



IDENTIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *SPOROTHRIX* SPP. ISOLADOS DE REGIÃO ENDÊMICA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

MARCELA BRANDÃO COSTA¹; MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL²;
MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA³; FABRICIO ROCHEDO
CONCEIÇÃO⁴; ANGELITA DOS REIS GOMES⁵; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - marcelabc@hotmail.com.br

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul - marciaripoll@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - marcosferreiravet@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - angelitagomes@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - renataosoriovet@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de caráter zoonótico causada por espécies patogênicas do Complexo *Sporothrix* (QUEIROZ, et al., 2011). Contudo, a maioria das 51 espécies incluídas no gênero *Sporothrix* (ordem Ophiostomatales) são fungos ambientais não patogênicos, que estão intimamente relacionados com a madeira, as plantas e o solo em decomposição (Rodrigues et al., 2013).

Atualmente o complexo *Sporothrix schenckii* compreende sete espécies crípticas: *Sporothrix schenckii*; *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida* (anteriormente *S. albicans*) (Marimon et al., 2006), *S. luriei* e *S. chilensis* que raramente são associados à esporotricose em humanos, embora tenham potencial patogênico (Marimon et al., 2008; Oliveira et al., 2014; Rodrigues et al., 2016) assim como *S. pallida* (Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017). Das espécies do complexo *S. schenckii* e *S. brasiliensis* são considerados altamente virulentos, principalmente *S. brasiliensis* muito provavelmente pela maior expressão de melanina, urease e proteases que *S. Schenckii* (Almeida-Paes et al., 2015).

Dentre os fatores de virulência de *Sporothrix* sp, envolvidos na virulência e evasão ao sistema imune, temos: a secreção de fatores tóxicos por vesículas extracelulares (ALBUQUERQUE et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; O'MEARA et al., 2015), adesão, dimorfismo térmico, termotolerância e produção de melanina (BARROS et al., 2011).

No Brasil, estudos moleculares demonstram que as espécies de maior circulação são *S. brasiliensis*, que tem no gato seu principal hospedeiro e transmissor, na forma zoonótica, da doença, e *S. schenckii* amplamente associado ao ambiente e sapronoses (RODRIGUES, et al., 2016). Contudo, é sabido que todas as espécies já foram identificadas no país (Rodrigues et al., 2014 ; Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2013).

Nesse contexto, o presente trabalho visa dar respostas acerca da principal espécie de *Sporothrix* circulante no Sul do país, a segunda área com maior número de casos diagnosticados de esporotricose animal no Brasil.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados isolados clínicos de *Sporothrix* sp armazenados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, isoladas de casos de esporotricose em felinos (n= 50), naturalmente infectados e provenientes de diversos municípios da região sudeste do estado do Rio Grande do Sul.

O DNA genômico dos isolados de *Sporothrix* spp. foi extraído através técnica adaptada in house utilizando Breaking buffer, Fenol: Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1) e pérolas de vidro. Os locus calmodulina (CAL) (O'Donnell et al. 2000; Irinyi et al. 2015) e espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA (Zhou et al. 2014) foram amplificados utilizando primers degenerados de CAL - CL1. Os produtos da amplificação foram purificados por Kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O DNA foi quantificado pelo método fluorimétrico em espectrofotômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Os fragmentos de DNA foram analisados em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A montagem das sequências foi realizada através do software Vector NTI (Vector NTI, InforMax, Inc, USA). As sequencias foram analisadas através da plataforma BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e depositadas no GenBank.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados foram identificados como *Sporothrix brasiliensis*, corroborando a prevalência encontrada em estudos anteriores, que utilizaram isolados de várias regiões do país (RODRIGUES et al., 2013, 2014; PEREIRA et al., 2014), assim como estudos específicos da região sul do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 2011, SANCHOTENE et al., 2015). Nas regiões nordeste e sudeste as quatro espécies predominantes são: *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. mexicana* e a região centro-oeste restringe-se a três espécies: *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*. Enquanto que na região sul apenas duas espécies foram detectadas (*S. brasiliensis* e *S. schenckii*) e na região Norte as três cepas isoladas foram classificadas como *S. schenckii* (RODRIGUES et al., 2013).

O achado de *S. brasiliensis* como espécie circulante nos casos de infecções em felinos na região Sul, reforça a teoria de RODRIGUES (2013), que afirma que os gatos representam o principal hospedeiro e a principal fonte de infecções humanas por *S. brasiliensis* no Brasil e não por *S. schenckii*, como se pensava anteriormente.

S. brasiliensis é a espécie mais virulenta do complexo *S. schenckii* (FERNANDES et al., 2013) no que se refere à mortalidade e ao dano tecidual, (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; ISHIDA et al., 2015). Esse achado em termos clínicos pode explicar as graves lesões, altamente inflamatórias encontradas nos casos em felinos, assim como o alto número de óbitos relacionado a esporotricose felina.

Ainda do ponto de vista clínico-terapêutico, pode ser feita uma correlação entre a espécie fúngica com casos refratários ao tratamento, uma vez que *S. brasiliensis* tem demonstrado uma menor suscetibilidade à fármacos e outros compostos de bioprospecção (RODRIGUES et al., 2014; WALLER et al., 2017a; WALLER et al., 2017b; STOPIGLIA et al., 2014).

O crescente número de casos de esporotricose, especialmente no Sul e Sudeste do Brasil (MADRI et al., 2012; XAVIER et al., 2013) alerta para a necessidade de políticas públicas para o controle dessa enfermidade. Nesse aspecto, a identificação da espécie fúngica também é de suma importância, uma vez que *S. brasiliensis* é altamente correlacionado à transmissão por gatos, significando que políticas públicas para o controle da epidemia devam ser amplamente voltadas aos serviços públicos de veterinária e no tratamento dos gatos, na indisponibilidade de medicamento gratuito (Barros et al., 2010) e a educação sanitária da população sobre o assunto.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se a partir desse estudo preliminar que *Sporothrix brasiliensis* é a espécie fúngica circulante e responsável pelos casos de esporotricose felina na região Sul do Rio Grande do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P.C.; Nakayasu, E.S.; Rodrigues, M.L.; Frases, S.; Casadevall, A.; Zancope-Oliveira, R.M.; Almeida, I.C.; Nosanchuk, J.D. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cellular Microbiology**, v.10, n.8, p.1695-1710, 2008.

ALMEIDA-PAES R, de Oliveira LC, Oliveira MM, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancope,Â; Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **Biomed Res Int**. Apr;212308, 2015.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; Capilla, J.; Mayayo, E.; Marimon, R.; Mariné, M.; Gené, J.; Cano, J.; Guarro, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology Infection**, v.15, n.7, p.651-655, 2009.

BARROS, M.B.L.; Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Rev Panam Salud Publica**. 27(6):455–60, 2010.

BARROS, M.B.D.L.; ALmeida Paes, R.; Schubach, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.4, p.633–654, 2011.

BONIFAZ, A.; Tirado-Sánchez, A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. 3(1), 6, **Journal of Fungi**, 2017.

FERNANDES, G.F.; Dos Santos, P.O.; Rodrigues, A.M.; Sazaki, A.A.; Burger, E.; De Camargo, Z.P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v.4, p.241–249, 2013.

IRINYI L.; Serena C.; Garcia-Hermoso D. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database -the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Medical Mycology** 53(4): 313–337, 2015.

ISHIDA, K.; DE Castro, R.A.; Dos Santos, L.P.; Quintella, L.P.; Lopes-Bezerra, L.M.; Rozental, S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v.53, n.1, p.34–41, 2015.

MARIMON, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazera, M. & Guarro, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **J Clin Microbiol** 44, 3251–3256, 2006.

MARIMON, R., C. Serena, J. Gené, J. Cano, and J. Guarro. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 52:732–734, 2008.

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



OLIVEIRA, M. M. E., Almeida-Paes, R., Gutierrez-Galhardo, M. C. & Zancoppe-Oliveira, R. M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Rev Iberoam Micol** 31, 2–6, 2014.

PEREIRA, S.A.; Gremião, I.D.; Kitada, A.A.; Boechat, J.S.; Viana, P.G.; Schubach, T.M. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n.3, p.392–393, 2014.

O'Donnell K. Molecular Phylogeny of the *Nectria haematococca*-*Fusarium solani* Species Complex. **Mycologia** 92:919–938, 2000. PEREIRA, S A.; Gremiao, I.D, Kitada, A. A, Boechat, J.S, Viana, P. G, Schubach T. M. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47: p. 392, 2014.

O'MEARA, T.R.; Veri, A.O.; Ketela, T.; Jiang, B.; Roemer, T.; Cowen, L.E. Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. **Nature Community**, v.6, p.6741, 2015.

QUEIROZ, T. F.; Nucci, M.; Colombo, A.L.; Tobon, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med Mycol**, v. 49, p. 225–236, 2011.

RODRIGUES, M.L.; Nimrichter, L.; Oliveira, D.L.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? **Lipid Insights**, v.2, p. 27-40, 2008.

RODRIGUES, A. M.; de Melo Teixeira, M, de Hoog, G.S et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis**, v7: p. 2281, 2013.

RODRIGUES, A.M., de Hoog GS, de Cassia Pires D, Brihante RSN, da Costa Sidrim JJ, Gadelha MF, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infect Dis**. 14(1):219, 2014

RODRIGUES, A. M.; Hoog, G. S.; Camargo, Z.; P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 7, p.1-7, 2016.

SANCHOTENE, K. O., Madrid, I. M., Klafke, G. B., Bergamashi, M., Terra, P. P. D., Rodrigues, A. M., Xavier, M. O. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015. doi:10.1111/myc.12414

STOPIGLIA, C.D.O., et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Med Mycol**. v. 52, p. 56-64, 2014.

WALLER, S.B., et al. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, 2017a.

WALLER, S.B., et al. Polar *Origanum vulgare* (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 031, p. 1-10, 2017b.

XAVIER, M.O, Bittencourt, L.R, Silva, C.M, Vieira, R.S, Pereira, H.C. Atypical presentation of sporotrichosis: report of three cases. **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 46, p. 116–18, 2013.