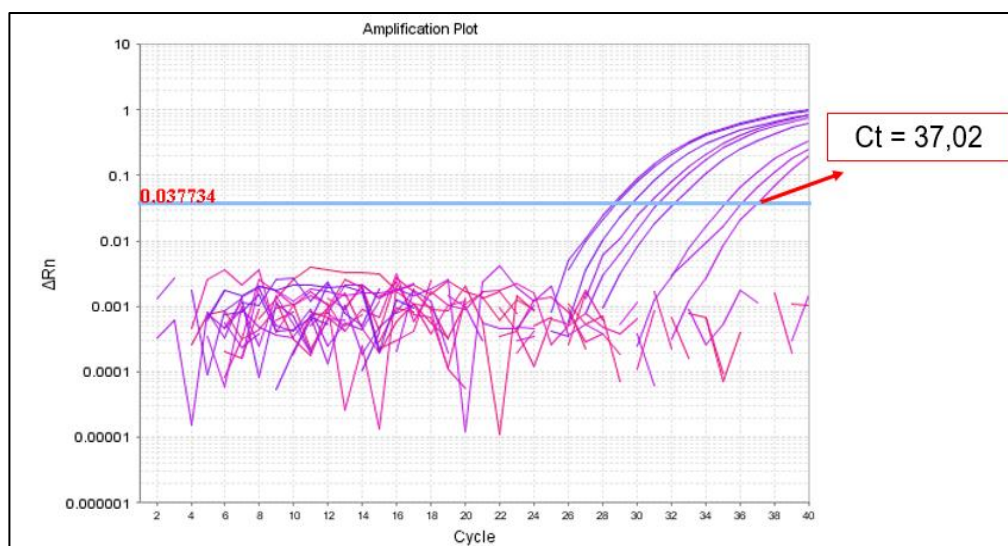


Figura 13: Gráfico de limite de detecção do teste realizado pelo equipamento StepOne.

5.3 Desempenho no diagnóstico da qPCR e cultura para esporotricose

Dos 201 pacientes recrutados, todos foram submetidos à coleta de exsudato para análise laboratorial por meio de cultura e reação da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Dos 168 casos notificados para a esporotricose, a qPCR apresentou uma sensibilidade de 64,2% (108/168), e especificidade de 100% (33/33), não houve resultados falso-positivo, ou seja, foi observado a capacidade do teste em excluir corretamente indivíduos não doentes. O valor preditivo positivo (VPP) foi de 100%, enquanto o valor preditivo negativo (VPN) foi de 35,4%. A acurácia analisada apresentou resultado de 70,1% (Tabela 4).

Ao analisar a cultura, um teste laboratorial considerado padrão-ouro para identificar o *Sporothrix* spp., demonstrou uma sensibilidade de 88% (148/168), e especificidade de 100% (33/33). Quanto ao valor preditivo positivo (VPP) foi de 100%, enquanto o valor preditivo negativo (VPN) apresentou 62,2%. Na análise da acurácia foi 90% (Tabela 4).

Tabela 4: Performance do teste molecular e do padrão-ouro em pacientes e voluntários saudáveis.

	Sensibilidade IC 95%	Especificidade IC 95%	VPP* IC 95%	VPN* IC 95%	Acurácia
qPCR	64,3% (108/168)	100% (33/33)	100% (108/108)	35,5% (33/93)	70,1%
Cultura	88,1% (148/168)	100% (33/33)	100% (148/148)	62,3% (33/53)	90%

*VPP: Valor Preditivo Positivo

*VPN: Valor Preditivo Negativo

IC: Intervalo de Confiança.

A análise de concordância entre a cultura e a reação da cadeia da polimerase em tempo real foi realizada com os 201 pacientes recrutados com suspeita de esporotricose. A concordância geral observada entre as técnicas foi de 75,1% (151/201), calculada a partir da soma dos casos igualmente positivos (103) e negativos (48). A discordância total foi de 24,9% (50/201), sendo a maioria dos casos divergentes (45), representada por amostras com cultura positiva e qPCR negativo, e em menor número, observaram-se 5 casos com cultura negativa e qPCR positivo. O índice Kappa mostrou um coeficiente de 0,48, interpretado como uma concordância moderada entre os dois métodos (IC=95%) (Tabela 5).

Tabela 5: Concordância do teste molecular e do padrão-ouro na identificação do *Sporothrix* spp. a partir do exsudato.

	Cultura +	Cultura -	Total	kappa
qPCR +	103	5	108	0,48
qPCR -	45	48	93	
Total	148	53	201	

5.4 Identificação das espécies por qPCR *in house*

Para identificação molecular das espécies, foi realizada a reação de qPCR para 20µl conforme protocolo (Anexo 3), para melhorar o desempenho na identificação do DNA da *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*. A partir das 168 amostras dos pacientes a única espécie identificada foi a *Sporothrix brasiliensis*, com 84% (141/168) dos casos. Desse total, a maioria 76,6% (108/141) foi obtida diretamente a partir de DNA extraído de exsudato de lesões cutâneas, enquanto 23,4% (33/141) foram identificadas a partir de DNA de isolados.

Não foram identificadas a *S. brasiliensis* em 27/168 amostras de exsudato pela qPCR, e em seguida foi realizada uma nova reação para identificar a presença da *S. schenckii* e *S. globosa*. Porém, foram apenas testadas 18/27, devido a disponibilidade de DNA extraído. Em todas essas 18 amostras, os resultados foram negativos para ambas as espécies.

6 DISCUSSÃO

Em meio ao grande surto da doença, o gênero *Sporothrix* spp. compreende um grupo de fungos dimórficos, agentes etiológicos da esporotricose. Entre as espécies de relevância médica, destacam-se *S. schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa*, sendo responsáveis por diferentes padrões epidemiológicos e clínicos da doença. A patogenicidade destas espécies varia com os fatores de virulência, capacidade de adaptação ao hospedeiro e mecanismos de evasão (30).

Em relação a *Sporothrix brasiliensis*, se destaca como agente etiológico de maior relevância clínica e epidemiológica na América Latina, sobretudo no Brasil. Essa espécie possui capacidade de adaptação ao hospedeiro, induzindo a resposta inflamatória elevada e formas clínicas mais graves, com manifestações extracutâneas e disseminadas (9). Ela se destaca das outras espécies, por apresentar maior virulência, rápida disseminação e elevada capacidade zoonótica, associada principalmente à transmissão por gatos domésticos. Os múltiplos fatores de virulência, como a produção elevada de melanina, maior expressão de adesinas e de enzimas hidrolíticas, e a resposta imune do hospedeiro, não só aumentam a capacidade de infecção, mas também podem causar infecções mais graves, o que torna a espécie um desafio de saúde pública (62).

No presente estudo, através da qPCR, foi identificado o *S. brasiliensis* (84%) como o agente causador da doença nos casos investigados. Portanto, além do município de Manaus, essa espécie é responsável por grandes surtos endêmicos no país, principalmente no Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraíba e países vizinhos como a Argentina, Uruguai e Chile (4,42,63–65).

Esses achados reforçam a predominância de *S. brasiliensis* como o principal agente etiológico causador da esporotricose no norte do Brasil e evidencia que a qPCR pode ser uma técnica complementar para identificar espécies do clado de interesse clínico.

Embora a *Sporothrix brasiliensis* domine o cenário epidemiológico e esteja associada principalmente à transmissão zoonótica, não há relatos na literatura da ocorrência de *S. schenckii* ou *S. globosa* no norte do Brasil. Essas espécies representam uma ameaça constante à biodiversidade na região, uma vez que já

foram notificadas no Sul, Sudeste e Nordeste do país, demonstrando sua capacidade de adaptação a distintos contextos climáticos, ecológicos e epidemiológicos. A *S. globosa*, embora menos frequente, tem sido identificada em pacientes na região Sudeste, geralmente associada a quadros clínicos leves. A dispersão dessas espécies para o Amazonas pode ocorrer de forma silenciosa, uma vez que sua identificação é negligenciada na rotina laboratorial, que não utiliza métodos moleculares (2,66)

Dessa forma, a diferenciação das espécies patogênicas de *Sporothrix* não possui apenas valor taxonômico, mas principalmente em consequências diretas para a prática clínica, vigilância epidemiológica e estratégias de controle, visto que sua patogenicidade exacerbada e a associação à transmissão zoonótica contribuem para expansão de surtos em áreas urbanas (30).

A expansão da esporotricose no Brasil tem sido amplamente documentada, com o *Sporothrix brasiliensis* desempenhando um papel central nesse cenário. A transmissão zoonótica, especialmente por meio de gatos domésticos, tem sido um dos principais fatores para a dispersão da doença. Além da elevada densidade de felinos infectados e do contato próximo entre animais e humanos, a circulação de gatos doentes acompanhando seus tutores em deslocamentos interestaduais pode contribuir para a introdução do agente em novas áreas. Associadas a falhas no diagnóstico precoce e no manejo adequado dos casos, essas condições podem favorecer a propagação da infecção para diferentes regiões do país, alcançando áreas anteriormente consideradas não endêmicas, como a Região Norte (54).

Os primeiros casos da esporotricose no estado do Amazonas foram registrados na cidade de Manaus na zona oeste da capital. Bairros da Glória e São Raimundo foram epicentro do surto da doença, como mostrado no boletim epidemiológico de 2023 da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS) (67), e por Mesquita *et al.* (2024), no qual ambos demonstram o crescimento da doença na capital do estado do Amazonas entre os anos 2020 e 2023 (41). Posteriormente, a disseminação foi observada em todas as regiões urbanas e até mesmo no interior do estado. Esse padrão de expansão reforça a hipótese de que a introdução da doença em Manaus ocorreu por meio do transporte de gatos infectados de outras regiões do Brasil, principalmente o sul e sudeste, considerados regiões endêmicas (67).

Valente *et al.* (2025) informaram também que nesse mesmo período houve duplicação de casos em humanos com a maioria decorrente de contato com gato doente (68). Esses estudos reforçam o crescimento exacerbado da doença nesse período de 4 anos. Além disso, descrevem o felino como o principal animal transmissor da doença, refletindo sua expansão para outros municípios adjacentes como Iranduba, Presidente Figueiredo e Manacapuru.

Nesse contexto, infelizmente são poucos os Centros de Saúde que oferecem o teste micológico para a identificação do agente da esporotricose. Nos locais onde existe o exame de cultura, o resultado pode levar aproximadamente sete dias, impactando o diagnóstico precoce da doença e favorecendo sua progressão clínica. Diante disso, propusemos a identificar do *Sporothrix* spp. em nível de espécie a partir do exsudato de lesões cutâneas, visando o diagnóstico laboratorial molecular mais rápido, além de ajudar no diagnóstico diferencial com a leishmaniose.

Em relação ao perfil epidemiológico dos pacientes analisados, observou-se a idade média de 44,4 anos, afetando com mais frequência as mulheres, correspondendo a 67,3% dos casos. A forma clínica predominante foi a linfocutânea (LF), presente em 70,2% dos indivíduos, e aproximadamente 62,5% dos pacientes relataram contato com gato e 37,5% não tiveram contato com felino ou não lembra. No entanto, os 37,5% que negaram ou não lembram de contato direto com o gato, é possível levantar hipóteses de transmissão por ambiente contaminado pelo fungo, considerando a capacidade do *Sporothrix* spp. de permanecer em matéria em decomposição como, solo, madeira e plantas, ou ainda a possibilidade de contato indireto com felinos infectados, não percebido ou lembrado pelo paciente.

Um perfil clínico-epidemiológico semelhante foi descrito por Bittencourt *et al.* (2022), ao estudar aspectos clínicos-epidemiológicos e terapêuticos da esporotricose em uma área urbana do estado de São Paulo. Analisando 260 pacientes, a doença afetou predominantemente as mulheres (69%), com média de idade de 46 anos. Uma quantidade expressiva de pacientes informou contato com gatos doentes antes do aparecimento de lesões de pele, aproximadamente 96,5% dos casos. A apresentação clínica mais comum foi a linfocutânea (LF) presente em 59,2%, informando também que os membros superiores foi o local mais afetado com 78,8% dos casos (32)

Outro perfil clínico similar foi descrito por Paes *et al.* (2014), em um estudo com 50 pacientes. O sexo mais prevalente foi o feminino (68%), com média de idade de 47 anos. Os membros superiores (62%) foram as regiões mais acometidas, e a maioria dos pacientes (48%) apresentavam lesões linfocutâneas. Aproximadamente 88,9% dos pacientes relataram contato com gatos (69)

Nosso estudo corrobora com os achados recentes da literatura científica, onde a maioria das lesões acontece nos membros superiores (61,3%), o que provavelmente está relacionado ao contato direto das mãos com os gatos doentes ou com ambientes por eles contaminados. É importante ressaltar que em torno de 52,3% dos pacientes do estudo apresentaram tempo de evolução superior a trinta dias, esse porcentual pode ser atribuído a múltiplos fatores de ordem social, econômica e estrutural. A literatura tem demonstrado que a esporotricose, apresenta diagnóstico frequentemente tardio em populações vulneráveis, o que favorece a progressão da doença e o desenvolvimento de formas clínicas mais graves (70).

Do ponto de vista socioeconômico e ocupacional, os pacientes com maior tempo de evolução incluem trabalhadores informais, indivíduos em situação de pobreza e aqueles com vínculo regido pela Consolidação das Leis do Trabalho (CLT)(71). Para esses grupos, a busca por atendimento médico é frequentemente postergada devido à dificuldade de ausentar-se do trabalho, seja pela insegurança financeira que caracteriza o trabalho informal ou pelas limitações impostas pela legislação trabalhista para afastamentos durante o horário comercial.

A maioria dos estudos de identificação molecular das espécies do *Sporothrix* spp. utilizam amostras do isolado ou de biópsias. Resolveu-se testar, a partir do exsudato, uma amostra clínica simples, rápida e não invasiva de ser coletada. As coletas e extrações foram iniciadas com base na experiência laboratorial da equipe. Na extração inicial, realizada a partir de três coletas por lesão em 30 pacientes, a concentração média obtida (5,4 ng/ μ L) mostrou-se relativamente baixa para a identificação do fungo. A baixa concentração de DNA obtida com três coletas por lesão pode estar associada à reduzida carga fúngica presente nas lesões, à ausência de um processo de lise mecânica da parede celular fúngica e às perdas de material durante as etapas de extração.

O aumento progressivo do número de coletas para seis, nove e até doze repetições por lesão resultou em um aumento consistente da concentração de DNA, atingindo valores de 10,9 ng/μL (n=33), 15,8 ng/μL (n=34) e 41,4 ng/μL (n=71), respectivamente. Esses resultados sugerem que a repetição da coleta no mesmo microtubo, sem a substituição do tampão de extração, favoreceu o acúmulo gradual de material fúngico, aumentando as chances de detecção do DNA alvo.

A inclusão de esferas de vidro a partir de seis coletas por lesão contribuiu adicionalmente para o aumento da eficiência da extração, possivelmente em razão da ruptura mecânica mais eficaz da parede celular fúngica. Espécies do complexo *Sporothrix*, especialmente *S. brasiliensis*, apresentam parede celular espessa e rica em quitina e melanina, estruturas que dificultam o rompimento celular e a liberação do DNA (72). Dessa forma, a combinação entre o aumento do número de coletas do material biológico e a lise mecânica realizada por esferas de vidro, mostrou-se mais eficaz na melhoria da concentração de DNA do agente infeccioso.

Essas evidências mostram que etapas pré-analíticas, como a coleta e a preparação das amostras, exercem um papel fundamental na quantidade de material genético extraído. A realização de múltiplas coletas por lesão associada ao uso de técnicas de lise mecânica representa uma estratégia simples, eficaz e facilmente reproduzível.

Analisando a curva padrão, a reação de qPCR demonstrou desempenho analítico moderado para a detecção de *Sporothrix brasiliensis*, evidenciado pela construção de uma curva padrão linear com coeficiente de determinação ($R^2 = 0,966$), indicando elevada correlação entre os valores de Ct e da concentração inicial de DNA, apresentando uma eficiência de 95%. Valores de R^2 superiores a 0,95 são considerados adequados para ensaios quantitativos em tempo real, refletindo consistência, linearidade e confiabilidade da amplificação ao longo da faixa dinâmica avaliada, conforme preconizado pelas diretrizes MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), que estabelecem intervalos de eficiência entre 90% e 110% (73)

O limite de detecção da reação apresentou uma boa sensibilidade analítica, com capacidade de detecção de DNA fúngico até a concentração de 976,5 fg/μl, correspondendo a aproximadamente 27 cópias do genoma da *S.*

brasiliensis, com Ct médio de 37,02. Esses achados mostram que é possível identificar DNA do *S. brasiliensis* mesmo em condições de baixa carga fúngica. A literatura descreve que ensaios de qPCR bem padronizadas apresentam limites de detecção variados, dependendo do alvo molecular (CAL, IST, CHS1), do desenho dos primers, das condições da reação e principalmente da amostra biológica utilizada (59).

Em 2020, Zhang *et al.* aplicaram um PCR envolvendo o gene ITS para identificação de *S. globosa* onde demonstraram um limite de detecção de 10 fg a partir de DNA extraído da cultura do fungo (74). No mesmo ano Della Terra *et al.* realizaram um ensaio de qPCR multiplex para diferenciar *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, utilizando polimorfismo no gene de cópia única da β -tubulina. Para todas as espécies analisadas, o limite de detecção foi de três cópias do DNA extraído diretamente da cultura (56).

A calmodulina (CAL) é uma proteína reguladora de cálcio altamente conservada considerada um excelente gene para taxonomia e identificação de espécies dentro do complexo *Sporothrix* (75). Marimon *et al.* (2007), demonstraram que a análise de um fragmento do gene (CAL), fornece informação suficiente para discriminar as espécies clinicamente relevantes, como a *S. schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa* (76).

O diagnóstico laboratorial padrão-ouro para a esporotricose baseia-se no isolamento e na caracterização morfológica de *Sporothrix* spp. em meio de cultura (77). Todavia, essa metodologia apresenta limitações, uma vez que demanda um período prolongado, de alguns dias, até a obtenção da identificação a nível de gênero do agente etiológico (78). Portanto, o desenvolvimento de métodos diagnósticos alternativos torna-se essencial, uma vez que eles podem oferecer resultados em menor tempo e com a precisão de identificar a espécie, vantagens não alcançadas pela cultura micológica (79).

Nos pacientes analisados neste estudo, a cultura apresentou sensibilidade de 88,1%, resultado compatível com o que já é amplamente descrito na literatura quanto à sua elevada eficiência na identificação de *Sporothrix* spp. Além disso, a especificidade observada foi de 100%, evidenciando a alta confiabilidade desse método na confirmação diagnóstica da esporotricose (80,81). Esses achados reforçam que, apesar do tempo prolongado necessário para a obtenção dos resultados, a cultura permanece

como o padrão-ouro laboratorial, apresentando desempenho diagnóstico consistente, especialmente no que se refere à confirmação etiológica da doença.

A qPCR *in house* utilizada no presente estudo, utilizando amostras de exsudato de lesão cutânea, apresentou uma sensibilidade de 64,3% e especificidade de 100%. Esses achados indicam que, quando aplicada a este tipo de amostra, a técnica não demonstrou uma boa sensibilidade para detecção de todos os pacientes positivos. É importante ressaltar também, que o exsudato utilizado na análise do estudo é de fácil coleta e um material excelente para o cultivo fúngico, mas seu desempenho não foi satisfatório. Cabe destacar que, mesmo com procedimentos realizados para minimizar tais limitações, como a coleta repetida na mesma lesão e o uso de esferas de vidro durante a extração para promover atrito e aumentar a concentração de DNA, a técnica ainda apresentou sensibilidade reduzida.

No presente estudo, o valor preditivo negativo (VPN) observado para a cultura foi de 62,3%, enquanto o qPCR apresentou VPN de 35,5% no diagnóstico da esporotricose. Esses resultados indicam que, diante de um resultado negativo, a cultura apresenta maior capacidade de excluir a presença da infecção em comparação a técnica molecular. Essa diferença entre os métodos refletiu-se no índice Kappa de Cohen, que foi de 0,48, indicando uma concordância moderada entre a qPCR e a cultura. O valor obtido reforça que a qPCR não pode substituir a cultura, sendo a discordância predominantemente observada nos casos em que a cultura foi positiva e a qPCR negativa. Por outro lado, o menor VPN observado para o qPCR, associado ao Kappa moderado, pode estar relacionado a fatores como a baixa carga fúngica nas amostras clínicas, a presença de inibidores da reação ou limitações associadas ao protocolo de extração e amplificação do DNA, que comprometem a detecção molecular em amostras com baixa viabilidade.

Embora o qPCR seja reconhecido por sua rapidez e potencial sensibilidade, os resultados negativos obtidos devem ser interpretados com cautela, especialmente em contextos clínicos com forte suspeita de esporotricose. Recomenda-se a associação com métodos tradicionais, como a cultura, para maior segurança no diagnóstica laboratorial.

No estudo, foram obtidas 15 amostras de biópsia de pacientes notificados com esporotricose, todos apresentando lesões cutâneas. No entanto, a qPCR

não se mostrou promissora para o diagnóstico nesse tipo de amostra. A técnica identificou a *S. brasiliensis* em apenas 40% (6/15) dos pacientes, enquanto em 60% (9/15) não houve amplificação do DNA fúngico. Diante desses resultados insatisfatórios, associados à complexidade do processo de obtenção das amostras, optou-se por não incluir novas biópsias no estudo. A coleta de biópsia envolve um fluxo burocrático e operacional que inclui desde a marcação de um procedimento cirúrgico, a disponibilidade de um profissional habilitado, até a execução da coleta e o encaminhamento ao laboratório. Esse fluxo pode levar semanas ou até meses para ser concluído, especialmente em serviços públicos de saúde com demanda elevada, comprometendo a agilidade necessária para o diagnóstico rápido.

Diferente do estudo desenvolvido, protocolos de PCR têm se mostrado promissores no diagnóstico da esporotricose. Silva *et al.* (2024), realizaram em Pernambuco uma técnica de Nested PCR em um conjunto de treze amostras (6 biópsias, 5 exsudatos, 2 secreções conjuntival) que haviam apresentado diagnóstico positivo para *Sporothrix* spp. por meio da cultura. Os resultados demonstraram sensibilidade de 100%, além da ausência de reação cruzada com DNA de *Leishmania* spp., ou seja, não houve amplificação. Apesar do número reduzido de amostras, a PCR destaca-se como uma alternativa diagnóstica promissora, pois permite a identificação da espécie a partir de amostras clínicas, sem a necessidade prévia de isolamento fúngico (82). Macedo *et al.* (2023), utilizaram a RT-qPCR tendo como alvo o gene do RNA da subunidade ribossômica pequena mitocondrial em 61 amostras de biópsias de pacientes de um centro de referência do Rio de Janeiro, todas previamente diagnosticadas como positivas para *Sporothrix* spp. pela cultura. A técnica de biologia molecular demonstrou sensibilidade de 96,72% e especificidade foi 100% quando testada em 25 amostras de pacientes com outras micoses, representando uma boa ferramenta para o diagnóstico da esporotricose humana (83).

O estudo feito por Zhang *et al.* (2019), desenvolveu um ensaio baseado em sequências do gene da calmodulina (CAL), o objetivo principal foi avaliar a PCR multiplex em tempo real para identificação do *Sporothrix* spp. Foram analisadas 33 amostras de biópsias, comparando-se os métodos de PCR multiplex em tempo real, da PCR convencional e da cultura. Os resultados demonstraram que a PCR multiplex em tempo real apresentou uma taxa de

detecção de 93,9% (31/33) para *Sporothrix globosa*, enquanto a cultura identificou o fungo em 87,9% (29/33) das amostras. Não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois métodos ($p = 0,4142$). Por outro lado, a PCR convencional obteve apenas 39,4% (13/33) de identificação, sendo observada uma diferença estatística significativa em relação à PCR multiplex ($p < 0,0001$) (6). Esses achados indicam que a PCR multiplex em tempo real é uma ferramenta eficaz e promissora para a identificação do fungo, apresentando desempenho superior à PCR convencional e equivalência estatística ao método de cultura.

No estado do Amazonas, especialmente em Manaus e regiões adjacentes, a esporotricose humana apresenta crescimento contínuo, o que reforça a necessidade de ampliar estudos regionais voltados à investigação epidemiológica e ao desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos, acessíveis e aplicáveis à rotina dos serviços de saúde. A incorporação de técnicas moleculares nos laboratórios de referência, aliada ao desenvolvimento de testes imunocromatográficos de triagem, pode representar um avanço significativo na detecção precoce da doença, reduzindo o tempo entre o início dos sintomas e o tratamento adequado.

Sob a perspectiva das políticas públicas, a integração entre diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica é fundamental para minimizar e controlar a esporotricose no Amazonas. Estratégias que incluem a capacitação de profissionais de saúde, a descentralização do diagnóstico, o monitoramento de casos humanos e animais e ações educativas direcionadas à população são essenciais para conter a expansão da doença.

7 PRODUTO

O Produto foi a realização de um POP (Procedimento Operacional Padrão) integrando coleta, extração e qPCR a partir do exsudato da lesão (Anexo 3). Dessa maneira, essa ferramenta de apoio ao diagnóstico clínico poderá ser implantada na FUHAM, auxiliando no diagnóstico diferencial com outras dermatoses semelhantes.

8 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a otimização da coleta de exsudato de lesões cutâneas influencia diretamente o rendimento de DNA, com aumento progressivo da concentração à medida que se eleva o número de coletas e se incorpora o uso de esferas de vidro, evidenciando a importância da etapa pré-analítica no desempenho do diagnóstico molecular.

A qPCR apresentou um desempenho bom, com alta especificidade e valor preditivo positivo, embora tenha demonstrado sensibilidade baixa quando comparada à cultura. A cultura, por sua vez, manteve melhor desempenho, com maior sensibilidade e acurácia, reforçando seu papel como método de referência. A concordância moderada entre os métodos (índice kappa = 0,48) evidencia que a qPCR isoladamente não se apresenta como método de diagnóstico laboratorial ideal, devido à sua baixa sensibilidade, ela pode ser aplicada de forma complementar à cultura micológica e histopatologia, fortalecendo o diagnóstico diferencial e auxiliando no manejo clínico e epidemiológico da doença.

A identificação molecular revelou predominância de *Sporothrix brasiliensis* entre os casos analisados, reforçando o papel dessa espécie como principal agente etiológico no município, e destacando sua relevância no cenário epidemiológico atual.

Em uma região como o Amazonas, marcada por surtos de grande magnitude, torna-se essencial dispor de métodos diagnósticos que sejam ao mesmo tempo rápidos e precisos. A identificação correta da espécie envolvida, particularmente de *S. brasiliensis*, é de importância estratégica, visto que está diretamente associada à maior virulência, transmissibilidade e gravidade clínica.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sil A, Andrianopoulos A. Thermally dimorphic human fungal pathogens—Polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Aug 1;5(8):1–17. doi:10.1101/cshperspect.a019794 PubMed PMID: 25384771.
2. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology.* Oxford University Press; 2014. p. 3–14. doi:10.1093/mmy/myu062 PubMed PMID: 25526781.
3. Hektoen L, Perkins ADCF. REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESES CAUSED BY SCHENCKII. A NEW PATHOGENIC FUNGUS. ~. 1900.
4. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia.* Springer Science and Business Media B.V.; 2020. p. 813–42. doi:10.1007/s11046-020-00425-0 PubMed PMID: 32052359.
5. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3198–206. doi:10.1128/JCM.00808-07 PubMed PMID: 17687013.
6. Zhang M, Li F, Li R, Gong J, Zhao F. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Feb 1;13(2). doi:10.1371/journal.pntd.0007219 PubMed PMID: 30817761.
7. Nava-Pérez N, Neri-García LG, Romero-González OE, García-Carnero LC, Mora-Montes HM, Terrones-Cruz JA. Biological and Clinical Attributes of *Sporothrix globosa*, a Causative Agent of Sporotrichosis. *Infection and Drug Resistance.* Dove Medical Press Ltd; 2022. p. 2067–90. doi:10.2147/IDR.S362099
8. Lozoya-Pérez NE, Clavijo-Giraldo DM, Martínez-Duncker I, García-Carnero LC, López-Ramírez LA, Niño-Vega GA, et al. Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *sporothrix schenckii*, *sporothrix brasiliensis*, and *sporothrix globosa*. *Journal of Fungi.* 2020 Dec 1;6(4):1–21. doi:10.3390/jof6040323
9. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens.* Public Library of Science; 2017. doi:10.1371/journal.ppat.1006077 PubMed PMID: 28103311.
10. Rodrigues AM, De Hoog S, De Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol.* 2013;51(4):405–12. doi:10.3109/13693786.2012.719648 PubMed PMID: 22989196.
11. Fernandes B, Caligiorne RB, da Silva TAM, Campolina MM, La Santrer ERR, Santiago IF, et al. Exploring Virulence Factores and Antifungal Susceptibility in *Sporothrix* Isolates: A Comparative Study between Feline and Human Hosts [Internet]. 2024. Available from: <https://www.preprints.org/manuscript/202405.1151/v1> doi:10.20944/preprints202405.1151.v1

12. Teixeira MM, de Almeida LGP, Kubitschek-Barreira P, Alves FL, Kioshima ÉS, Abadio AKR, et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. BMC Genomics. 2014;15(1). doi:10.1186/1471-2164-15-943 PubMed PMID: 25351875.
13. Schenck BR. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. Vol. 9. 1898;9:286–90.
14. Medica [S A. Sporotrichosis Among Miner on the Witwatersrand Gold Mines. 1917.
15. Dixon, DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, et al. Isolation and Characterization of *Sporothrix schenckii* from Clinical and Environmental Sources Associated with the Largest U.S. Epidemic of Sporotrichosis. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1991.
16. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 2015 Dec 1;35(1):1–20. doi:10.3767/003158515X687416 PubMed PMID: 26823625.
17. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2013 Mar;27(3):313–8. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x PubMed PMID: 22176524.
18. Rosa JVM, Quaresma JAS. Sporotrichosis: an overview of the neglected disease reported worldwide in the last five years. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2025. doi:10.1590/0037-8682-0211-2025 PubMed PMID: 41417506.
19. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2013 Mar;27(3):313–8. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x PubMed PMID: 22176524.
20. Morgado DS, Castro R, Ribeiro-Alves M, Corrêa-Moreira D, Silva JCA de L e., Menezes RC, et al. Systematic review of literature to evaluate global distribution of species of the *Sporothrix* genus stored in culture collections. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media SA; 2024. doi:10.3389/fcimb.2024.1382508 PubMed PMID: 38828263.
21. Sendrasoa FA, Ratovonjanahary VT, Ranaivo IM, Tahinamandranto R, Rakotoarisaona MF, Andrianarison M, et al. Epidemiological and clinical aspects of sporotrichosis in patients seen at a reference hospital in Madagascar. PLoS Negl Trop Dis. 2023 Jul 1;17(7 July). doi:10.1371/journal.pntd.0011478 PubMed PMID: 37494410.
22. Govender NP, Maphanga TG, Zulu TG, Patel J, Walaza S, Jacobs C, et al. An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 25;9(9). doi:10.1371/journal.pntd.0004096 PubMed PMID: 26407300.
23. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. 2007. p. 1255–65. doi:10.1086/522765 PubMed PMID: 17968818.

24. Flórez-Muñoz S V., Alzate JF, Mesa-Arango AC. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of *Sporothrix schenckii* Complex in Medellin, Colombia. *Mycopathologia*. 2019 Feb 15;184(1):53–63. doi:10.1007/s11046-018-0310-5 PubMed PMID: 30554299.
25. Camacho E, León-Navarro I, Rodríguez-Brito S, Mendoza M, Niño-Vega GA. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC Infect Dis*. 2015 Dec 12;15(1). doi:10.1186/s12879-015-0839-6 PubMed PMID: 25880588.
26. Ramírez-Soto MC, Aguilar-Ancori EG, Quispe-Ricalde MA, Muñiz-Duran JG, Quispe-Florez MM, Chinen A. Molecular identification of *Sporothrix* species in a hyperendemic area in Peru. *J Infect Public Health*. 2021 May 1;14(5):670–3. doi:10.1016/j.jiph.2021.02.005 PubMed PMID: 33865058.
27. Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: Description of an Area of Hyperendemicity. *Clinical Infectious Diseases*. 2000.
28. Etchecopaz A, Toscanini MA, Gisbert A, Mas J, Scarpa M, Iovannitti CA, et al. *Sporothrix brasiliensis*: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. *Journal of Fungi*. MDPI AG; 2021. p. 1–33. doi:10.3390/jof7030170
29. de Lima Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011. p. 354–633. doi:10.1128/CMR.00007-11 PubMed PMID: 21976602.
30. Rodrigues AM, De Hoog G, Zhang Y, De Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect*. 2014 May 7;3. doi:10.1038/emi.2014.33
31. Silva MBT da. et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. 2012.
32. Bittencourt AA, Oyafuso LKM, Cavalin RF, Palhares RB, Benard G, Gimenes VMF, et al. A neglected disease. Human sporotrichosis in a densely populated urban area in São Paulo, Brazil: clinical–epidemiological and therapeutic aspects. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022 Jun 1;53(2):739–48. doi:10.1007/s42770-022-00713-5 PubMed PMID: 35301695.
33. Poester VR, Mattei AS, Madrid IM, Pereira JTB, Klafke GB, Sanchotene KO, et al. Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses Public Health*. 2018 Nov 1;65(7):815–21. doi:10.1111/zph.12504 PubMed PMID: 30009528.
34. Sanchotene KO, Madrid IM, Klafke GB, Bergamashi M, Terra PP Della, Rodrigues AM, et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*. 2015 Nov 1;58(11):652–8. doi:10.1111/myc.12414 PubMed PMID: 26404561.
35. Marques-Melo EH, Lessa DF da S, Nunes ACBT, Chaves KP, Porto WJN, Notomi MK, et al. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas. *Revista Baiana Saúde Pública*. 2014 Jun 1;38(2):490–8. doi:10.5327/Z0100-0233-2014380200018
36. Silva CE, Valeriano CAT, Ferraz CE, Neves RP, Oliveira MME, Silva JCAL, et al. Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. *Future*

- Microbiol. 2021 Dec 1;16(18):1371–9. doi:10.2217/fmb-2021-0142 PubMed PMID: 34812048.
37. de Oliveira Bento A, de Sena Costa AS, Lima SL, Do Monte Alves M, de Azevedo Melo AS, Rodrigues AM, et al. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Aug 1;15(8). doi:10.1371/journal.pntd.0009693 PubMed PMID: 34460830.
 38. Da FB, Neto S. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL ESPOROTRICOSE HUMANA NA PARAÍBA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA, IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA E SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DO CLADO PATOGENICO *Sporothrix* RECIFE 2022. 2022.
 39. Pinto França HE, Christynne K, Da Silva T, Da Silva KE, Rodrigues De Sousa B, Belém J, et al. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA ESPOROTRICOSE HUMANA NO NORDESTE BRASILEIRO. Vol. 8.
 40. Oliveira MME, Almeida-Paes R, Corrêa-Moreira D, Borba CDM, Menezes RC, Freitas DFS, et al. A case of sporotrichosis caused by different *Sporothrix brasiliensis* strains: Mycological, molecular, and virulence analyses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019 Sep 1;114(9). doi:10.1590/0074-02760190260 PubMed PMID: 31644705.
 41. Mesquita VA, Talhari S, Leturiondo AL, de Souza GC, de Brito EM, de Andrade SL, et al. Zoonotic Sporotrichosis outbreak: Emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024 Jul 1;18(7). doi:10.1371/journal.pntd.0012328 PubMed PMID: 39038043.
 42. de Souza GC, de Brito EM, de Lima Fernandes DC, Frota MZM, de Araújo Santos FJ, de Oliveira Ferreira C, et al. *Sporothrix brasiliensis* as the major causative species of the zoonotic outbreak of human sporotrichosis in the Brazilian Amazon. *Tropical Medicine and International Health*. 2025 Jan 1;30(1):65–9. doi:10.1111/tmi.14065 PubMed PMID: 39628138.
 43. Portal FVS_RCP_AM_010125_311225_esporotricose.
 44. Bastos De Lima Barros M, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica*. 2010.
 45. Orofino-Costa R, Freitas DFS, Bernardes-Engemann AR, Rodrigues AM, Talhari C, Ferraz CE, et al. Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. *An Bras Dermatol*. 2022 Nov 1;97(6):757–77. doi:10.1016/j.abd.2022.07.001 PubMed PMID: 36155712.
 46. Hay R, Denning DW, Bonifaz A, Queiroz-Telles F, Beer K, Bustamante B, et al. The diagnosis of fungal neglected tropical diseases (fungal NTDs) and the role of investigation and laboratory tests: An expert consensus report. *Trop Med Infect Dis*. 2019;4(4). doi:10.3390/tropicalmed4040122
 47. Oswaldo F, Fundação C, Cruz O. Dez Anos de epidemiologia de Esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. 2005.
 48. Quintella LP, Lambert Passos SR, Francesconi Do Vale AC, Gutierrez Galhardo MC, De Lima Barros MB, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: A series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011 Jan;38(1):25–32. doi:10.1111/j.1600-0560.2010.01626.x PubMed PMID: 20883452.

49. Pereira MA, Freitas RJ, Nascimento SB, Pantaleão L, Vilar EG. Sporotrichosis: A Clinicopathologic Study of 89 Consecutive Cases, Literature Review, and New Insights About Their Differential Diagnosis [Internet]. 2020. Available from: <http://journals.lww.com/amjdermatopathology>
50. Pereira MA, Freitas RJ, Nascimento SB, Pantaleão L, Vilar EG. Sporotrichosis: A Clinicopathologic Study of 89 Consecutive Cases, Literature Review, and New Insights About Their Differential Diagnosis [Internet]. 2020. Available from: <http://journals.lww.com/amjdermatopathology>
51. Orofino-Costa R, Freitas DFS, Bernardes-Engemann AR, Rodrigues AM, Talhari C, Ferraz CE, et al. Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. *An Bras Dermatol*. 2022 Nov 1;97(6):757–77. doi:10.1016/j.abd.2022.07.001 PubMed PMID: 36155712.
52. Liuyu Li, Jiajia Li, Zehu Liu, Xiujiao Xia. The Role of Histopathological Examination in the Diagnosis of Cutaneous Sporotrichosis Caused by *Sporothrix globosa*: A Retrospective Analysis and Reassessment. *Mycoses- Diagnosis Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*. 2025.
53. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Aoki T, Ariyawansa HA, et al. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*. *Nature Research*; 2021. p. 540–8. doi:10.1038/s41564-021-00888-x PubMed PMID: 33903746.
54. Rodrigues AM, Gonçalves SS, de Carvalho JA, Borba-Santos LP, Rozental S, Camargo ZP de. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. *Journal of Fungi*. MDPI; 2022. doi:10.3390/jof8080776 PubMed PMID: 35893145.
55. Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *MYCOSES*. 2001.
56. Della Terra PP, Gonsales FF, de Carvalho JA, Hagen F, Kano R, Bonifaz A, et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. *Transbound Emerg Dis*. 2022 Jul 1;69(4):e704–16. doi:10.1111/tbed.14350 PubMed PMID: 34687495.
57. Oliveira MME, Franco-Duarte R, Romeo O, Pais C, Criseo G, Sampaio P, et al. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. *FEMS Microbiol Lett*. 2015 Mar 1;362(6). doi:10.1093/femsle/fnv027
58. Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol*. 2014 Jan;31(1):2–6. doi:10.1016/j.riam.2013.09.008
59. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Dec 1;9(12):e0004190. doi:10.1371/journal.pntd.0004190
60. Rodrigues AM, Najafzadeh MJ, de Hoog GS, de Camargo ZP. Rapid Identification of Emerging Human-Pathogenic *Sporothrix* Species with Rolling Circle Amplification. *Front Microbiol*. 2015 Dec 8;6. doi:10.3389/fmicb.2015.01385
61. Landis JR, Koch GG. This content downloaded from 128.230.234.162 on Fri. Vol. 33. 1977.

62. Almeida-Paes R, De Oliveira LC, Oliveira MME, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the sporothrix complex. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/212308 PubMed PMID: 25961005.
63. Schubach A, Maria T, Schubach P, Bastos De Lima Barros M, Wanke B. Cat-transmitted Sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil [Internet]. 2005. Available from: <http://www.msu.edu/>
64. Camacho E, León-Navarro I, Rodríguez-Brito S, Mendoza M, Niño-Vega GA. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC Infect Dis.* 2015 Dec 12;15(1). doi:10.1186/s12879-015-0839-6 PubMed PMID: 25880588.
65. Fichman V, Almeida-Silva F, Francis Saraiva Freitas D, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC, Almeida-Paes R. Severe Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*: Antifungal Susceptibility and Clinical Outcomes. *Journal of Fungi.* 2023 Jan 1;9(1). doi:10.3390/jof9010049
66. Caus ALO, Zanotti RL, Faccini-Martínez AA, Paterlini GV, Falqueto A. Epidemiological and clinical aspects of sporotrichosis in Espírito Santo State, southeast Brazil: A study of three decades (1982–2012). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2019. p. 706–13. doi:10.4269/ajtmh.18-0667 PubMed PMID: 30594269.
67. Governo do Estado do Amazonas Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SES-AM) Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas - Dra. Rosemary Costa Pinto (FVS-RCP). BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [Internet]. 2023. Available from: www.fvs.am.gov.br
68. Valente RM, de Melo Verçosa JV, de Souza ER, Gordiano NP, do Carmo Barroso L, da Silva Carvalho SM, et al. Expansion of human and animal sporotrichosis in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2025;41(5). doi:10.1590/0102-311XEN180024 PubMed PMID: 40608658.
69. Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Sep 1;8(9). doi:10.1371/journal.pntd.0003094 PubMed PMID: 25233227.
70. Gonçalves NV, Miranda C do SC, Souza BC de, Rocha MP do C, Carneiro FRO, Maués MAC, et al. Occurrence of sporotrichosis in Belém, Pará, Brazil: a metaphor for unsustainable socioeconomic development. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2024 Sep 1;28(5). doi:10.1016/j.bjid.2024.103872 PubMed PMID: 39332811.
71. Prohaska-Batista F, Bridi Cavassin F, de Queiroz-Telles F. From neglected to notable: A growing public health challenge driven by hospitalization for sporotrichosis in Pernambuco, Northeast Brazil (2016-2024). *PLoS Negl Trop Dis.* 2025 Dec 1;19(12):e0013795. doi:10.1371/journal.pntd.0013795 PubMed PMID: 41325457.
72. Almeida-Paes R, Borba-Santos LP, Rozental S, Marco S, Zancopé-Oliveira RM, da Cunha MML. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. *Fungal Biology Reviews.* Elsevier Ltd; 2017. p. 50–9. doi:10.1016/j.fbr.2016.09.001

73. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr 1;55(4):611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797 PubMed PMID: 19246619.
74. Zhang M, Li F, Gong J, Yang X, Zhang J, Zhao F. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction for fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*. *Med Mycol*. 2020 Jan 1;58(1):61–5. doi:10.1093/mmy/myz029 PubMed PMID: 30927430.
75. De Meyer EM, De Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, De Hoog GS, Vismer HF, et al. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*. 2008 Jul;100(4):647–61. doi:10.3852/07-157R PubMed PMID: 18833758.
76. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007 Oct;45(10):3198–206. doi:10.1128/JCM.00808-07 PubMed PMID: 17687013.
77. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017 Sep 1;92(5):606–20. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279 PubMed PMID: 29166494.
78. de Oliveira LC, Almeida-Paes R, Pizzini CV, Gutierrez-Galhardo MC, Freitas DFS, Zancopé-Oliveira RM. Diagnostic performance of mycologic and serologic methods in a cohort of patients with suspected sporotrichosis. *Rev Iberoam Micol*. 2019 Apr 1;36(2):61–5. doi:10.1016/j.riam.2018.09.002 PubMed PMID: 31078386.
79. Maubon D, Garnaud C, Ramarozatovo LS, Fahafahantsoa RR, Cornet M, Rasamoelina T. Molecular Diagnosis of Two Major Implantation Mycoses: Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. *Journal of Fungi*. MDPI; 2022. doi:10.3390/jof8040382
80. Dixon, DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, et al. Isolation and Characterization of *Sporothrix schenckii* from Clinical and Environmental Sources Associated with the Largest U.S. Epidemic of Sporotrichosis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1991.
81. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017 Sep 1;92(5):606–20. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279 PubMed PMID: 29166494.
82. da Silva AG, de Matos AFC, de Sousa BR, Ferraz CE, Luiz RLF, Neves RP, et al. Rapid Molecular Diagnosis of Sporotrichosis Directly from Biological Samples from a Reference Center in Brazil. *Journal of Fungi*. 2024 Jun 1;10(6). doi:10.3390/jof10060432
83. Sturny-Leclère A, Freitas DFS, Ghelfenstein-Ferreira T, Gutierrez-Galhardo MC, Almeida M de A, Rodrigues AM, et al. Development and validation of a new quantitative reverse transcription PCR assay for the diagnosis of human sporotrichosis. *Med Mycol*. 2023 Jul 6;61(7). doi:10.1093/mmy/myad063

ANEXOS

Anexo 1: – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

FUNDAÇÃO ALFREDO DA
MATTÁ - FUAM



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 Leturiondo

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 FUAM, 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 Codajás, nº 24, Sala 14, 1º Andar

Bairro: Cachoeirinha

CEP: 69.065-130

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3632-5872

Fax: (92)3632-5802

E-mail: cep@fuam.am.gov.br

FUNDAÇÃO ALFREDO DA MATTA - FUAM



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 Codajás, nº 24, Sala 14, 1º Andar
Bairro: Cachoeirinha **CEP:** 69.065-130
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3632-5872 **Fax:** (92)3632-5802 **E-mail:** cep@fuam.am.gov.br

FUNDAÇÃO ALFREDO DA
MATTA - FUAM



Continuação do Parecer: 6.230.948

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 as 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 relatorios parciais a cada seis meses e ao final do projeto seja apresentado relatorio final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2137007.pdf	17/07/2023 13:50:19		Aceito

Endereço: Rua Codajás, nº 24, Sala 14, 1º Andar

Bairro: Cachoeirinha

CEP: 69.065-130

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3632-5872

Fax: (92)3632-5802

E-mail: cep@fuam.am.gov.br

**FUNDAÇÃO ALFREDO DA
MATTA - FUAM**



Continuação do Parecer: 6.230.948

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 Codajás, nº 24, Sala 14, 1º Andar
Bairro: Cachoeirinha **CEP:** 69.065-130
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3632-5872 **Fax:** (92)3632-5802 **E-mail:** cep@fuam.am.gov.br

Anexo 2: Termo de Autorização de foto

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE IMAGEM

Eu, _____,
 nacionalidade _____, estado civil _____, portador da Cédula
 de identidade RG nº. _____, inscrito no CPF/MF sob nº
 _____, residente _____ à _____ Av./Rua
 _____, nº. _____, município de
 _____/Amazonas, AUTORIZO o uso da imagem das
 minhas lesões para ser utilizada no estudo intitulado: **"Enfrentando a Esporotricose
 no Amazonas: do Diagnóstico Molecular à Resistência Medicamentosa"** e também
 durante as apresentações em palestras, seminários ou reuniões clínicas. A presente
 autorização é concedida a título gratuito, abrangendo o uso da imagem acima
 mencionada em todo território nacional, das seguintes formas: (I) home page; (II) mídia
 eletrônica (vídeo-tapes, televisão, cinema, entre outros).

Fica ainda **autorizada**, de livre e espontânea vontade, para os mesmos fins, a cessão
 de direitos da veiculação das imagens não recebendo para tanto qualquer tipo de
 remuneração. As imagens das lesões não serão utilizadas com a identificação dos
 pacientes.

Por esta ser a expressão da minha vontade declaro que autorizo o uso acima descrito
 sem que nada haja a ser reclamado a título de direitos conexos à minha imagem ou a
 qualquer outro, e assino a presente autorização em 02 vias de igual teor e forma.

_____, _____ de _____ de _____.

 (Assinatura)

Telefone p/ contato:

Anexo 3 – Procedimento Operacional Padrão de coleta, extração de DNA e qPCR

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA (ESPOROTRICOSE) (KIT DNeasy Blood & Tissue / QIAGEN) EXSUDATO

Coleta da Amostra de Exsudato:

- 01. Antes da coleta verificar as lesões minuciosamente para realizar a coleta, pode ser amostra de exsudato purulento, sanguinolento ou límpido. Pode ser realizado um pool de várias lesões também. (Obs*: O importante é coletar muitas vezes a amostra (Ideal 12 vezes ou mais)).**
- 02. Coletar o exsudato da(s) lesões mais evidentes em microtubo de 1,5 ml, contendo Tampão de Lise Buffer ATL (200µl).**

Reação de Lise Celular:

- 03. Adicionar 20µl de Proteinase K e 3 esferas de vidro (Beads) em seguida vortexar durante 30 segundos;**
- 04. Incubar a 56° C em over night, vortexar de 30 a 30 minutos;**
- 05. Após, fazer um spin e adicionar 200µl de etanol absoluto (100%);**
- 06. Vortexar durante 30 segundos. Após, fazer um spin;**
- 07. Transferir toda a mistura para a coluna de extração QIAGEN acoplada ao tubo coletor;**

Extração de DNA:

- 08. Centrifugar a coluna com o tubo coletor a 8.000 RPM por 2 minutos;**
- 09. Transferir a coluna para um novo tubo coletor e descartar o tubo coletor com seu conteúdo;**
- 10. Adicionar 500µl de Buffer AW1 na coluna;**
- 11. Centrifugar a 8.000 RPM por 1 minuto;**
- 12. Transferir a coluna para um novo tubo coletor e descartar o tubo coletor com seu conteúdo;**
- 13. Adicionar 500µl de Buffer AW2 na coluna;**
- 14. Centrifugar a 13.300 RPM por 4 minutos, para secar completamente a membrana;**
- 15. Descartar o tubo coletor com seu conteúdo;**

Eluição do DNA:

- 16. Transferir a coluna para microtubo de 1,5 ml, estéril e devidamente identificado;**
- 17. Adicionar 50µl de Buffer AE no centro da coluna;**
- 18. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto dentro da cabine;**
- 19. Centrifugar a 8.000 RPM por 2 minutos para eluir o DNA;**

20. Armazenar o DNA extraído a -20°C.

➤ **Etapas para preparar a reação de qPCR**

Preparo do MIX:

1. Ligar a capela (DNA workstation) e deixar na UV por 15 minutos antes do uso;

Atenção:

- Descongelar totalmente todos os reagentes em temperatura ambiente;
 - Vortexar e centrifugar brevemente os reagentes;
2. Adicionar ao microtubo de 1,5 ml os componentes listados no quadro a seguir na ordem em que se encontram:

Reagente	Concentração Estoque	Volume por Reação (µL)	Concentração final na Reação
Master Mix	1X	10	1x
Primer Forward	100 µM	0,6	0,3 µM
Primer Reverse	100 µM	0,6	0,3 µM
Sonda	100 µM	0,4	2 µM
Água ultrapura	-	3,4	-
DNA	-	5	-
Volume Final	-	20	-

3. Após o preparo do mix vortexar por 5s em velocidade média e em seguida fazer um spin;
4. Adicionar 15µl do mix em cada poço da placa (0.1 µl);
5. Transportar a placa contendo a reação para a sala de aplicação de DNA;

Aplicação do DNA na Placa:

6. Manipular o DNA em um local apropriado. **Obs:** É importante que seja uma sala destinada apenas para manusear ácido nucleico;

7. Aplicar 5µl de cada controle (**C+/C-**) nos poços correspondentes do strip (***Obs:O C+ é DNA extraído de uma cultura positiva e o C- água ultrapura;**
8. Adicionar 5µl de cada amostra de DNA Extraído nos poços correspondentes;
9. Selar a placa com plástico apropriada;
10. Transportar a placa para o equipamento onde será realizado a termociclagem;

➤ Condições de Termociclagem:

Estágio	Ciclos	Temperatura	Tempo	Descrição
1	1	50°C	2min	Pré-incubação
2	1	95°C	10min	Ativação da Polimerase e desnaturação
3	40	95°C	15s	Desnaturação
4	40	60°C	1min	Anelamento/Extensão

Anexo 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: "ENFRENTANDO A ESPOROTRICOSE NO AMAZONAS:
DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR À RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA "

Eu, Dr. André Luiz Leturiondo, pesquisador na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, estou convidando você que apresenta lesões na pele suspeitas de Esporotricose, a participar voluntariamente deste estudo. Sua participação na pesquisa irá colaborar para a melhoria do método de diagnóstico laboratorial capaz de identificar o DNA do fungo na sua amostra e se há também resistência medicamentosa ao tratamento tradicional. Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Após aceitar participar desse estudo, você assinará este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e ficará com uma via. Salientando que você terá toda a liberdade para decidir entrar ou não na pesquisa, ou se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo do seu atendimento na Fundação.

É possível que durante a pesquisa precisemos de algumas informações sobre dados de exames laboratoriais que você já fez ou das fotos das lesões. Portanto, pedimos o seu consentimento para utilizar esses resultados de exames em seu prontuário eletrônico e a utilização das fotos das lesões. Em nenhum momento do estudo faremos uma relação desses dados coletados com o seu nome.

A pesquisa será feita exclusivamente pelo pesquisador identificado neste documento ou por um técnico/bolsista membro da equipe do projeto autorizado pelo Coordenador geral Dr. André L. Leturiondo.

RISCOS

Você passará por uma única coleta, que será de um líquido transparente (língua) da lesão ou retirada de um pequeno fragmento, de cerca de 4 milímetro da lesão suspeita, usando anestésico local. É possível que, durante a coleta do fragmento de pele você sinta algum desconforto, relacionado à perfuração da pele para a coleta do fragmento, porém, esse desconforto será minimizado ou desaparece em alguns minutos após a coleta. Caso o desconforto persista, será



Rua Codajás, 24 – Cachoeirinha.
Fone: (92) 3632-5800
Fax: (92) 3632-5802
Manaus - AM CEP 69065-130



CENTRO COLABORADOR
OMS/OPAS.





prontamente atendido por uma equipe multiprofissional composta por médicos, enfermeiros e técnicos. Os seus dados pessoais serão manipulados somente pelos integrantes da pesquisa e serão mantidos em total sigilo.

BENEFÍCIOS

A sua participação neste estudo trará benefícios diretos a você e outros portadores de lesões de difícil diagnóstico clínico pois possibilitará a identificação do DNA do fungo por uma técnica molecular bastante sensível, junto com o teste de resistência medicamentosa. De posse dessas informações, você e seu médico poderão tomar decisões mais corretas em relação a doença ou ao seu tratamento.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS: O pesquisador responsável por este estudo estará disponível para esclarecer dúvidas que você possa ter e dar as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. O pesquisador pode ser encontrado no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta. O participante poderá a qualquer momento entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa/FUHAM para esclarecimentos, sugestões e denúncias pelo telefone 3632-5972, ou comparecer a rua Codajás, nr 24, ou pelo e-mail cep@fuam.am.gov.br (Resolução CNS nr 466 de 2021, item IV.5.d).

CONSENTIMENTO

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordo em participar. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Manaus, ____ de _____ de _____

Assinatura ou impressão datiloscópica do participante da pesquisa

André L. Leturiondo
Pesquisador
Responsável Fone:
99123-7625



Rua Codajás, 24 – Cachoeirinha.
Fone: (92) 3632-5800
Fax: (92) 3632-5802
Manaus - AM CEP 69065-130



CENTRO COLABORADOR
OMS/OPAS.



Anexo 5: Questionário da entrevista



QUESTIONÁRIO DO PROJETO

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR NO APOIO AO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA HANSENIASE COM OUTRAS DERMATOSES DE INTERESSE CLÍNICO.

Nº. _____

Data da entrevista: ____/____/____

DADOS GERAIS:

1. Nome: _____ Prontuário: _____

2. Residência: _____

3. Gênero: Masculino () Feminino () Outro: _____

4. Idade: _____

5. Etnia: Branco: () Pardo: () Negro: () Índio: () Outro(qual): _____

6. Profissão: _____

7. Telefone: () _____

DADOS CLÍNICOS:

1. Já teve lesões semelhantes? Sim () Não (), Quando? _____

2. Forma clínica atual: Cutânea () Mucosa () Linfocutânea () Ocular () Extra- cutânea ()

3. Número de lesões: _____

4. Local da lesão: _____

5. Aspecto da lesão: _____

6. Local de provável infecção: _____

7. Tempo da lesão ativa: _____

8. Faz uso de antifúngico? () Sim, () Não. Se sim, Quais? _____

9. Faz uso de Outros medicamentos? () Sim, () Não. Se sim, Quais? _____

10. É tutor de Animal? () Sim, () Não. Se sim, Quais? _____

11. O animal de estimação apresenta Lesões? () Sim, () Não, Se sim, Quais? _____

DADOS LABORATORIAIS:

1. Cultura : () Positivo () Negativo () Indeterminado

2. Histopatologia: () Positivo () Negativo () Indeterminado

3. PCR : () Positivo () Negativo () Indeterminado

Anexo 6: Short Communication publicado dos dados parciais desta dissertação

Título: *Sporothrix brasiliensis* as the major causative species of the zoonotic outbreak of human sporotrichosis in the Brazilian Amazon

DOI: 10.1111/tmi.14065

SHORT COMMUNICATION

Sporothrix brasiliensis as the major causative species of the zoonotic outbreak of human sporotrichosis in the Brazilian Amazon

Guilherme Caldas de Souza¹ | Euzenio Moreira de Brito¹ |
Débora Cristina de Lima Fernandes² | Maria Zeli Moreira Frota³ |
Felipe Jules de Araújo Santos^{1,2} | Cynthia de Oliveira Ferreira² |
Camila Gurgel dos Santos Silva² | Silvia Rocha Nakajima² |
Silmara Navarro Pennini² | Sinesio Talhari^{1,2} | Valderiza Lourenço Pedrosa^{1,2} |
Marcelo Mira⁴ | Helio Amante Miot⁵ | Carolina Talhari^{1,6} |
André Luiz Leturiondo^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

²Fundação Hospitalar Alfredo da Matta de Dermatologia, Manaus, Amazonas, Brazil

³Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine and Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

⁵Departamento de Dermatologia da FMB-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

⁶Departamento de Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

Correspondence

Carolina Talhari, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.
Email: carolinatalhari@gmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, Grant/Award Number: 010/2021; Programa de Apoio à Formação em Ciências Dermatológicas—PRODERM-RH, Grant/Award Number: 010/2023

Abstract

Background: Sporotrichosis is a neglected tropical disease and the most common subcutaneous mycosis, mainly caused by *Sporothrix* species, particularly *S. brasiliensis*, *S. schenckii* and *S. globosa*, which exhibit varying biological behaviours and virulence. The epidemic of sporotrichosis in Brazil, initiated in Rio de Janeiro in the late 1990s, rapidly spread to other states, including Amazonas in 2021. This study aimed to identify the specific *Sporothrix* species responsible for the human sporotrichosis outbreak in the Brazilian Amazon.

Methods: A cross-sectional study was conducted by enrolling clinically suspected cases of sporotrichosis attended at a reference dermatologic centre, in Manaus (Brazil). Biological material was collected from their skin lesions for culture (Mycosel) and for species identification (qPCR).

Results: *Sporothrix* cultures were obtained from 150 cases. Sporotrichosis predominantly affected females (67.3%), aged 44.5 years on average, with lymphocutaneous lesions (72.7%). *Sporothrix brasiliensis* was identified in 89.3% of patients. Up to 83.3% of these patients reported contact with cats previously to the skin lesion, and the time-spatial progression of the human cases followed the notification of cases in cats, in the metropolitan region of Manaus.

Conclusion: *Sporothrix brasiliensis* is the dominant species in the zoonotic outbreak of human sporotrichosis in the Brazilian Amazon, with cats identified as the primary vectors. Effective sanitary control measures, education and responsible pet ownership are crucial to mitigating zoonotic sporotrichosis' impact in Brazil and preventing its spread to neighbouring Latin American cities.

KEYWORDS

Brazilian Amazon, polymerase chain reaction, *Sporothrix brasiliensis*, sporotrichosis

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a neglected tropical disease caused by fungi of the *Sporothrix* genus, characterised by skin and subcutaneous tissue lesions in humans. These fungi are

Sustainable Development Goal: Good Health and Wellbeing (SDG3)

commonly found in decomposing organic matter, soil and plants. The main risk factors for acquiring sporotrichosis include occupational exposure, residence in endemic areas, contact with infected cats, underlying health conditions (such as diabetes, chronic lung disease and HIV/AIDS) and skin trauma. Sporotrichosis mainly affects the skin, often presenting as ulcers and superficial nodules that may progress to more extensive lymphocutaneous infections. In severe cases, particularly among immunocompromised individuals, the infection can disseminate to the lungs, bones, or other internal organs. The chronic nature of sporotrichosis also imposes economic burdens due to medical expenses, lost workdays and the need for prolonged care [1–3].

Among 53 identified species, *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* and *S. luriei* are clinically significant, with distinct global distributions and transmission modes: sapronotic or zoonotic. *S. schenckii* and *S. globosa* are prevalent in the Americas and Asia, whereas *S. brasiliensis* is primarily found in South America, and transmitted mainly through infected cats and dogs [2–4].

A major sporotrichosis epidemic in Brazil spread rapidly from Rio de Janeiro in the late 1990s [3, 5]. In Amazonas, human cases began in 2020, rising 304% from 2021 to 2022 and 249% from 2022 to 2023 (Figures 1 and 2). The increase in animal cases was 428% and 345%, respectively, in the same period [4]. This exponential growth is alarming due to the high number of affected individuals and limited understanding of circulating species, which vary in pathogenicity [4–6].

Therefore, along with individual precautions like wearing protective clothing when handling plants and avoiding contact with infected animals, collaborative efforts among healthcare providers, veterinarians and public health authorities are crucial for implementing effective control measures to reduce the impact of sporotrichosis.

This study aimed to identify the species responsible for the human sporotrichosis outbreak in the Brazilian Amazon.

MATERIALS AND METHODS

A cross-sectional study was conducted by enrolling clinically suspected cases of sporotrichosis attended at Alfredo da Matta Foundation (AMF) between September 2022 and December 2023, Manaus (Brazil).

The exudate of cutaneous lesions was collected for both culture and molecular testing. Sabouraud agar and mycosel agar were used for culture, while TaqMan Real-Time PCR (qPCR) was used for the identification of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* [7].

Patients with fungal growth observed in the culture (the gold standard) [3, 4] were consecutively included in the study, and molecular testing was subsequently performed. For species identification via qPCR, exudate from cutaneous lesions was initially employed as the clinical

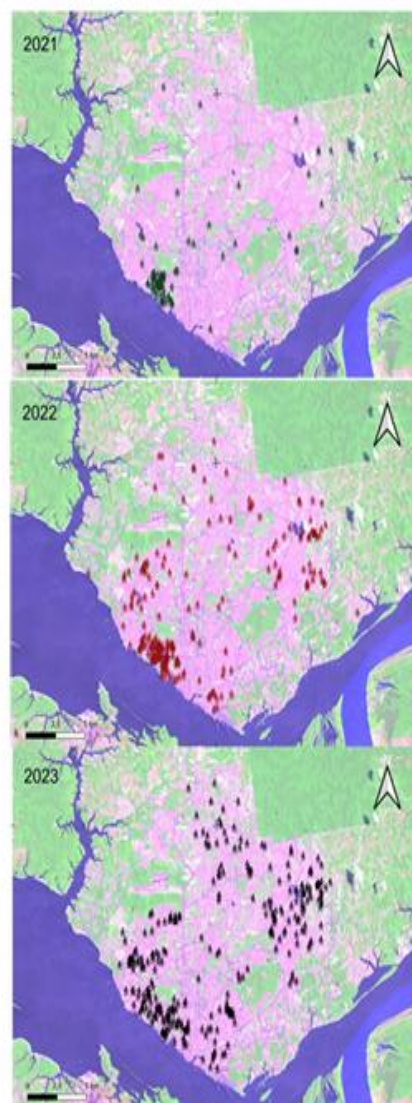


FIGURE 1 Spatial progression of reported human sporotrichosis cases in the metropolitan region of Manaus from 2021 to 2023 (Source: SINAN-NET).

sample. A colony aliquot from the culture medium was utilised when amplification from exudate from cutaneous lesions failed.

This study was approved by the Research Ethics Committee of AMF (no 705066823.9.0000.0002).

RESULTS

Sporothrix cultures were obtained from 150 patients, confirming the diagnosis of all patients. Sporotrichosis was more prevalent among females (67.3%), with a mean age of

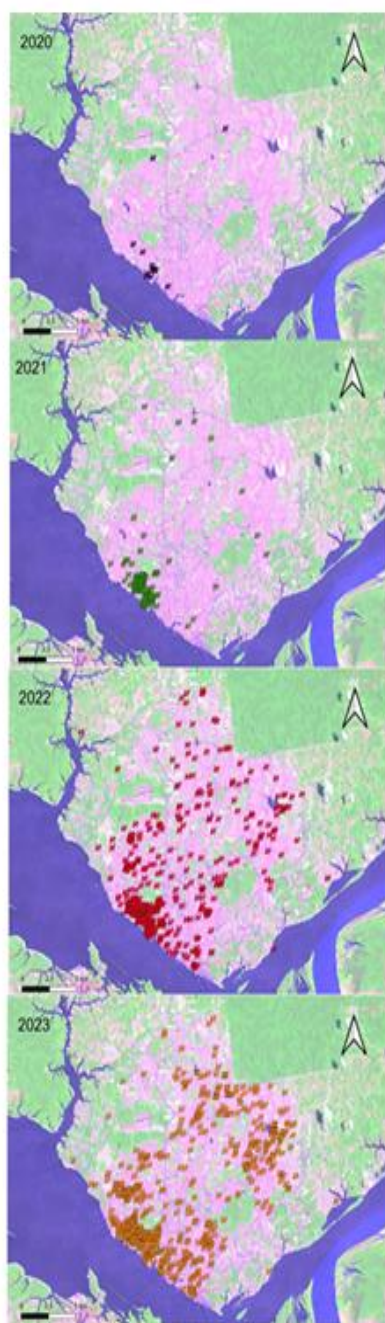


FIGURE 2 Spatial progression of reported sporotrichosis in cats from the metropolitan region of Manaus from 2020 to 2023 (Source: SINAN-NET).

44.5 years, predominantly presenting lymphocutaneous lesions (72.7%), and affecting the upper limbs (55.3%) (Table 1 and Figure 3).

S. brasiliensis was identified in 89.3% (134/150) of the samples (Figure 4), 61.2% (82/134) directly from the exudate of cutaneous lesions and 38.8% (52/134) from the cultures.

TABLE 1 Main clinical and demographic data from the 150 cases of human sporotrichosis from the Amazon outbreak.

Variables	Results
Sex, n (%)	
Female	101
Male	49
Age (in years)	
mean (SD)	44,5
Min-max	18-79
Clinical presentation, n (%)	
Lymphocutaneous	109 (72,7)
Fixed cutaneous	24 (16%)
Mixed	1 (0,7%)
Multiple inoculation	14 (9,3%)
Non-registered	2 (1,3%)
Body site, n (%) ^a	
Upper limb	83 (55,3%)
Lower limb	50 (33,3%)
Trunk	13 (8,6%)
Face	7 (4,7%)
Ocular mucosa	1 (0,7%)
Non-registered	14 (9,3%)
Contact with cats, n (%)	125 (83,3%)
Contact with domestic sick cats	64 (51,2%)
Contact with peri-hold sick cats	23 (15,4%)
Reported cat scratch and/or bite	38 (30,4%)
Molecular testing	
<i>Sporotrix brasiliensis</i>	134 (89,3%)
<i>Sporotrix schenckii</i>	0 (-)
NA	16 (10,7%)

Abbreviation: NA, no amplification for the primers.

^aPatients may exhibit involvement at multiple body sites.



FIGURE 3 Lymphocutaneous human sporotrichosis. Ulcer with infiltrated borders on the finger (local of inoculation—cat bite). This initial ulcer was followed by the development of a secondary ulcer and ascending lymphangitis.



FIGURE 4 Geographical map of the metropolitan region of Manaus, showing the locations where the 134 patients who tested positive for *S. brasiliensis* reside. Each case is represented by a red dot on the map (Source: FUHAM).

Sixteen (11.2%) exudate samples did not amplify for *S. brasiliensis*. Among these, 11 samples were subsequently tested for *S. schenckii*, with negative results. For the remaining five patients who had positive cultures but negative amplification results for *S. brasiliensis*, no additional remaining biological samples were available, thus precluding further qPCR analysis.

Notably, 125 individuals (83.3%) reported having had contact with cats in their medical history, either within the household (83 individuals, 66.4%) or in the surrounding environment (42 individuals, 33.6%). In addition, 87 individuals (66.6%) were aware of sick cats, and 38 (30.4%) reported experiencing cat scratches or bites at the site of their skin lesions.

DISCUSSION

This study indicated *Sporothrix brasiliensis* as the primary species responsible for the sporotrichosis outbreak in the Amazon state. This species is also predominant in the Brazilian Southeast epidemic, indicating its spread across metropolitan regions of the country, including the Northeast and Manaus [2, 6]. In contrast, *S. globosa* is the main species causing sporotrichosis in neighbouring Venezuela [8].

The sequential detection of cases in humans, often preceded by reports of ill cats, suggests that the transmission of sporotrichosis in Amazonas is predominantly zoonotic, with felines playing a pivotal role in its spread, much like in other Brazilian regions [2, 4]. Currently, the epidemiological landscape in Manaus appears to be shifting rapidly, likely driven by exposure to infected cats migrating from other states in Brazil [4–6]. During this early outbreak phase, the pathogen's genetic diversity remains limited, a phenomenon consistent with the founder effect. However, as transmission continues, genetic variability is expected to increase to align

with the diversity of the source population [10], although this expansion has not yet been observed in the Amazon state.

Manaus, with over two million inhabitants, is the largest urban centre in the Amazon and serves as a critical connection point linking Brazil's North Region with neighbouring countries, including Peru, Colombia, Venezuela and several Caribbean nations. The rise in zoonotic sporotrichosis cases in Manaus poses a potential risk for other densely populated cities across these neighbouring countries.

S. brasiliensis displays unique characteristics compared to others, including slower growth at 20°C (soil temperature) but accelerated growth above 36°C (mammalian tissue temperature). These traits facilitate zoonotic transmission, especially in regions affected by urbanisation, deforestation and climate-driven habitat changes [9–11].

Notably, *S. brasiliensis* is associated with increased virulence, leading to more severe clinical presentations than other species. Differences in antifungal susceptibility profiles across species underscore the importance of species-specific identification for tailored treatments [6]. Additionally, molecular diagnostics aid in differentiating sporotrichosis from other endemic dermatoses in the Amazon, such as mycobacteriosis and American tegumentary leishmaniasis, which share clinical features with lymphocutaneous sporotrichosis [3].

The rising incidence of sporotrichosis reflects a significant public health challenge in Amazonas and across various Brazilian states, highlighting the need for integrated approaches to safeguard human and animal health, especially in the face of insufficient sanitary control measures and climate impacts [6]. Environmental degradation, particularly the deforestation of crucial Brazilian biomes like the cerrado, the Atlantic Forest and the Amazon rainforest, has exacerbated global temperature increases, severe flooding and storms, which are linked to the emergence of zoonotic diseases [10, 11].

This study faces some limitations, including a potential selection bias from focusing solely on patients suspected of sporotrichosis, possibly excluding severe cases or hospitalised patients. Furthermore, the 16 (10.6%) samples that failed to amplify for *S. brasiliensis* and *S. schenckii* may represent other *Sporothrix* species.

CONCLUSION

Sporothrix brasiliensis is the dominant species in the zoonotic outbreak of human sporotrichosis in the Brazilian Amazon, with cats identified as the primary vector. Effective sanitary control measures, education and responsible pet ownership are crucial to mitigating zoonotic sporotrichosis' impact in Brazil and preventing its spread to neighbouring Latin American cities.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the patients who participated in the study and FAPEAM which supported the project.

FUNDING INFORMATION

This study was supported by FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, Brazil) through “Investigação molecular no apoio ao diagnóstico diferencial da hanseníase com outras dermatoses de interesse clínico” (grant #010/2021) and “Programa de Apoio à Formação em Ciências Dermatológicas—PRODERM-RH” (grant #010/2023). HAM and MTM are PVN-II Research Fellows from FAPEAM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Raw data of this study is available under contact with the corresponding author.

ORCID

Guilherme Caldas de Souza  <https://orcid.org/0009-0009-3538-0748>

Euzenio Moreira de Brito  <https://orcid.org/0009-0002-0602-9384>

Débora Cristina de Lima Fernandes  <https://orcid.org/0000-0002-7336-5786>

Maria Zeli Moreira Frota  <https://orcid.org/0000-0002-1511-3302>

Felipe Jules de Araújo Santos  <https://orcid.org/0000-0002-2585-5393>

Cynthia de Oliveira Ferreira  <https://orcid.org/0000-0003-3069-2434>

Camila Gurgel dos Santos Silva  <https://orcid.org/0000-0001-8528-4628>

Silmara Navarro Pennini  <https://orcid.org/0000-0001-8102-3885>

Sinesio Talhari  <https://orcid.org/0000-0001-9753-6706>

Valderiza Lourenço Pedrosa  <https://orcid.org/0000-0002-9169-6116>

Marcelo Mira  <https://orcid.org/0000-0002-8087-9400>

Helio Amante Miot  <https://orcid.org/0000-0002-2596-9294>

Carolina Talhari  <https://orcid.org/0000-0003-2283-069X>

André Luiz Leturiondo  <https://orcid.org/0000-0002-7202-5579>

REFERENCES

- Ramírez-Soto MC, Aguilar-Ancori EG, Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(3):95.
- Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*. 2020;185(5):813–42.
- Orofino-Costa R, Freitas DFS, Bernardes-Engemann AR, Rodrigues AM, Talhari C, Ferraz CE, et al. Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. *An Bras Dermatol*. 2022; 97(6):757–77.
- Mesquita VA, Talhari S, Leturiondo AL, de Souza GC, de Brito EM, de Andrade SL, et al. Zoonotic sporotrichosis outbreak: emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024;18(7):e0012328.
- Colombo SA, de Carvalho JA, Bicalho GC, de Magalhães Soares DF, de Oliveira CSF, Tavares GC, et al. The emergence of new *Sporothrix brasiliensis* genotypes in current epidemic of sporotrichosis in South-eastern Brazil. *Mycoses*. 2024;67(9):e13792.
- Rodrigues AM, Gonçalves SS, de Carvalho JA, Borba-Santos LP, Rozental S, Camargo ZP. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. *J Fungi*. 2022;8(8):776.
- Della Terra PP, Gonsales FF, de Carvalho JA, Hagen F, Kano R, Bonifaz A, et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. *Transbound Emerg Dis*. 2022;69(4):e704–16.
- Camacho E, León-Navarro I, Rodríguez-Brito S, Mendoza M, Niño-Vega GA. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC Infect Dis*. 2015;15:94.
- de Carvalho JA, Beale MA, Hagen F, Fisher MC, Kano R, Bonifaz A, et al. Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. *Stud Mycol*. 2021;100:100129.
- Ilwanger JH, Kulmann-Leal B, Kaminski VL, Valverde-Villegas JM, Da Veiga ABG, Spilki FR, et al. Beyond diversity loss and climate change: impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. *An Acad Bras Cienc*. 2020;92(1):e20191375.
- Junior VH, Mendes AL, Talhari CC, Miot HA. Impact of environmental changes on dermatology. *An Bras Dermatol*. 2021;96(2):210–23.

How to cite this article: de Souza GC, de Brito EM, de Lima Fernandes DC, Frota MZM, de Araújo Santos FJ, de Oliveira Ferreira C, et al. *Sporothrix brasiliensis* as the major causative species of the zoonotic outbreak of human sporotrichosis in the Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health*. 2024. <https://doi.org/10.1111/tmi.14065>