

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LAURANNE ALVES SALVATO

**NOVO ANTÍGENO PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTES
DIAGNÓSTICOS DA ESPOROTRICOSE FELINA**

Belo Horizonte

2022

LAURANNE ALVES SALVATO

**NOVO ANTÍGENO PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTES
DIAGNÓSTICOS DA ESPOROTRICOSE FELINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Moura Keller.

Coorientadores:

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dr. João Luís Reis Cunha

Belo Horizonte

2022

S182n

Salvato, Lauranne Alves, 1990 -

Novo Antígeno para o desenvolvimento de testes diagnósticos da Esporotricose felina / Lauranne Alves Salvato. – 2022.
99 f.il

Orientadora: Kelly Moura Keller

Coorientadores: Ricardo Toshio Fujiwara

João Luis Reis Cunha

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Bibliografias: f. 75 a 96

Anexos: f. 97 a 99.

1. Gato - Doenças - Teses - 2. Saúde Pública - Teses - 3. Zoonoses - Teses - I. Keller, Kelly Moura - II. Fujiwara, Ricardo Toshio - III. Cunha, João Luis Reis - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.808 96

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAURANNE ALVES SALVATO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 12 de agosto de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Kelly Moura Keller- Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Águida Aparecida de Oliveira

Dr.(a). Elisabeth Martins da Silva da Rocha

Dr.(a). Danielle Ferreira de Magalhaes Soares

Dr.(a). Camila de Valgas Bastos e Castro



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Moura Keller, Professora do Magistério Superior**, em 13/08/2022, às 05:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila de Valgas e Bastos Castro, Professora do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Águida Aparecida de Oliveira, Usuário Externo**, em 16/08/2022, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Martins da Silva da Rocha, Usuária Externa**, em 18/08/2022, às 12:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Ferreira de Magalhaes Soares, Professora do Magistério Superior**, em 22/08/2022, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1676878** e o código CRC **B724FBB8**.

Dedico a minha vó Egleé, que acompanhou minha jornada desde o início até aqui, desde quando existia apenas o sonho de ser veterinária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção concedida todo dia a mim e a minha família.

À minha mãe Aglaê, meu pai Sérgio e minha irmã Louise, por todo carinho, amor incondicional, pelo apoio, conversas e conselhos, vocês são meu porto seguro e minha base.

À minha vó Egleé, pelo exemplo de luta e perseverança, pelo apoio e amor ao longo de mais essa jornada.

Ao meu marido e melhor amigo, Sérgio, pelo amor, carinho, companheirismo, conselhos, por me fazer sorrir e me apoiar em mais essa etapa.

À minha filha Lara, que apesar de ainda estar em meu ventre, já me ensinou muito sobre paciência, resiliência e amor incondicional.

À minha orientadora Kelly, pela orientação em mais essa etapa, pela amizade e por ser meu exemplo e guia.

Aos meus coorientadores Ricardo Fujiwara e João Cunha, por todo carinho, apoio, experiência e valores passados.

Ao Guilherme Pinheiro e Gabriela Biscoto pela ajuda, amizade, ensinamentos e conversas, que enriqueceram e tornaram possível a realização desse projeto.

À toda equipe LAMICO por toda ajuda, amizade e contribuição para meu crescimento pessoal e aprendizado de vida, e por fazerem meu amor pela micologia crescer cada vez mais.

À Comissão de Enfrentamento da Esporotricose Felina por todo conhecimento teórico e prático e por engrandecer esse trabalho, e, à todas as pessoas envolvidas no projeto pelo carinho, acolhimento e ensinamentos passados.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial à Escola de Veterinária, e a todos os amigos que fiz nesta instituição e que sempre me incentivaram nessa caminhada.

Aos meus amigos, pela torcida e pelas longas conversas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada, essa vitória também é de vocês.

O único momento que você deve olhar para trás é para saber o quão longe você já chegou.

(autor desconhecido)

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix* sp. Nos últimos 20 anos, a forma zoonótica da doença, causada pelo *S. brasiliensis*, se tornou um grave problema de saúde pública e um grande desafio para os profissionais da saúde. O diagnóstico rápido dessa doença é essencial para o início do tratamento, bem como o mapeamento de áreas afetadas e implementação de programas de contenção da doença. O padrão ouro para diagnóstico da esporotricose é a cultura e isolamento, método que pode demorar até um mês para o resultado; outros métodos diagnósticos como citologia, histopatologia e reação em cadeia polimerase (PCR) não apresentam boa sensibilidade, exceto na espécie felina. Nesse contexto, o presente estudo propõe a utilização de ferramentas de bioinformática para seleção de antígenos que possam ser aplicados no desenvolvimento e validação de novos métodos diagnósticos para esporotricose felina. Para isso os bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram utilizados para busca de genomas e proteomas de *Sporothrix* sp. e a seleção de epítomos de células B foi realizada pelo programa *Immunorank*. Pela ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi possível comparar as sequências com outros microrganismos que poderiam causar reação cruzada. Para confirmação *in vitro* da sensibilidade e especificidade dos 143 epítomos selecionados, estes foram sintetizados em membrana de celulose pré-ativas e derivatizadas. As membranas foram submetidas a teste de *Immunoblotting* para verificação da capacidade dos peptídeos em diferenciar *pool* de soros de felinos positivos e negativos, além de animais positivos para criptococose e leishmaniose, considerados diagnósticos diferenciais. Ao final, foram selecionados cinco peptídeos que apresentaram maior *score*, sendo que três destes apresentavam cadeias semelhantes, portanto, foram sintetizados em um único peptídeo chamado de PepSPSK. Os peptídeos PepSPSK, Pep2 e Pep3 foram sintetizados como peptídeos solúveis e utilizados na padronização e avaliação de desempenho analítico de um ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). No ELISA, o peptídeo PepSPSK foi capaz de diferenciar *pool* de soros de animais positivos para esporotricose de *pool* de soros de animais negativos e *pool* de soros de animais positivos para criptococose, enquanto os outros dois peptídeos não apresentaram boa discriminação entre os grupos. Ao final, o peptídeo PepSPSK seguiu para as etapas de validação de um novo teste diagnóstico, apresentando boa sensibilidade e especificidade analítica e obtendo resultados significativos de discriminação entre *pool* de soros de animais positivos de *pool* de soros de animais negativos ($p < 0,05$), além de ser capaz de diferenciar entre animais positivos para esporotricose de animais positivos para criptococose. Concluiu-se que ferramentas de bioinformáticas auxiliam no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas sorológicas e que o peptídeo PepSPSK apresentou alto potencial para o diagnóstico sorológico da esporotricose felina.

Palavras-chave: *Sporothrix* sp. Peptídeos solúveis. Bioinformática. ELISA.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by fungi of the genus *Sporothrix* sp. In the last 20 years, the zoonotic form of the disease, caused by *S. brasiliensis*, has become a serious public health problem and a major challenge for health professionals. Rapid diagnosis of this disease is essential for initiating treatment as well as mapping affected areas and implementing disease containment programs. The gold standard for diagnosis of sporotrichosis is culture and isolation, a method that may take up to a month to obtain results; other diagnostic methods such as cytology, histopathology, and polymerase chain reaction (PCR) do not have good sensitivity, except in feline species. In this context, the present study proposes the use of bioinformatics tools to select antigens that can be applied in the development and validation of new diagnostic methods for feline sporotrichosis. To this end the NCBI (National Center for Biotechnology Information) databases were used to search for genomes and proteomes of *Sporothrix* sp. and the selection of B-cell epitopes was performed by the Immunorank program. By BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) it was possible to compare the sequences with other microorganisms that could cross-react. To confirm in vitro the sensitivity and specificity of the 143 selected epitopes, they were synthesized in pre-active and derivatized cellulose membranes. The membranes were submitted to immunoblotting to verify the peptides' ability to differentiate positive and negative feline serum pools, as well as positive animals for cryptococcosis and leishmaniasis, considered as differential diagnostics. At the end, five peptides with the highest score were selected, and three of them had similar chains, so they were synthesized into a single peptide called PepSPSK. PepSPSK, Pep2 and Pep3 peptides were synthesized as soluble peptides and used in the standardization and evaluation of the analytical performance of an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). In the ELISA, the PepSPSK peptide was able to differentiate pool of sera from sporotrichosis positive animals from pool of sera from negative animals and pool of sera from cryptococcosis positive animals, while the other two peptides did not show good discrimination between the groups. In the end, the PepSPSK peptide went on to the validation steps of a new diagnostic test, showing good analytical sensitivity and specificity and obtaining significant discrimination results between pool of sera from positive animals from pool of sera from negative animals ($p < 0.05$), besides being able to differentiate between sporotrichosis positive animals from cryptococcosis positive animals. It was concluded that bioinformatics tools help in the development and improvement of serological techniques and that PepSPSK peptide showed high potential for the serological diagnosis of feline sporotrichosis.

Keywords: *Sporothrix* sp. Soluble peptides. Bioinformatics. ELISA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Expansão da esporotricose humana e felina nos últimos anos. A) Áreas com relatos de esporotricose humana no Brasil. B) Áreas com registros de surtos de esporotricose felina no Brasil	25
FIGURA 2 -	Esporotricose em cão, Pastor alemão. A) Múltiplas lesões em região de focinho B) Lesão única ulcerada em membro torácico direito	30
FIGURA 3 -	Esporotricose em gato. A) Lesão única, nodular, não ulcerada em região de focinho (seta) B) Forma cutânea disseminada em região de face	32
FIGURA 4 -	Colônias de <i>Sporothrix brasiliensis</i> em sua forma filamentosa (A) e leveduriforme (B) e microscopias de sua forma filamentosa 40x (C) e levedura corada por panótico 100x (D).....	44
FIGURA 5 -	Citologia de lesão de gato (1000X) por <i>imprint</i> : Observam-se formas de leveduras de <i>Sporothrix</i> sp. livres ou fagocitadas em macrófagos (setas)	45
FIGURA 6 -	Peptídeos de células B para diagnóstico da esporotricose felina preditos pelo programa <i>Immunorank</i>	55
FIGURA 7 -	Membranas reveladas com Luminata (Sigma Aldrich, EUA) em fotodocumentador digital LAS4000® (GE Healthcare, EUA)	56
FIGURA 8 -	Mapas de calor normalizados das membranas pelo programa ImageJ (NIH, EUA)	57
FIGURA 9 -	Sequência dos peptídeos com potencial uso para o diagnóstico da esporotricose	58
FIGURA 10 -	Gráfico do MALDI/ToF para a confirmação das massas moleculares dos peptídeos solúveis sintetizados. A) PepSPSK B) Pep2 C) Pep3 ...	59
FIGURA 11 -	Resultados de teste de ELISA em diferentes diluições de <i>pool</i> de soros	61
FIGURA 12 -	Resultados de teste de ELISA em diferentes concentrações dos peptídeos solúveis	62
FIGURA 13 -	Resultados de teste de ELISA em diferentes diluições do anticorpo secundário	63

FIGURA 14 -	Gráfico representativo da análise de sensibilidade analítica do peptídeo sintético PepSPSK.....	64
FIGURA 15 -	Gráficos representativos da análise de especificidade analítica do peptídeo sintético PepSPSK e do antígeno bruto de <i>Sporothrix brasiliensis</i> utilizando pool de soros de gatos domésticos.....	65
FIGURA 16 -	Gráfico de teste de ELISA utilizando antígeno bruto de <i>Sporothrix brasiliensis</i> com adição de ureia 6M por 0, 5, 10 e 20 minutos.....	68
FIGURA 17 -	Gráfico comparativo entre ELISA com peptídeo sintético PepSPSK e antígeno bruto de <i>Sporothrix brasiliensis</i> com etapa de adição de ureia (10minutos) e sem a etapa de adição de ureia.....	69

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1 -** Análise densitométrica dos *spots* selecionados nos ensaios de *immunoblotting*: Peptídeos selecionados após análise densitométrica utilizando o software ImageJ **57**
- QUADRO 2 -** Sequência dos peptídeos com potencial uso para o diagnóstico da esporotricose, e suas respectivas massas moleculares, confirmadas por MALDI/ToF **58**
- QUADRO 3 -** Coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade do peptídeo sintético PepSPSK e antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* sp. em felinos domésticos **66**
- QUADRO 4 -** Coeficiente de variação para avaliação da reprodutibilidade do peptídeo sintético PepSPSK e antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* sp. em felinos domésticos..... **67**

LISTA DE SIGLAS

·OH	Radical hidroxil
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
BHI	Agar Infusão de Cérebro e Coração
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina sérica bovina
DIC/HOBT	N,N'-Diisopropilcarbodiimida / Hidroxibenzotriazol
DHN	1,8-di-hidroxinaftaleno
DMF	Piperidina em dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FcγR	Receptor gama Fc
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HClO	Ácido hipocloroso
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN-β	Interferon-beta
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulinas A
IgG	Imunoglobulinas G
IgM	Imunoglobulinas M
IL-1β	Interleucina 1β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A

L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LAMICO	Laboratório de Micologia e Micotoxinas
LIGP	Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos
MALDI/ToF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₂	Amino
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Íon superóxido
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OPD	Orto-fenilenodiamina
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
T-TBS	Tampão Tris salino com Tween, do inglês <i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
Th	T helper
TLR2	Receptor Toll-like 2
TLrs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro
μmol	Micromol
g	Gramas
L	Litros
mL	Microlitros
mg	Miligramas
M	Molar
N	Normal
ng	Nanogramas
rpm	Rotação por minuto
%	Porcentagem
kDa	Quilodalton
μL	Microlitro
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO GERAL	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Esporotricose	20
3.2 Histórico e Distribuição Mundial	21
3.3 Transmissão, Manifestações Clínicas e Tratamento	27
3.4 Esporotricose nas Espécies Animais	28
3.5 Imunidade na Esporotricose	32
3.5.1 Fatores de virulência	32
3.5.2 Imunidade inata e adaptativa	34
3.6 Avaliação de Desempenho Analítico de Métodos Diagnósticos.....	39
3.7 Métodos Diagnósticos na Esporotricose	41
3.7.1 Coleta de amostra	41
3.7.2 Isolamento e identificação	43
3.7.3 Diagnóstico citológico	44
3.7.4 Diagnóstico histopatológico	46
3.7.5 Intradermorreação	46
3.7.6 Diagnóstico sorológico e molecular	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Amostras - Banco de Soros	49
4.2 Predição e Seleção de Epítomos para Célula B	49
4.3 Síntese de Peptídeos em Membrana de Celulose	50
4.4 Imunoensaio com Peptídeos Ligados à Membrana	51
4.5 Síntese de Peptídeos Solúveis e Confirmação por MALDI/ToF	52
4.6 Produção de Antígeno Bruto de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	52
4.7 Ensaio de ELISA anti-IgG e anti-IgM	53
4.8 Análises Estatísticas	54
5 RESULTADOS	55
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A - Caracterização das amostras utilizadas para o desenvolvimento de testes diagnósticos da esporotricose felina	97

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix*. Possui distribuição mundial ocorrendo principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical, sendo a maioria dos relatos acontecendo na África do Sul, China e Brasil (MORA-MONTES *et al.*, 2015; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017; QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019). Os fungos do gênero *Sporothrix* são dimórficos, apresentando uma forma filamentosa no ambiente ou quando incubado entre 25°C - 28°C em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA); e uma forma leveduriforme quando parasitando ou incubado entre 35°C - 37°C em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (MARIMON *et al.*, 2007; DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012; ZHOU; RODRIGUES; FENG, 2013; MORA-MONTES *et al.*, 2015).

No geral, fungos causadores da esporotricose são encontrados em solo e vegetação, sendo sua via clássica de transmissão a inoculação traumática associada à atividades ocupacionais de pessoas que desempenham atividades diretas com solo ou matéria vegetal (FERNANDES *et al.*, 2009). No Brasil, a via clássica se manteve até meados da década de 1990, quando a principal forma de infecção passou a ter o envolvimento de gatos infectados. Desde então o número de casos no país vem aumentando drasticamente, sendo descrito como o principal agente patogênico na forma zoonótica a espécie *S. brasiliensis* (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019). O felino doméstico se tornou o mantenedor da doença, uma vez que este possui um potencial transmissor considerável, que se dá, em parte, pelo hábito desses animais de utilizarem árvores para afiar suas garras. Com isso, é possível adquirir o fungo sob unhas podendo transmiti-lo durante a arranhadura, inoculando grande quantidade de carga fúngica no hospedeiro. Animais infectados também podem transmitir a esporotricose por aerossóis provenientes de espirros ou contato direto de pele lesionada com a ferida de animais infectados (CARLOS *et al.*, 2009; MONTENEGRO *et al.*, 2014; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017; DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

O diagnóstico rápido da esporotricose em gatos permite mapear áreas afetadas, avaliar a epidemiologia da doença e o início rápido e eficaz do tratamento, diminuindo o risco de transmissão, além de melhorar o prognóstico do paciente. A análise espacial realizada por Paiva *et al.* (2020) sugere que a intensidade de casos de esporotricose felina em uma determinada área é fator de risco para a disseminação da doença tanto em gatos quanto em humanos. Além disso, é dito que, o animal com esporotricose atua como sentinela para possíveis novos casos, tanto humanos quanto em animais, tornando sua detecção uma medida importante na prevenção e

controle da doença. O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura e isolamento do agente, no qual mesmo apresentando sensibilidade próxima de 100% em felinos domésticos, apresenta como desvantagem a demora no resultado, uma vez que a identificação do agente em laboratório pode levar até 30 dias. Técnicas como a citologia e histopatologia, embora mais rápidas que a cultura e isolamento, acabam por apresentar baixa sensibilidade em outras espécies. Além disso, quando o diagnóstico é negativo, a recomendação é tentativa de cultura e isolamento do agente, levando a um maior atraso para o resultado e consequente início de tratamento do paciente (PEREIRA *et al.*, 2011; BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2019).

Desde o início da década de 1970 tem se estudado a utilização de testes sorológicos para o diagnóstico da esporotricose. Testes de imunodifusão, reação em cadeia polimerase (PCR), aglutinação em tubo, fixação de complemento, aglutinação em látex, *imunoblot*, teste de imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos, acabam apresentando inviabilidade em sua aplicação em áreas endêmicas ora por não apresentarem boa sensibilidade e especificidade, ora por apresentarem reação cruzada, inespecífica ou alto custo (ALBORNOZ; VILLANUEVA; DE TORRES, 1984; FERNANDES *et al.*, 2011; DE JESUS *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a busca por tecnologias para criação de novos testes diagnósticos se faz necessária, e testes como o ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), são uma excelente alternativa para o diagnóstico precoce da esporotricose, sendo considerada uma opção de realização fácil, ágil e de baixo custo. O desenvolvimento e validação de um novo teste diagnóstico rápido e eficiente é de extrema importância não só para iniciar o tratamento de forma mais rápida e segura, melhorando o prognóstico do paciente, como também para a coleta de dados epidemiológicos e vigilância epidemiológica da doença. Assim, o presente estudo propõe a predição de peptídeos sintéticos para potencial utilização como antígenos em testes diagnósticos da esporotricose, além da produção de um teste de ELISA utilizando peptídeos sintéticos para esporotricose felina.

2 OBJETIVO GERAL

Selecionar peptídeos para serem utilizados em novos testes diagnósticos para esporotricose.

2.1 Objetivos Específicos

- Selecionar, utilizando ferramentas de bioinformáticas e banco de dados de genoma e proteomas de *Sporothrix* spp., epítomos de célula B para produção de peptídeos;
- Sintetizar, produzir e verificar a reatividade de peptídeos preditos por bioinformática utilizando testes *in vitro*;
- Desenvolver um ELISA indireto com peptídeos sintéticos para detecção de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) para diagnóstico precoce da esporotricose em gatos domésticos (*Felis catus*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Esporotricose

A esporotricose é uma micose de implantação, subcutânea granulomatosa de curso agudo a crônico que acomete animais e humanos. Possui distribuição mundial com maior ocorrência em regiões de clima tropical e subtropical, sendo a maioria dos casos relatados na África, Ásia e América Latina, e os maiores surtos descritos dessa doença com ocorrência na China, Japão, Peru e Brasil (MORA-MONTES *et al.*, 2015; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017; QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019).

Há pouco mais de um século, a esporotricose era atribuída a um único agente, denominado *Sporothrix schenckii*. Com o avanço da biologia molecular, análises usando sequências genéticas específicas como a quitina sintase, β -tubulina e calmodulina, diretamente aplicadas às pesquisas em taxonomia de fungos, além de análises filogenéticas e também através de análises fisiológicas, descobriu-se que o agente *S. schenckii* é na verdade um grupo de espécies que, apesar de semelhantes, apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas entre si (MARIMON *et al.*, 2007; BONIFAZ; VAZQUEZ-GONZALEZ, 2010; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011, RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2013; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; RODRIGUES, 2015). Este grupo compreende 51 táxons, divididos em um clado clínico, onde estão os principais fungos patógenos humanos, incluindo *Sporothrix brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, e um clado ambiental, composto por outras espécies, como *S. candida*, *S. pallida*, *S. inflata*, *S. chilensis*, *S. mexicana* e *S. gossypinum* (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

As espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix* são do filo Ascomycota. Além disso, são fungos termodimórficos, ou seja, apresentam uma forma micelial saprófita e uma forma leveduriforme parasitária. A primeira forma é encontrada no meio ambiente, podendo também ser obtida através de isolamento laboratorial ao incubar o fungo a 25°C - 28°C em meio SDA; já a forma leveduriforme pode ser obtida em laboratório ao inocular o fungo em meio BHI incubado a 35 - 37°C. Em geral, os fungos em sua forma micelial apresentam hifas finas e hialinas, septadas e ramificadas, contendo conídios de 2 a 4 μ m, afunilados, dispostos em arranjo em “forma de flor”, podendo, também, apresentar-se separados dos conidióforos e dispostos lado a lado seguindo bilateralmente ao longo da hifa e conídios sésseis. A forma leveduriforme é pleomórfica, com células alongadas a ovais, medindo entre 2 e 5 μ m de

diâmetro (MARIMON *et al.*, 2007; DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012; MORA-MONTES *et al.*, 2015).

3.2 Histórico e Distribuição Mundial

O ambiente, solo, plantas espinhosas, musgos e até animais são descritos como reservatórios dos fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix*. Ramíres-Soto *et al.* (2018) realizaram um estudo epidemiológico de amostras ambientais sendo as fontes: folhas verdes e secas, flores, detritos lenhosos, folhas de junco, madeira, pés de milho e palha de milho para uso como aquecimento. Na pesquisa, os autores identificaram 212 registros de *Sporothrix* spp. ambientais isolados de regiões ou províncias da África do Sul, Alemanha, Argentina, Áustria, Brasil, Chile, China, Espanha, Estados Unidos, Holanda, Índia, Israel, Itália, México, Uruguai e Venezuela. No referido estudo, o maior número de isolados foi proveniente do México. Seis espécies foram identificadas, sendo estas *Sporothrix schenckii*, *S. pallida*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. chilensis* e *S. mexicana*.

Uma vez que os fungos do gênero *Sporothrix* são encontrados no ambiente em regiões endêmicas, a esporotricose está associada à infecção acidental do hospedeiro através de plantas, solo ou matéria orgânica vegetal contaminados (saprônose) (BARROS *et al.*, 2004; DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

Agricultores, jardineiros e pessoas que desenvolvem atividades diretas com material vegetal e solo são acometidos quando ocorre a inoculação traumática do fungo ao realizarem suas atividades ocupacionais (FERNANDES *et al.*, 2009). Já na China, o maior número de casos está relacionado a acidentes durante a plantação de milho ou utilização de palha de milho como aquecimento durante o inverno (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; SONG *et al.*, 2013). Na América do Sul foi relatado um grande foco na região Andina no Peru, no entanto, é o Brasil que detém o maior número de casos devido a epidemia relacionada à transmissão zoonótica da doença (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

A esporotricose foi descrita pela primeira vez em 1898, no hospital John Hopkins, em Baltimore, Estados Unidos da América (EUA). Desde então, a doença foi relatada na América do Norte, Extremo Oriente e Europa, especialmente na França, e hoje é vista como a micose mais prevalente na América Latina (BARROS *et al.*, 2004; MORA-MONTES *et al.*, 2015) As principais áreas endêmicas, atualmente, estão concentradas no Japão, na América do Norte e do Sul, especialmente México, Brasil, Peru, Uruguai e Colômbia (BARROS *et al.*, 2004; SCHUBACH *et al.*, 2004; MORA-MONTES *et al.*, 2015).

Chakrabarti *et al.* (2015) e Rodrigues *et al.* (2020) realizaram um estudo sobre os focos de epidemia, os padrões de infecção bem como a distribuição do microrganismo em todo o mundo. No continente africano foi relatada a doença nas províncias de Gauteng, Pretória, Botsuana e Mpumalanga. Na África do Sul, Quintal (2000), relatou cerca de 3000 casos de esporotricose não zoonótica em mineiros, uma vez que a madeira utilizada como viga nas minas estava contaminada com o fungo, sendo essas infecções atribuídas a espécie *S. schenckii*. Houve também relato de um pequeno surto de esporotricose em trabalhadores que manuseavam “tijolões” na região de Pretória de 1959 a 1961. Desde 1914, seu primeiro relato no país, casos de esporotricose vem sendo regularmente relatados na África do Sul. Vários casos isolados também foram relatados no Zimbábue, Nigéria e Sudão. Houve relato de um surto em 2011 da esporotricose em uma mina de ouro na região nordeste da África do Sul sendo atribuída a espécie *S. schenckii* e *S. mexicana* foi isolado de amostras ambientais. O mapeamento de casos na África é escasso uma vez que existem poucos laboratórios de micologia no continente (PIJPER; PULLINGER, 1927; FINDLAY, 1969; GUMAA, 1978; ROSS; GELFAND, 1978; JACYK; LAWANDE; TULPUL, 1981; VISMER; HULL, 1997; QUINTAL, 2000; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; GOVENDER *et al.*, 2015).

Na Oceania os relatos da doença ocorreram na Austrália, sendo os casos relatados na parte leste e oeste do país. Houve relatos da doença em mochileiros em Queensland que tiveram contato com feno mofado. A esporotricose também foi descrita em New South Wales. A doença na Austrália foi mais estudada durante um surto na região oeste do país, no qual a fonte principal de infecção foi descrita como sendo feno contaminado. A utilização de tipagem molecular por eletroforese e análise de micro restrição comprovaram que os isolados clínicos e o feno pertenciam a mesma espécie e cepa de fungo. Foi comprovado, também, que os isolados do oeste do país eram diferentes dos isolados da parte leste do país. O surto foi controlado após recomendação de uso de proteção e camisas de manga longa ao manusear feno (CONIAS; WILSON, 1998; PINN, 1998; O'REILLY; ALTMAN, 2006; FEENEY *et al.*, 2007; SIVAGNANAM *et al.*, 2012; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

No continente asiático houve relatos no Japão, China e Índia. No Japão, os casos foram atribuídos às espécies *S. schenckii* e *S. globosa* após análises de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA). A esporotricose cutânea era a mais frequente, tendo mais de 2500 casos relatados entre 1946 e 1982, porém, atualmente, a esporotricose é bastante rara, sendo observados apenas alguns casos na ilha de Kyushu. Essa diminuição na incidência foi atribuída às mudanças nas práticas agrícolas, nas quais os trabalhadores não precisam mais ter contato direto com o solo

(FUKUSHIRO, 1984; ISHIZAKI; KAWASAKI, 2000; MOCHIZUKI; ANZAWA, 2011; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Na China, a esporotricose foi relatada em todas as províncias, sendo a maior incidência na província de Jilin. O primeiro relato clínico da doença foi em 1916 por Xinde Diao e o primeiro relato comprovado por cultura ocorreu em Xangai em 1951 por Guolian Yang (SONG *et al.*, 2013; CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Os fungos foram isolados em pés de milho e galhos secos, uma vez que, na China, durante o inverno, é comum o uso de palha como forma de aquecimento, o que colabora com a alta incidência de casos de esporotricose durante os meses de inverno. Em um estudo realizado em esporotricose infantil, a doença foi associada ao uso de palha de milho durante o inverno. Entre 1995 e 1996 houve relato de surto de esporotricose associado a aplicação de injeção intramuscular em uma aldeia, acometendo 87 pessoas na região de Shibeí. As manifestações clínicas ocorreram no local de aplicação. Entre 1991 e 1993 mais de 400 pessoas contraíram esporotricose após enchentes que acometeram o país, os relatos começaram a ocorrer de três a seis meses após o desastre, e todos os pacientes relataram contato com junco trazido pelas inundações, no qual posteriormente foi isolado *Sporothrix* sp. dessa fonte de vegetais. A maioria dos casos está relacionada à forma cutânea localizada da doença e a espécie prevalente no território chinês é *S. globosa*. (LI *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2003; YANG; LI; YAO, 2005; KONG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013; LIU; ZHANG; ZHOU, 2014; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020).

O primeiro caso da doença na Índia foi relatado em 1932 por Ghosh (GHOSH, 1932). A esporotricose é considerada prevalente em todo território indiano, sendo mais comum na região sub-Himalaia no norte, alguns estados na região nordeste e alguns casos ao sul de Karnataka (CHAKRABARTI *et al.*, 1994; SCHUBACH *et al.*, 2005; MEHTA *et al.*, 2007; CHAKRABARTI *et al.*, 2015) Na Índia, *S. globosa* também foi atribuída ao maior número de casos, tendo alguns relatos esporádicos atribuídos a *S. luriei* acometendo principalmente agricultores e pessoas que trabalhavam com horticultura (PADHYE *et al.*, 1992; GHOSH *et al.*, 1999; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

No continente europeu a esporotricose é considerada rara. Há relatos de alguns nichos na Itália e na região do mediterrâneo de 1962 a 1992, sendo *S. schenckii* a espécie responsável pelo maior número de casos e *S. luriei* relatado em menor frequência na Itália. Relatos mais recentes ocorreram na Calábria e na Sicília na região sul do país entre 2007 e 2008, incluindo o relato da doença em um cão de caça da raça braco-italiano, que apresentou a forma cutânea disseminada da doença (ALBERICI *et al.*, 1989; CAFARCHIA *et al.*, 2007; CRISEO *et al.*, 2008; CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Ocorreram apenas 16 relatos entre 1911 e 1968 nas ilhas

britânicas. Na França, houve grande número de relatos de *Sporothrix* spp. durante a Grande Guerra, posteriormente, a incidência da doença diminuiu drasticamente, tendo alguns relatos em pequenos mamíferos durante uma pesquisa, e um caso em um homem cujo trabalho o predispunha ao contato direto com solo (SYMMERS, 1968; MARIAT, 1975; MAGAND *et al.*, 2009; CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Houve dois casos relatados em Barcelona, Espanha. Em Portugal foi isolado *S. mexicana* em um homem que realizou uma viagem à Malásia e foi relatado um caso autóctone causado por *S. globosa* (VENTIN *et al.*, 1987; DIAS *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

Nas Américas a esporotricose foi relatada em países da América do Norte, Central e América do Sul. Em 1988 houve um surto nos EUA, no qual foram registrados 84 casos em 15 estados diferentes, sendo os casos associados à contaminação de musgos usados em pinheiros. Outro surto da doença foi relatado em 1997, este relacionado ao feno (DOOLEY; BOSTIC; BECKIUS, 1997; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020).

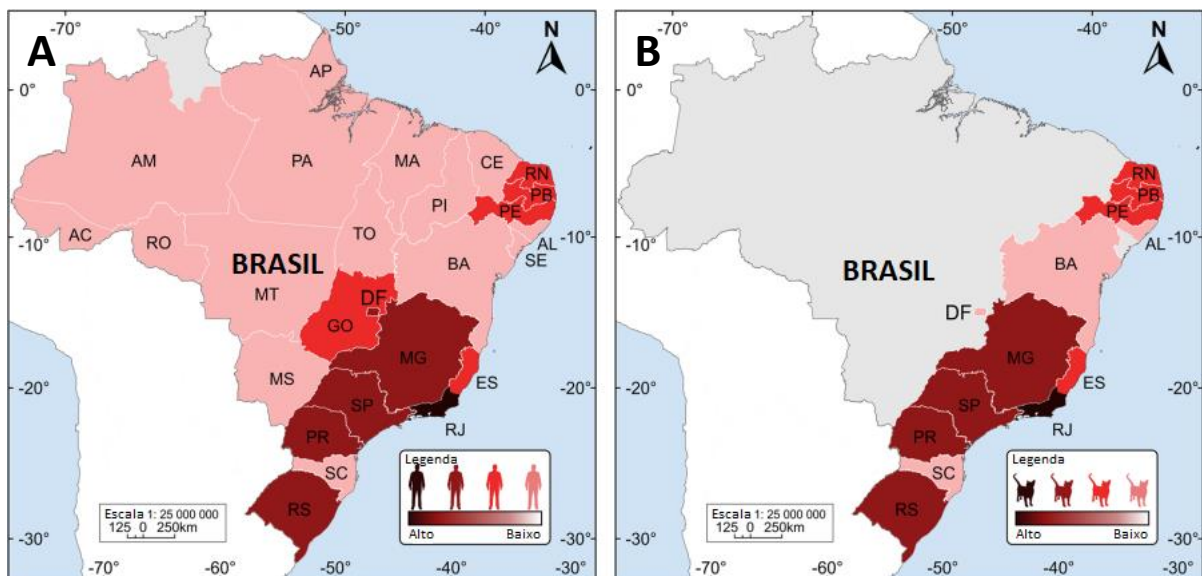
No México, a esporotricose ocorre principalmente nas regiões de clima tropical e com alta umidade, sendo a maior ocorrência nos estados Jalisco e Puebla. Os pacientes deste local relataram o início da doença após traumas durante o manuseio de plantas e acidentes com roedores, como camundongos, ratos e esquilos. Análises moleculares atribuíram cerca de 90% dos casos no México a *S. schenckii*, e em menor grau, *S. globosa* e *S. mexicana* (CAMPOS; ARENAS; CORONADO, 1994; MAYORGA; TARANGO; BARBA-RUBIO, 1999; MACOTELA-RUIZ; NOCHEBUENA-RAMOS, 2006; GARCÍA-VARGAS; MAYORGA; SOTO-ORTIZ, 2008; BONIFAZ; VAZQUEZ-GONZALEZ, 2010; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

Casos também foram relatados na Venezuela e Chile relacionados a acidentes durante atividades agrícolas. No Uruguai e Argentina, a caça aos tatus tem sido associada à esporotricose. Houve ainda, relatos isolados na Costa Rica, Guatemala, Honduras e Nicarágua (MAYORGA *et al.*, 1978; VIDAL; RODRIGUEZ-DE-KOPP, 1993; ALVES *et al.*, 2010; BONIFAZ; VAZQUEZ-GONZALEZ, 2010; MATA-ESSAYAG *et al.*, 2013; CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

No Brasil, a epidemiologia da doença tem sido bastante estudada, uma vez que a via clássica de infecção, definida por ser a infecção do hospedeiro através da inoculação traumática após o manuseio de solo e/ou material orgânico contaminado, foi a principal via de infecção até meados dos anos 1990. Após, a via alternativa de transmissão, descrita por transmissão envolvendo arranhaduras e/ou mordeduras de animais infectados, se tornou a principal forma de contágio. Desde sua primeira descrição em 1907 por Lutz e Splendore em ratos naturalmente

infectados nos esgotos da cidade de São Paulo, o número de casos no Brasil vêm aumentando gradualmente nos últimos anos. Embora o primeiro relato de transmissão zoonótica da esporotricose tenha ocorrido em 1950, segundo Almeida e colaboradores (1955), até meados da década de 90 essa via alternativa de infecção era considerada esporádica. Após esse período, a via que apresenta o gato doméstico como principal agente começou a ser relatada no estado do Rio de Janeiro em pacientes que contraíram esporotricose após acidentes com felinos domésticos, sendo o agente infeccioso, *Sporothrix* sp. isolado das garras e cavidade oral desses animais (CHAKRABARTI *et al.*, 2015, RODRIGUES *et al.*, 2020). Atualmente, no Brasil, houve relatos da esporotricose humana em 25 dos 26 estados, sendo alguns estados já considerados como áreas endêmicas, com os casos mais graves registrados em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). As regiões Sul e Sudeste do Brasil se destacam pela transmissão zoonótica da doença, enquanto nas demais regiões os casos ainda ocorrem pela transmissão acidental, sem a participação do gato na cadeia de transmissão. É difícil estimar a real magnitude da epidemia desta doença no Brasil, uma vez que apenas alguns estados e municípios possuem notificação obrigatória (SCHECHTMAN *et al.*, 2022) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Expansão da esporotricose humana e felina nos últimos anos. A) Áreas com relatos de esporotricose humana no Brasil. B) Áreas com registros de surtos de esporotricose felina no Brasil.



FONTE: Rodrigues *et al.*, 2020

Nas regiões Sul e Sudeste houve relatos da transmissão zoonótica nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (RODRIGUES *et al.*, 2020). As ocorrências já ultrapassam 8.000 casos no Rio de Janeiro, tanto em humanos quanto em animais. Tal fato tem sido considerado, nesse estado, uma hiperendemia de longa duração. Curiosamente, os casos relacionados à transmissão zoonótica têm como principal agente a espécie *S. brasiliensis*, sendo também citada como a mais virulenta. Em felinos domésticos, a espécie *S. brasiliensis* foi relatada em 96,5% dos casos estudados no estado do Rio de Janeiro, sendo esse achado também em humanos, o que confirma a associação da espécie *S. brasiliensis* com a transmissão zoonótica da doença (QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019; SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

No contexto de hiperendemia que ocorre no estado do Rio de Janeiro relacionada à transmissão zoonótica, o perfil de humano infectado mudou. Enquanto a via clássica acometia um grupo de profissionais, principalmente pessoas que lidam diretamente com matéria orgânica e solo, como agricultores e jardineiros, a transmissão zoonótica acomete principalmente pessoas que lidam diretamente com animais, como responsáveis pelos animais, médicos veterinários e agentes de saúde pública. Fato é que a via alternativa de infecção se tornou um problema de saúde pública, ganhando atenção da comunidade médica, médica veterinária e demais profissionais de saúde (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

O paradigma epidemiológico mudou da via de infecção clássica para a via alternativa no Brasil, porque os felinos domésticos passaram a desempenhar um papel importante na transmissão e na manutenção das espécies do gênero *Sporothrix* no ambiente (BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). O gato é apontado como o principal mantenedor da doença, uma vez que seu potencial transmissor é considerável. Isso se dá em parte, pelo hábito dos felinos de afiarem as garras em árvores, onde adquirem o fungo sob as unhas e cavidade bucal podendo, assim, transmiti-lo na arranhadura ou mordedura que inoculam grande quantidade de carga fúngica no hospedeiro. Outras vias de infecção relatadas se dão através de aerossóis proveniente de espirros ou contato direto de pele lesionada com a ferida de animais infectados, uma vez que os felinos apresentam grande quantidade de organismos fúngicos em suas lesões (BARROS *et al.*, 2004; CARLOS *et al.*, 2009; MONTENEGRO *et al.*, 2014; DE ALMEIDA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020). Com os gatos domésticos ganhando papel importante na cadeia de transmissão da doença, assim como sua manutenção no ambiente, a esporotricose se tornou um enorme problema de saúde pública, sendo um risco para humanos e outros animais que tenham contato com esses felinos infectados. O perfil epidemiológico em casos humanos, mudou de pessoas que sofriam acidentes ao manusear matéria orgânica contaminada com os

microrganismos, para uma doença ocupacional de médicos veterinários, tratadores de animais, protetores que resgatam e cuidam de felinos domésticos doentes (PAIVA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020).

3.3 Transmissão, Manifestações Clínicas e Tratamento

A principal via de transmissão da esporotricose se dá pela inoculação traumática do fungo na pele do hospedeiro, sendo necessário que ocorra lesão no momento da inoculação ou que o contato seja com uma lesão pré-existente. Raramente a transmissão ocorre por inalação de conídios, o que levaria a forma sistêmica da doença, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. A via de transmissão, o *status* imune do hospedeiro e as particularidades da espécie determinam a manifestação clínica da doença (DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012; ZHOU; RODRIGUES; FENG, 2013; CARNERO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

A esporotricose possui uma ampla variedade de manifestações clínicas, podendo apresentar-se na forma cutânea localizada, cutânea disseminada, linfocutânea, extracutânea e sistêmica (MIRANDA *et al.*, 2016; CARNERO *et al.*, 2018).

Na forma **cutânea localizada** o fungo permanece no local de inoculação, em tecido cutâneo e subcutâneo, sendo caracterizada por lesão única, que se inicia com uma pápula ou pústula que aumenta de volume e adquire formato nodular, firme e em alguns casos concomitantemente acontece alopecia local. Esse nódulo posteriormente ulcera, expondo uma base granular e necrótica (CARLOS *et al.*, 2009). Na forma **cutânea disseminada**, as nodulações e ulcerações aparecem em vários locais no corpo, podendo ocorrer por disseminação da própria doença, por múltiplas lesões primárias ou por múltiplas lesões auto infringidas pelo hospedeiro ao se coçar ou se lamber, no caso de animais infectados. Em geral, a forma cutânea disseminada está associada à imunossupressão. Na forma **linfocutânea** a lesão inicia no local de inoculação traumática, apresentando-se como um nódulo único, sendo o fungo carregado para o sistema linfático. Primeiramente ocorre uma infecção local, provocando uma cadeia de nodulações ao longo de todo o vaso linfático do hospedeiro, exibindo uma característica de lesão em “rosário”. A forma **extracutânea e sistêmica**, assim como a cutânea disseminada foram relatadas em pacientes humanos imunossuprimidos. A forma extracutânea está associada a lesões pulmonares e vias aéreas superiores devido à inalação de grande quantidade de conídios. A forma disseminada está relacionada à invasão do fungo em tecidos adjacentes à lesão inicial, além do acometimento de órgãos, articulações e ossos (WELSH,

2003; CARLOS *et al.*, 2009; LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; SASSÁ *et al.*, 2012; CARNERO *et al.*, 2018).

No passado, as infecções eram, em sua maioria, limitadas a forma cutânea, entretanto, nos últimos anos estão sendo descritas formas mais graves da doença em indivíduos imunossuprimidos e em indivíduos com diminuição da resposta inflamatória (DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012). Nos seres humanos, assim como em outras espécies animais, a principal via de infecção é a cutânea por lesão traumática com material contaminado pelo fungo ou por arranhões e mordidas de animais infectados. Devido a hábitos e a biologia de cada tipo de animal, as manifestações variam predominantemente de acordo com a espécie infectada (CARNERO *et al.*, 2018).

As opções de tratamento para a esporotricose felina são: o uso de antifúngicos orais, como itraconazol, fluconazol, anfotericina B e terbinafina; o uso de iodeto de potássio, sendo esta uma excelente opção em casos resistentes ao tratamento com itraconazol, porém seu uso em felinos deve ser monitorado devido a sensibilidade natural da espécie; e, ainda, opções como remoção cirúrgica, termoterapia local e crioterapia também, quando a área atingida permitir o uso de tais abordagens (REIS *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018)

Outro fator de atenção pode ser relacionado ao tempo prolongado de tratamento, uma vez que, dependendo do acometimento da doença no animal, este pode durar meses; dificuldade na administração de medicação via oral em felinos, principalmente animais de vida livre que possuem pouco contato com seres humanos; custo elevado de medicamentos; e o risco da pessoa que manuseia o animal e outros animais contactantes de se contaminarem, uma vez que o animal contaminado continua transmitindo a doença durante o período de tratamento; além do descarte inadequado de carcaças quando ocorre o óbito, são entraves que dificultam a adesão de responsáveis pelos animais ao tratamento e a cura do animal, além disso, a doença ainda pode apresentar recidivas, o que torna importante o papel do médico veterinário na conscientização dos responsáveis pelos animais e na implantação de políticas públicas para o controle da doença (SCHUBACH *et al.*, 2004; GREMIÃO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014).

3.4 Esporotricose nas Espécies Animais

Fungos do gênero *Sporothrix* já foram isolados causando doença em diversas espécies, como equinos, felinos, caninos, bovinos, golfinhos, roedores, suínos, camelos, primatas e no homem (ALMEIDA *et al.*, 2018). Embora possuam diversas apresentações, em algumas

espécies a esporotricose tem uma apresentação clínica predominante. Em humanos, a forma linfocutânea é a mais relatada, seguida pela forma cutânea localizada e em raros casos a forma cutânea disseminada e extracutânea (MORA-MONTES, 2018; QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019).

Migaki *et al.* (1978) relataram uma linfangite necrosante causada por *S. schenckii* em golfinho do pacífico (*Lagenorhynchus obliquidens*) que vivia em cativeiro por três anos, a confirmação da doença se deu por análise histopatológica e técnicas de imunofluorescência. Em primatas, a esporotricose apresenta principalmente a forma cutânea localizada, causando nódulos cutâneos únicos que ocasionalmente ulceram, principalmente em extremidades dos membros (BERNSTEIN; DIDIER, 2009). Lutz e Splendore (1907) relataram esporotricose em ratos (*Mus decumanus*), que era constituída por lesões únicas em base de cauda e em região de tarso. Em geral, apresenta-se como lesão única na pele, em raros casos houve nodulação com posterior fistulação. Os autores foram capazes de isolar *Sporothrix* sp. de mucosa oral de ratos naturalmente infectados e sadios, e relatam a possibilidade da esporotricose acometer aves, répteis e anfíbios.

Em equinos e muares, as lesões costumam aparecer de um a três meses após a inoculação traumática do fungo em sua forma filamentosa na pele. Em geral, as lesões permanecem restritas a pele ou acometendo a cadeia linfática adjacente, apresentando a forma cutânea localizada ou linfocutânea. A doença foi descrita acometendo principalmente os membros e região abdominal dos equinos, uma vez que são locais com maiores riscos de lesões (CAFARCHIA; FIGUEREDO; OTRANTO, 2013). Boscarato *et al.* (2016) relataram um caso de esporotricose em um equino da raça quarto de milha de três anos de idade. O animal apresentou lesões nodulares de evolução em quatro meses na região peitoral, lateral do tórax e abdome, e nos membros pélvicos. Houve acometimento da cadeia linfática adjacente e formação de lesão em rosário. Piratininga (1943) relatou um caso de esporotricose em um muar de 10 anos de idade, o animal apresentava inúmeras lesões nodulares, sendo algumas ulceradas, na região de peito, porção inferior esquerda do tórax, face interna do antebraço esquerdo, ventre, prepúcio e face interna dos membros posteriores.

Assim como em equinos, a esporotricose cutânea também é a forma mais comum em bovinos, e em raros casos podem apresentar-se na forma extracutânea. Humphreys e Helmer (1943) relataram um caso de esporotricose pulmonar em um bovino da raça Hereford, as lesões caseosas foram observadas em necropsia e acometiam todo o pulmão. A confirmação da esporotricose nesse bovino foi por isolamento do agente em meio Agar Sabouraud.

Em cães, a esporotricose é considerada pouco prevalente, sendo a forma cutânea localizada a apresentação clínica mais encontrada, principalmente em região de focinho, orelha, cabeça e tronco (FIGURA 2). Em geral, a esporotricose nesses animais é decorrente de acidentes com gatos, caça, plantas e ao cavar buracos em terra. Em alguns casos essa lesão pode se apresentar como uma massa nas vias aéreas superiores (SOUZA *et al.*, 2009; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Souza *et al.* (2009) relataram esporotricose em um cão da raça boxer de seis anos de idade, o animal apresentava uma massa no focinho e dificuldade respiratória, o diagnóstico de esporotricose foi dado por exame histopatológico de biópsia da massa. Mascarenhas *et al.* (2018) realizaram um estudo em 15 animais atendidos entre 2014 e 2015 no Rio de Janeiro, Brasil, os animais em sua maioria, apresentavam lesões na cabeça e, principalmente, plano nasal. Nesse mesmo estudo três animais apresentaram a forma linfocutânea, com lesões que se iniciaram nos membros e se propagaram para a cadeia linfática no tronco e cabeça, outros três animais apresentaram a forma disseminada da doença, apresentando sinais respiratórios, anorexia e perda de peso. Andrade *et al.* (2022), relataram a doença em um cão macho, sem raça definida, no estado de Minas Gerais, Brasil, após um surto domiciliar. O animal apresentou lesões ulceradas e crostosas na região da cabeça, dois meses após o contato com um felino contaminado que vivia na mesma casa. Nesse relato, o agente etiológico foi *S. brasiliensis*, confirmado através da técnica de PCR. O cão, uma mulher de 37 anos responsável pelos animais, e mais um felino contactante foram diagnosticados com esporotricose.

FIGURA 2 - Esporotricose em cão, Pastor alemão. A) Múltiplas lesões em região de focinho
B) Lesão única ulcerada em membro torácico direito.



Felinos domésticos foram os principais animais acometidos pela esporotricose nos últimos anos. Isso se deu principalmente pelo aumento de casos dessa doença no Brasil na qual a forma de transmissão zoonótica, tendo o gato como principal agente dispersante mantenedor da doença, vem acontecendo nas últimas décadas. Em felinos, a forma cutânea disseminada é a mais comum, seguida de cutânea localizada e em raras ocasiões ocorrem as outras formas da doença (FIGURA 3). No gato, o período de incubação da doença varia de três a 84 dias, com média de 21 dias (SANTOS *et al.*, 2018).

É comum a ocorrência de lesões exsudativas de evolução rápida, em geral em região cefálica, auricular, plano nasal e em membros. Nesses animais também pode acontecer a formação de massa no focinho, acometendo narinas e vias aéreas superiores, que posteriormente ulceram expondo material granulomatoso e necrótico (SILVA *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por Almeida *et al.* (2018), em 100 felinos, 65% apresentaram lesões únicas, 34% apresentaram a forma cutânea disseminada e 39% dos casos apresentaram comprometimento das vias aéreas superiores com edema de plano nasal. Embora sejam consideradas apresentações clínicas raras, as formas extracutânea e disseminada também foram relatadas em felinos domésticos por Franceschi *et al.* (2018). No referido estudo, um gato mestiço de cinco anos, chegou ao hospital veterinário apresentando aumento de volume em membro posterior esquerdo. Ao exame foi avaliado que se tratava de uma massa firme e dolorosa, na radiografia revelou lise óssea e proliferação de perióstio, além de aumento de volume de tecidos moles. Os fragmentos recolhidos da lesão foram semeados em agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida onde houve o crescimento e isolamento do fungo *S. brasiliensis*; a confirmação da espécie causadora da infecção se deu por análises moleculares da cultura.

Apesar de casos mais graves da esporotricose serem descritos em animais imunossuprimidos, em gatos a gravidade do quadro não apresenta associação com animais positivos para FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FeLV (vírus da leucemia felina) (RODRIGUES *et al.*, 2020). Os felinos domésticos podem apresentar quadros de infecção aguda a subclínicas, e o fungo pode se disseminar por meio de autoinoculação enquanto o felino se coça ou se lambe, e desse modo o fungo consegue colonizar unhas e cavidade oral, incluindo de animais que não apresentam lesões aparentes (SANTOS *et al.*, 2018).

FIGURA 3 - Esporotricose em gato. A) Lesão única, nodular, não ulcerada em região de focinho (seta) B) Forma cutânea disseminada em região de face.



FONTE: Pinto *et al.*, 2019

As manifestações clínicas dependem de uma série de fatores, como a virulência da cepa, a quantidade de inóculo, profundidade de inoculação e resposta imune do hospedeiro (DE ALMEIDA *et al.*, 2018; QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019).

3.5 Imunidade na Esporotricose

3.5.1 Fatores de virulência

É relatado que os fatores de virulência de fungos do gênero *Sporothrix* estão relacionados com as manifestações clínicas da doença, porém estes ainda não estão bem esclarecidos (WELSH, 2003; CARNERO *et al.*, 2018). As estirpes de *S. schenckii* sempre demonstraram uma grande diferença na virulência, permanecendo incerto se essas diferenças eram atribuíveis às diferentes espécies do gênero ou a diferentes isolados da mesma espécie. Há relatos que em modelo murino imunocompetentes, a espécie *S. brasiliensis* demonstrou ser a mais virulenta, provocando maior taxa de mortalidade, dano tissular e apresentando maior disseminação sistêmica quando comparado com as espécies *S. globosa* e *S. Mexicana* (ARRILLAGA-MONCRIEFF *et al.* 2009).

Um dos principais mecanismos de virulência é a diferenciação de morfologia celular, entre a forma micelial e a forma de levedura. Essa alteração é regulada por uma

histidinaquinase, é a capacidade do fungo de alterar sua morfologia dependendo do ambiente que se encontra que permite sua sobrevivência tanto no ambiente quanto em parasitismo (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; TÉLLEZ *et al.*, 2014).

Outro fator importante para a sobrevivência do fungo no hospedeiro é a termotolerância. Em geral as cepas de *Sporothrix* spp. crescem bem em uma média de temperatura de 23°C a 37°C. Já foi relatado que algumas cepas ambientais de fungos do gênero *Sporothrix* não conseguem se adaptar a temperaturas superiores a 35° C e, portanto, não conseguem causar infecção em hospedeiros que mantenham a temperatura corporal entre 36°C e 38°C. Os fungos do gênero *Sporothrix* também possuem a capacidade de crescer e multiplicar em uma ampla faixa de pH (potencial hidrogeniônico), sendo o morfismo micelial capaz de sobreviver na faixa de pH 3,0 a 12,5 e o morfismo de levedura entre pH 2,4 a 9,5 (GUZMAN-BELTRAN *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2016; DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

A produção de melanina é relatada como um importante fator de virulência para muitos fungos patogênicos, incluindo fungos causadores da esporotricose. Essa produção foi observada tanto em células de conídios quanto em leveduras, sendo mantida em uma ampla faixa de pH. A produção de melanina na espécie se dá pela via do pentacetídeo 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) e L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) nos conídios, mas o mecanismo de produção nas hifas ainda não está bem esclarecido, porém em *S. brasiliensis* e *S. globosa* foi observada a produção de melanina pela via da L-tirosina na fase estacionária da forma micelial e levedura. A produção de melanina é variável entre as diferentes espécies e isolados de *Sporothrix* spp. e é relatado que os isolados melanizados causam infecção mais facilmente do que os que produzem baixa quantidade de pigmento.

Um estudo realizado por Nascimento e Almeida (2005) demonstrou que células de leveduras cultivadas em meio infusão de cérebro e coração se mostraram altamente virulentas e revelaram uma alta expressão de melanina na parede celular. As células de leveduras podem produzir melanina *in vitro* e durante a infecção em mamíferos (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018). Esse pigmento permite a sobrevivência da célula fúngica durante a fagocitose, além de proteger dos agentes oxidantes derivados de nitrogênio e do antifúngico anfotericina B. Outro fator de virulência são as proteínas transportadas por vesículas, como a glucanase extracelular, que induz a lise de macrófagos e outras células do hospedeiro (TÉLLEZ *et al.*, 2014; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015).

Sporothrix spp. conseguem produzir superóxido dismutase (SOD), que permite a sobrevivência frente ao estresse oxidativo (TÉLLEZ *et al.*, 2014). As espécies reativas de oxigênio são produzidas por células fagocíticas durante a infecção sendo utilizadas pelo

organismo como agentes oxidantes citotóxicos. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o íon superóxido (O₂⁻) podem funcionar como agentes citotóxicos ou formar outras moléculas tóxicas, como o radical hidroxil ([•]OH), ácido hipocloroso (HClO) e peróxinitrito na presença de espécies de nitrogênio (CARLOS *et al.*, 2009).

Os fungos do gênero *Sporothrix* também são capazes de produzir enzimas que ajudam a invadir o tecido cutâneo do hospedeiro, como protease I e adesinas que são responsáveis pela ligação da levedura à matriz da derme. A principal adesina relatada é uma glicoproteína conhecida como Gp70 que possui 70kDa. A espécie *S. brasiliensis* possui uma isoforma dessa glicoproteína de 60kDa, que está ausente em cepas ambientais não patogênicas. A Gp70 e Gp60 são expressas em grande quantidade em fungos patogênicos, são altamente imunogênicas e detectadas em soros de camundongos infectados experimentalmente com cepas virulentas de fungos do gênero *Sporothrix* (DE BEER *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2013).

Esses fatores de virulência não só permitem a sobrevivência e adaptação do fungo ao meio em que se encontram como também permite a sua evasão do sistema imune do hospedeiro. O conhecimento desses fatores possibilita entender as diferenças de patogenicidade e de lesões causadas nos hospedeiros pelos diferentes isolados de *Sporothrix* (TÉLLEZ *et al.*, 2014).

3.5.2 Imunidade inata e adaptativa

Para que ocorra a infecção e a interação patógeno-hospedeiro, o fungo primeiro necessita vencer as barreiras naturais como pele e mucosas. Embora os fungos do gênero *Sporothrix* produzam enzimas e adesinas capazes de lesionar células e fixar-se no tecido do hospedeiro, não houve relato na literatura da penetração espontânea do fungo, sendo a principal via de infecção a inoculação traumática, seguida de inalação acidental de conídios e contato de leveduras com mucosas (CARLOS *et al.*, 2009; CARNERO *et al.*, 2018; ROSSATO *et al.*, 2018; BARROS *et al.*, 2001).

Após entrar no organismo, a primeira linha de defesa é a resposta inata, sendo a eliminação do fungo por fagocitose de macrófagos e neutrófilos e pela produção de espécies reativas de oxigênio. As leveduras de cepas virulentas de *S. schenckii*, ao contrário de fungos oportunistas, sobrevivem a fagocitose por neutrófilos e são menos susceptíveis ao peróxido de hidrogênio e outros produtos microbicidas produzidos por leucócitos (TORINUKI; TAGAMI, 1985; CARNERO *et al.*, 2018; ROSSATO *et al.*, 2018).

A resposta imune do hospedeiro determina o grau de invasão pelo fungo. A parede celular é o primeiro contato do fungo com o hospedeiro e desempenha um importante papel na

modulação do sistema imune, uma vez que possui os principais pontos de contato. São ativadas as respostas imunes Th1 e Th17 concomitantemente e através de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 17A (IL-17A) secretadas principalmente por linfócitos T CD4⁺, que são capazes de ativar macrófagos e neutrófilos e direcioná-los para o local de infecção (CARLOS *et al.*, 2009; LOMBARDI *et al.*, 2009).

Em estudos realizados por Uenotsuchi *et al.* (2006) é sugerido que *S. schenckii* que causam infecções cutâneas ativam mais fortemente células dendríticas e subsequente uma resposta Th1 quando comparado com *S. schenckii* que causavam lesões viscerais. *Sporothrix schenckii* de origem visceral, nesse estudo, induziram uma resposta Th2, evidenciando uma produção maior de interleucina 4 (IL-4). Portanto, *S. schenckii* que causam lesões viscerais conseguem escapar do sistema imune do hospedeiro induzindo pouca resposta Th1. Os pesquisadores também demonstraram que para uma mesma cepa de *S. schenckii*, conídios cultivados por sete dias apresentam uma virulência maior que conídios cultivados por 12 dias, no qual foi atribuída a porção ramnose de sua parede celular, uma vez que a manose presente foi alterada durante os dias de cultivo. Portanto, uma ligeira diferença na composição do açúcar da superfície do fungo já altera a resposta imune e pode influenciar na patogenia do agente (UENOTSUCHI *et al.* 2006).

Durante a resposta Th1, a secreção de interferon-beta (IFN- β) promove a ativação de macrófagos, sendo esta considerada a interleucina mais importante uma vez que confere proteção por morte do fungo. A IL-17A está envolvida na reparação e ativação das barreiras epiteliais e é produzida pelas células Th17. As células do hospedeiro reconhecem os organismos fúngicos através de componentes da parede celular do fungo, chamados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo receptores do tipo Toll (TLRs), na superfície da célula. Esse reconhecimento desencadeia a ativação das funções efetoras da fagocitose e a resposta adaptativa T helper (Th) pelas células apresentadoras de antígenos (DEEPE; GIBBONS, 2003; NETEA *et al.*, 2008).

Poucos PAMPs da parede de *Sporothrix* spp. são conhecidos, sendo estes os lipídios da parede celular, que desempenham também um importante papel protetor do fungo inibindo o processo de fagocitose, aumentando a estimulação de espécies ativas de nitrogênio, peróxido de ergosterol, compostos da parede celular, proteínas fúngicas segregadas e exoantígenos que possuem a capacidade de ativar o sistema imune (CARLOS *et al.*, 2009; CARNERO *et al.*, 2018).

O peróxido de ergosterol também desempenha um papel de proteção à célula fúngica durante a fagocitose. É dito que o peróxido de ergosterol é formado como mecanismo protetor para evitar espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a fagocitose por polimorfonucleares, mediado principalmente por macrófagos. A morte de patógenos pelos fagócitos se dá em parte pela produção de radicais livres de oxigênio. A exposição prolongada a grandes concentrações de H₂O₂ destrói estruturas biológicas e causa danos irreversíveis às células. Os macrófagos, além de liberar espécies reativas de oxigênio, também secretam enzimas, fatores de coagulação, citocinas e espécies reativas de nitrogênio (RNS), produzem também óxido nítrico (NO) que é um poderoso mediador da inflamação e resposta imune (GILLMAN *et al.*, 2004; SASSÁ *et al.*, 2012).

A formação do granuloma é um evento crítico para a defesa do hospedeiro contra *S. schenckii*. O granuloma é resultado da resposta inflamatória dependente de células T. A indução da resposta celular depende de uma sequência complexa de interações entre o antígeno e células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos. A resposta imune celular nas micoses envolve neutrófilos e monócitos e, o fato de experimentos mostrarem que a esporotricose é mais grave em camundongos nude (HFH11^{NU}) e em paciente HIV positivos, ressalta a ideia de que a imunidade inata por células T é importante para o controle da infecção de *S. schenckii* no corpo do hospedeiro (SHIRAISHI; NAKAGAKI; ARAI, 1992; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2014).

Em resposta aos antígenos nos locais de lesão tecidual, ocorre o processo de ativação celular de macrófagos que provoca alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas nas células. Os macrófagos ativados aumentam a liberação de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos que auxiliam na destruição de antígenos chamadas citocinas. As citocinas são proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular, reguladoras e são secretadas em resposta a estímulos das células do corpo. O TNF- α é uma citocina multifuncional e possui papel importante na patogênese de diversas doenças inflamatórias e infecciosas, sendo inclusive, capaz de induzir a expressão de outras citocinas (EIGLER *et al.*, 1997; CARLOS *et al.*, 2009).

Os macrófagos ativados mostram uma taxa metabólica, motilidade e atividade de fagócitos aceleradas, e além da fagocitose, essas células são capazes de secretar enzimas, componentes do sistema complemento, fatores de coagulação e citocinas. São considerados a primeira linha de defesa do sistema imune e são conhecidos como poderosos mediadores da resposta inflamatória. O acúmulo de nitrito e NO foi correlacionado com atividade fungicida dos macrófagos (CARLOS *et al.*, 2009).

O NO participa da destruição de *S. schenckii* por macrófagos e contribui para o equilíbrio das citocinas no estágio inicial da esporotricose. Em geral, os macrófagos são ativados pela secreção de IFN- β durante a resposta Th1. A IL-17A produzida pelas células Th17 é responsável pela reparação e ativação das barreiras epiteliais e participa ativamente do controle das células Natural Killer (NK) na defesa contra agentes fúngicos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2014; CARNERO *et al.*, 2018).

É relatado que as formas leveduriforme e filamentosa de *S. schenckii* são capazes de ativar o sistema complemento pelas vias clássica e alternativa, independente da presença de anticorpos. O fato de os conídios serem fagocitados por macrófagos, e a forma de levedura não, indica que o reconhecimento das duas morfologias se dá por diferentes vias (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; CARNERO *et al.*, 2018). A interação fungo/sistema imune depende de receptor Toll-like 2 (TLR2). Em um experimento realizado por Guzman-Beltran *et al.* (2012), foi relatado que animais sem TLR2 produziram níveis mais baixos de TNF- α , IL-1 β , interleucina 2 (IL-2) e interleucina 10 (IL-10), o que ressalta a importância desse receptor durante o reconhecimento do *S. schenckii* como patógeno e ativação do sistema imune.

Outro receptor importante é a Dectina-1, que também é vista como responsável pela produção de citocinas durante a interação de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* com monócitos do sangue periférico humano. A manose é descrita como tendo maior importância na fagocitose e menor importância para a estimulação de citocinas para a forma de levedura de *S. schenckii*. Após o reconhecimento, um receptor recentemente descrito, denominado NLRP3 (receptor semelhante ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos que contém o domínio pirina 3), promove a resposta Th e conecta a resposta imune inata a adaptativa. Vários peptídeos da parede celular do fungo foram descritos como sendo capazes de estimular a proliferação de células T (GUZMAN-BELTRAN *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017). Um dos mais importantes é o ZR8, que é um peptídeo da glicoproteína Gp70. O ZR8 é capaz de promover altos níveis de IFN- γ , IL-17A, IFN- β e interleucina 1 β (IL-1 β) com maior número de neutrófilos nas lesões causadas pela doença e provocar aumento de células T CD4⁺ nos linfonodos, o que é sugestivo de uma resposta Th1 e Th17 (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

É descrito que o principal mecanismo para a proteção com a utilização de anticorpos é o reconhecimento da opsonização do patógeno pelo receptor gama Fc (Fc γ R). Este estimula a liberação de citocinas por macrófagos e os ativa (DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012).

Acreditava-se que apenas a imunidade celular era responsável pela proteção do corpo do hospedeiro contra agentes fúngicos. Hoje em dia sabemos que a resposta imune humoral

também é importante para a defesa do organismo hospedeiro. Vários mecanismos foram descritos, entre eles, a inibição da ligação de células fúngicas, aglutinação de células fúngicas, neutralização de moléculas imunorreguladoras, opsonização e aprimoramento da fagocitose, ativação do complemento, lise mediada por citocinas e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (DE ALMEIDA *et al.*, 2014; PORTUONDO *et al.*, 2016).

Apesar do progresso no reconhecimento da resposta humoral contra fungos, pouco se sabe sobre a resposta mediada por anticorpos contra o fungo *S. schenckii*. A resposta Th2 é caracterizada pela presença das IL-4 e IL-13 (interleucina 13) que promovem a diferenciação das células T em linhagem Th2 e produção de anticorpos com consequente diminuição na resposta Th1 (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; DE ALMEIDA *et al.*, 2014; CARNERO *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado por Ruiz-Baca *et al.* (2011), observou-se que as proteínas da parede celular de *S. schenckii* de 60 e 70 kDa se mostraram mais imunogênicas no fungo em sua forma de levedura quando comparado com a forma filamentosa. Já na forma micelial, cinco antígenos foram detectados 48, 55, 66, 67 e 70 kDa. Visto que a proteína de 70 kDa foi a principal molécula imunogênica nas duas formas, acredita-se que esta seja a glicoproteína GP70. Os anticorpos produzidos contra esses antígenos acompanharam produção de citocinas características das respostas Th1 e Th2, além de altos níveis de IFN- γ e TNF- α com um aumento do índice fagocítico (DE ALMEIDA *et al.*, 2014).

Estudos relatam que a produção de anticorpos é importante para conter a infecção no hospedeiro. A infecção foi monitorada por cultura de órgãos, e observou-se um aumento da carga fúngica nas duas primeiras semanas após a infecção, e diminuição após 14 dias. Essa maior carga fúngica inicial sugere fortemente que o combate a *S. schenckii* não depende apenas da capacidade do hospedeiro de eliminar o agente, mas sim da imunidade adquirida com o tempo. Os anticorpos IgG contra Gp 70 foram detectados em alta concentração 14 dias após infecção em modelo murino e sua concentração foi mantida durante todo o processo. A isotipagem mostrou a presença de imunoglobulinas G 1 e imunoglobulinas G 3, que estão envolvidos na opsonização e neutralização de leveduras de *S. schenckii*. A opsonização de *S. schenckii* é essencial para a morte e produção de TNF- α por macrófagos, sendo de suma importância para o controle da esporotricose (DE BEER *et al.*, 2003; CARNERO *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado por Almeida-Paes *et al.* (2007a) foi descrita a presença de isotipos de anticorpos imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina A (IgA) contra exoantígenos miceliais de *Sporothrix* sp. em pacientes humanos durante todo o curso da doença, e embora se mantiveram detectáveis durante o tratamento, esses anticorpos

diminuíram ao longo do tempo. Outra observação importante é que os níveis de anticorpos IgM e IgA eram mais baixos nas formas cutânea localizada e linfocutâneas quando comparado com pacientes que apresentavam as formas cutânea disseminada e extracutânea. Ressaltando que a carga fúngica leva a uma apresentação contínua de antígenos e com isso maior estímulo à produção de anticorpos. IgM ativa o sistema complemento pela via clássica e IgA participa da defesa imune em caso de envolvimento de mucosas (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007a).

As informações sobre esporotricose felina e as moléculas antigênicas envolvidas na doença são escassas. Foi realizado um estudo para detectar os antígenos expressos por *S. schenckii* e *S. brasiliensis* em soros de gatos naturalmente infectados. Foi observada reatividade cruzada nas duas espécies. As principais moléculas reconhecidas pelos anticorpos dos felinos foram a Gp60 de *S. brasiliensis* e Gp70 de *S. schenckii*. Embora a imunidade mediada por anticorpos foi considerada irrelevante para eliminação efetiva do agente no hospedeiro, estudos apontam que a resposta humoral é fundamental na prevenção, controle e tratamento da esporotricose (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; CARNERO *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2018).

Os microrganismos sofrem transformações e mutações constantes, onde as mais vantajosas para a sua adaptação ao ambiente são mantidas, enquanto as deletérias são perdidas. Algumas dessas adaptações podem adicionar aos microrganismos a capacidade de parasitar, invadir ou causar agravos em um organismo hospedeiro, no qual antes, o mesmo não havia a capacidade de causar doença, se transformando em um novo patógeno, adquirindo capacidade de evadir do sistema imune do hospedeiro ou mesmo piorando o quadro clínico de uma doença que esse microrganismo já causava (AYALA, 1970; GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000; LÓPEZ-RODAS *et al.*, 2007).

Há um crescente interesse mundial das autoridades de saúde para o desenvolvimento e validação de métodos apropriados de diagnóstico, visando a segurança animal e humana, restrições comerciais e monitoramento de áreas de doenças. Não é diferente com a esporotricose, uma vez que esta doença emergente vem aumentando muito em número de casos e tomando cada vez mais o território brasileiro ao longo das últimas décadas (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000).

3.6 Avaliação de Desempenho Analítico de Métodos Diagnósticos

Seguindo a proposta de Somoza e Mossman (1992) podemos considerar qualquer dispositivo que reduza a incerteza sobre o estado da doença como um teste diagnóstico. Em

medicina, medicina veterinária, ciências sociais e fitopatologia há muitos cenários em que é importante desenvolver um método diagnóstico, como documentar que um país ou região é livre de uma certa doença, impedir a propagação de patógenos através da comercialização de animais ou produtos derivados, contribuir para a erradicação de uma infecção, confirmar diagnósticos para casos clínicos, estimar a prevalência de enfermidades para facilitar análise de risco, identificar indivíduos infectados para uma melhor implementação de medida de controle e classificar animais visando a saúde do rebanho ou status imunológico pós-vacinal (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000; LISBOA, 2002). Para a avaliação do desempenho analítico de um novo método diagnóstico os seguintes parâmetros são analisados: sensibilidade analítica, especificidade analítica, repetibilidade e reprodutibilidade (GREINER; GARDNER, 2000; CROWTHER, 2001; VISWANATHAN *et al.*, 2007; BURD, 2010).

A sensibilidade analítica pode ser medida em limite de detecção. O limite de detecção é a quantidade estimada de analito em uma matriz especificada que produz um resultado positivo em porcentagem previamente definida em um determinado período. A escolha dos analitos e intervalos para avaliar a sensibilidade analítica é realizada no início do desenvolvimento do teste utilizando literatura já existente ou testes prévios. Alguns métodos ou procedimentos de teste podem ser qualificados para uso como ferramentas analíticas no laboratório de diagnóstico. Estes, geralmente, são testes auxiliares ou procedimentos aplicados a um analito que foi detectado em um ensaio primário. O objetivo dessas ferramentas analíticas é caracterizar melhor o analito alvo no ensaio primário (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004; GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007; OIE, 2018; OIE, 2019).

A capacidade do ensaio em distinguir um analito alvo de um analito não-alvo é chamada de especificidade analítica. É esperado que o teste seja seletivo apenas para o analito alvo, e que não reaja a presença de interferentes da matriz da amostra, substâncias degradantes ou que faça ligação inespecífica do reagente em uma fase sólida, como quando o conjugado de um ELISA é adsorvido no poço da placa de microtitulação ou quando há confusão entre anticorpos vacinais e anticorpos de infecção ativa. Tais interferentes podem gerar respostas falsamente positivas ou negativas em um ensaio alterando drasticamente a especificidade analítica (VESSMAN *et al.*, 2001).

A repetibilidade é o nível de concordância entre resultados da réplica de uma amostra dentro e entre as execuções do mesmo método de teste em um determinado laboratório, sendo avaliada pela variação nos resultados das réplicas. A variação entre as execuções é determinada usando a mesma amostra repetindo o mesmo teste, envolvendo dois ou mais operadores em diferentes dias. O resultado pode ser expresso em desvio padrão, coeficiente de variação, entre

outros (GREINER; GARDNER, 2000; CROWTHER, 2001; VISWANATHAN *et al.*, 2007; BURD, 2010; OIE, 2018; OIE, 2019).

A reprodutibilidade é a capacidade de um método de teste fornecer resultados consistentes, conforme determinado por estimativas de precisão, quando são aplicadas alíquotas das mesmas amostras testadas em diferentes laboratórios, localizados em regiões ou países distintos usando o mesmo teste (protocolos, reagentes e controle) (JACOBSON, 1998; GREINER, 1995; OIE, 2018; OIE, 2019).

Mesmo que uma doença já tenha métodos diagnósticos disponíveis no mercado, estes podem apresentar demora no tempo de execução levando a uma demora no resultado e consequente início de tratamento, ou, ainda, exigir material e mão-de-obra especializada inviabilizando monetariamente a realização do exame ou deixando-o inacessível a uma parte da população. Portanto, faz-se necessária a busca de métodos diagnóstico com resultados mais rápidos, que apresentem boa sensibilidade e especificidade e que ainda possuam valor acessível (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000; BUJANG; ADNAN, 2016, OIE, 2018; OIE, 2019).

3.7 Métodos Diagnósticos na Esporotricose

O diagnóstico da esporotricose pode ser obtido com a combinação da observação das manifestações clínicas, epidemiologia e testes laboratoriais. Os principais testes laboratoriais são: Isolamento e cultura, citologia, histopatologia, sorológico e molecular. A qualidade do resultado é tão boa quanto a qualidade e tipo de amostra enviada (SANTOS *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

3.7.1 Coleta de amostra

Para definir qual tipo de amostra a ser coletada primeiro é necessário definir qual melhor exame a se solicitar dependendo da espécie e do quadro clínico apresentado pelo paciente (SANTOS *et al.*, 2018).

Inicialmente deve-se realizar a limpeza da área de onde se coletará a amostra, de forma a evitar que debris contendo microrganismos ambientais gerem contaminação e com isso diminua, ou invalide, o resultado do exame. A limpeza da área pode ser realizada com gaze e solução fisiológica ou clorexidina degermante 2%. Deve-se ressaltar a utilização de equipamentos de proteção individual, como máscara, óculos de proteção e luvas, sempre visando a segurança do profissional que irá realizar a coleta. O animal deve ser devidamente

contido de forma a gerar menor estresse possível durante a coleta e aumentar a segurança durante a operação (SANTOS *et al.*, 2018).

A campo, a coleta por *swab* (haste flexível estéril com algodão estéril na ponta) ou *imprint* são as opções de coleta mais fáceis e viáveis. A coleta por *swab* é realizada friccionando a parte com o algodão na borda e centro da ferida. Já o *imprint* é realizado pressionando levemente uma lâmina de vidro diretamente na lesão aberta (FIGURA 4). Ambas as amostras coletadas devem ser armazenadas e enviadas ao laboratório em no máximo 24 horas. Esses dois tipos de coleta são recomendados quando clinicamente o paciente suspeito de esporotricose apresenta lesão ulcerada em pele (FERREIRA; SANTOS; SAMPAIO, 2004; SANTOS *et al.*, 2018).

Quando a lesão é nodular, não está ulcerada ou está localizada em estruturas internas como órgãos, pode-se realizar a coleta por punção aspirativa por agulha fina ou biópsia. A punção por agulha fina pode ser guiada ou não por ultrassom. Nesse método uma seringa vazia acoplada de agulha é inserida na massa ou tecido alvo, ao atingir o alvo o êmbolo da seringa é puxado de forma a sugar e gerar vácuo no tecido alvo, faz-se então movimento de retirada e entrada em 3 posições diferentes no alvo de forma a coletar células em mais de uma porção do tecido. Em seguida a retirada, o material coletado na agulha é ejetado sobre uma lâmina de vidro. Dependendo da quantidade e do material coletado aconselha-se a colocar uma lâmina de vidro perpendicular a primeira e deslizá-la em uma única direção, devagar, sem realizar pressão entre as duas, realizando a técnica de *squash* (RODRÍGUEZ; SARMIENTO, 1998; ZAHAROPOULOS, 1999; SCHUBACH *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018).

O método da biópsia deve ser realizado com o animal sedado, sendo mais indicado em cães, uma vez que a espécie apresenta poucos organismos fúngicos nas lesões. Nesse método é removido toda lesão ou parte, o fragmento removido é então colocado em solução salina quando visa o isolamento e identificação de agentes ou colocado em formol se o foco for análise histopatológica. A amostra também deve ser enviada em até 24 horas ao laboratório (RODRÍGUEZ; SARMIENTO, 1998; ZAHAROPOULOS, 1999; SCHUBACH *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2018).

Para análises moleculares ou sorológicas, a coleta de amostra de sangue para extração de soro é indicada. Nesses métodos é utilizada seringa acoplada de agulha e tamanho compatível com a veia de escolha para coleta e tamanho do animal. O animal deve estar devidamente contido, a área a ser coletada deve estar tricotomizada, e a coleta realizada de forma a gerar menor estresse possível para o animal. Uma alíquota pode ser separada quando o

sangue for coletado para outros exames, como hemograma por exemplo, evitando então uma nova abordagem direta ao animal para coleta de soro (BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2005; SCHUBACH *et al.*, 2006; BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2019).

3.7.2 Isolamento e identificação

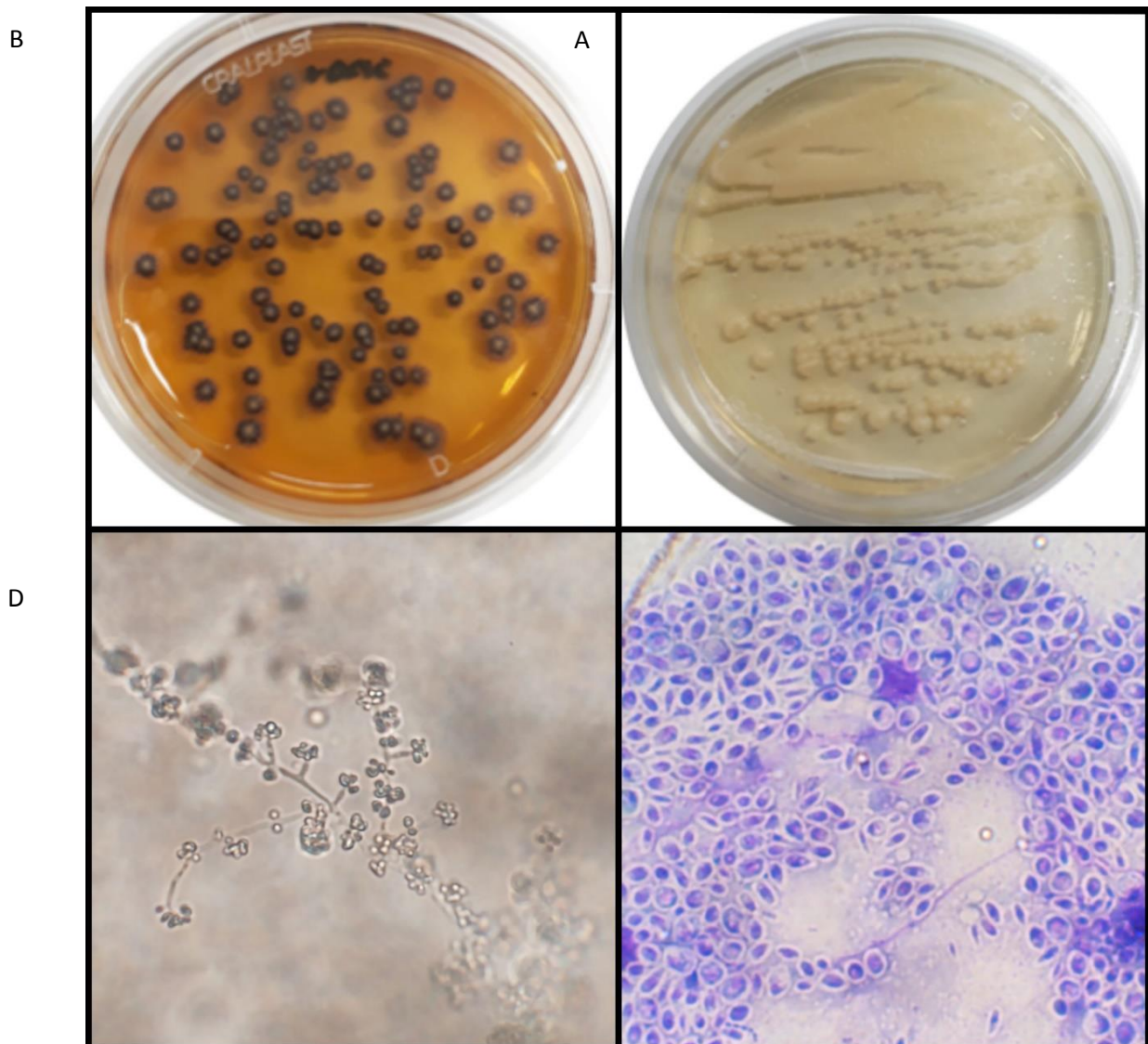
O isolamento do agente em cultura e sua identificação é o padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose. A coleta pode ser realizada por biópsia ou *swab* de lesão cutânea. O fungo causador da esporotricose cresce em meios de culturas rotineiros como SDA acrescido ou não de cloranfenicol e cicloheximida a temperatura ambiente (25° a 28°C). De 4 a 7 dias é observado o início do crescimento do fungo em sua forma filamentosa. (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; MARIMON *et al.*, 2007; DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012; ZHOU; RODRIGUES; FENG, 2013; MORA-MONTES *et al.*, 2015).

Inicialmente as colônias se apresentam branco acinzentadas se tornando marrons a enegrecidas após alguns dias de incubação. Na microscopia observamos hifas finas hialinas septadas, com conidióforos produzindo conídios ovais a arredondados em forma de arranjo ou margarida, por vezes conídios sésseis. Para a confirmação do diagnóstico é necessário provar o dimorfismo incubando a cultura entre 35°C e 37°C em agar BHI ou em meio agar sangue-glicose-caseína. O fungo deve crescer em sua forma de levedura, apresentando colônia branca a bege claro de aspecto cremoso. Na microscopia observam-se leveduras ovaladas a arredondadas (FIGURA 4) (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; MARIMON *et al.*, 2007; DE LIMA FRANCO *et al.*, 2012; ZHOU; RODRIGUES; FENG, 2013; MORA-MONTES *et al.*, 2015).

A cultura e isolamento não é um método 100% sensível, geralmente devido a coleta de forma inadequada, contaminação da amostra com microrganismos saprófitos que inibem o crescimento de *Sporothrix* sp., ou transporte realizado de forma inadequada. A probabilidade de se ter o diagnóstico pela cultura e isolamento do agente varia entre 34% e 94%, dependendo do material coletado. Amostras coletadas de coágulos sanguíneos de animais em fungemia exibem uma probabilidade de isolamento de 34%, amostras coletadas de garras 39,5%, amostras de cavidade oral 42% e coleta de via aéreas superiores 94%. Outra desvantagem dessa técnica é sua demora em obter resultado, uma vez que a espera do crescimento fúngico que pode levar de quatro a trinta dias e com isso atrasar o diagnóstico e consequente início de tratamento, podendo agravar o quadro do paciente, aumentar o risco de transmissão e piorar o

prognóstico (LARSSON, 2011; BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2019).

FIGURA 4 - Colônias de *Sporothrix brasiliensis* em sua forma filamentosa (A) e leveduriforme (B) e microscopias de sua forma filamentosa 40x (C) e levedura corada por panótico 100x (D).



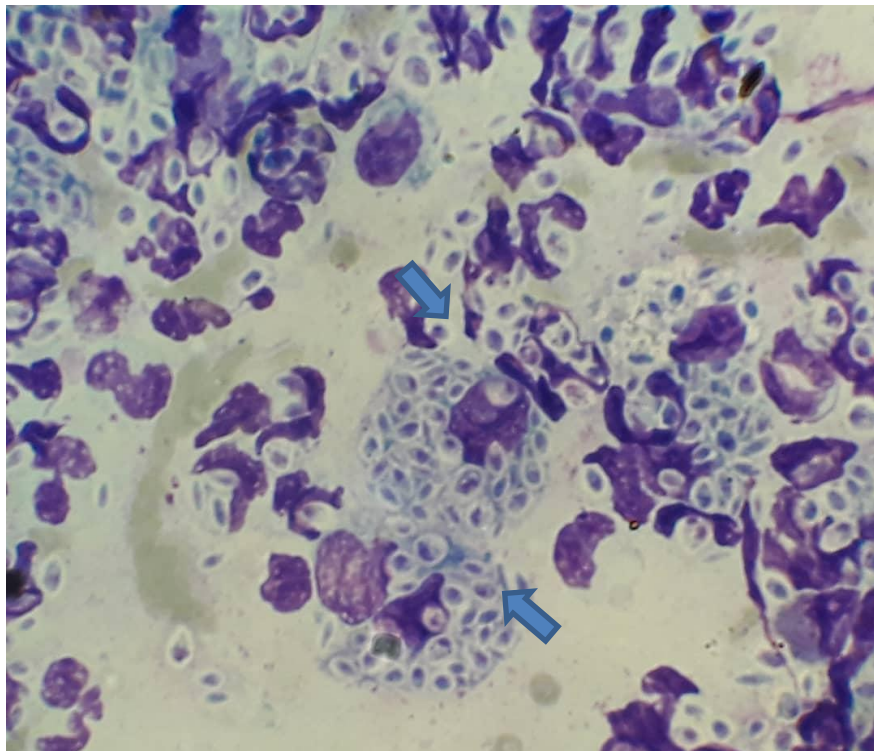
FONTE: O autor (2021).

3.7.3 Diagnóstico citológico

A citologia pode ser realizada por *imprint* quando a ferida é em pele, ulcerada, ou por punção aspirativa através de agulha fina quando a lesão é nodular ou em órgãos internos. É considerado um excelente método de triagem por ser de fácil execução e baixo custo (SANTOS *et al.*, 2018).

Quando em tecido, *Sporothrix* spp. apresenta-se na sua forma parasitária leveduriforme (FIGURA 5). As leveduras se apresentam ovais a arredondadas, medindo cerca de 8µm, fagocitadas por macrófagos ou livres em fundo de lâmina. Em felinos, a citologia apresenta boa sensibilidade, possibilitando a detecção em 78 a 85% dos casos, já em outras espécies devido a poucos microrganismos nas lesões, essa característica do teste já diminui. Amostras coletadas de lesões muito exsudativas, contaminadas ou coletas inadequadas diminuem drasticamente a sensibilidade do teste. Animais em tratamento ou início de lesão também apresentam poucos organismos fúngicos o que dificulta o diagnóstico citológico da esporotricose. Outra desvantagem é que quando há o resultado negativo, o diagnóstico definitivo deve ser realizado por meio de cultura e isolamento e, portanto, aguardar o crescimento da cultura, aumentando o tempo de resultado (PEREIRA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018).

FIGURA 5 - Citologia de lesão de gato (1000X) por *imprint*: Observam-se formas de leveduras de *Sporothrix* sp. livres ou fagocitadas em macrófagos (setas).



FONTE: O autor (2021)

3.7.4 Diagnóstico histopatológico

A histopatologia pode ser realizada por remoção completa da lesão ou parte desta e posteriormente fixada em formol e enviada ao laboratório. Embora em felinos a detecção de células por citologia não represente problema no diagnóstico, em outras espécies que apresentam baixa carga fúngica a utilização da histopatologia melhora essa detecção. A utilização de colorações histoquímicas especiais, a exemplo da coloração de prata Grocott, podem ser aplicadas para melhor visualização das leveduras aumentando a sensibilidade do teste. A utilização de imuno-histoquímica permite um aumento na sensibilidade da técnica por meio da avaliação das interações antígeno-anticorpo, sendo indicado em casos de esporotricose humana e canina. Possui a vantagem pois possibilita a exclusão de outros diagnósticos diferenciais como carcinoma de células escamosas, criptococose, histoplasmose, micobacteriose cutânea e leishmaniose. A desvantagem desse método é a necessidade de mão-de-obra especializada e maquinário específico. E assim como na citologia, diante de um diagnóstico negativo deve-se pedir a cultura e isolamento (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016; SANTOS *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; DE JESUS *et al.*, 2020).

3.7.5 Intradermorreação

Esse teste diagnóstico é realizado aplicando esporotriquina subcutânea e avalia-se a reação de hipersensibilidade tardia. É utilizada como método de triagem e para estabelecer alguns critérios epidemiológicos da esporotricose em uma determinada região, como por exemplo a prevalência da doença. Possui uma sensibilidade de aproximadamente 90%, porém pode dar positivo em pacientes que tiveram infecção anterior e reação inespecífica. Desenvolvida para o uso em humanos a técnica não é usada em felinos. (ITOH; OKAMOTO; KARIYA, 1986; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

3.7.6 Diagnóstico sorológico e molecular

Com o desenvolvimento da biologia molecular ocorreu um aumento de testes com base na detecção de ácidos nucleicos para diagnóstico de doenças infecciosas, não sendo diferente na esporotricose (ZHANG *et al.*, 2019). Muitos testes de diagnóstico molecular como reação em cadeia polimerase (PCR), Nested PCR, real-time PCR, polimorfismo de comprimento de

fragmento de limitação de diferentes alvos gênicos, DNA polimórfico amplificado ao acaso, análises de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado, amplificação por círculo rolante e primers específicos para espécies, foram desenvolvidos visando a detecção de *Sporothrix* spp.. Porém, esses testes apresentam alguns entraves como demora na realização dos procedimentos, etapas complicadas para execução do teste necessitando de equipamentos e mão-de-obra especializadas, sensibilidade insuficiente para diagnóstico e, além da técnica de PCR multiplex, nenhuma outra técnica descrita acima consegue contemplar as principais espécies patogênicas *S. globosa*, *S. schenckii* e *S. brasiliensis* simultaneamente, sendo necessário realizar mais de um teste e conseqüente aumentando tempo e gastos para o diagnóstico (MESA-ARANGO *et al.*, 2002; DE BEER *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2003; NEYRA *et al.*, 2005; KAWASAKI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019)

Desde o início dos anos 70 algumas pesquisas foram realizadas a fim de utilizar testes sorológicos para o diagnóstico da esporotricose, como imunodifusão, aglutinação em tubo, fixação de complemento, aglutinação em látex, imunoblot, teste de imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos. Testes de aglutinação apresentaram sensibilidade de 94% a 96% e especificidade de 98% a 100%, no entanto esses testes perdem a sensibilidade em casos de esporotricose cutânea ou se o paciente apresenta imunossupressão além de apresentarem reações cruzadas com outros patógenos. Outra desvantagem é seu elevado custo, ficando inviável de serem aplicados em regiões de surto ou epidemia, a exemplo do Brasil (ALBORNOZ; VILLANUEVA; DE TORRES, 1984; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2012; DE JESUS *et al.*, 2020).

Após os surtos ocorridos no Brasil no final da década de 90, alguns grupos começaram a estudar ensaios imunoenzimáticos como ferramenta no diagnóstico da esporotricose (FERNANDES *et al.*, 2011; DE JESUS *et al.*, 2020). Os ELISAs desenvolvidos utilizam extrato bruto, antígeno bruto ou preparação antigênica da parede celular do *S. schenckii*, em sua maioria para diagnóstico da esporotricose em humanos, sendo descrito apenas um teste de ELISA padronizado para a espécie felina (BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2005; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007b; FERNANDES *et al.*, 2011; ALVARADO *et al.*, 2015; BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2019).

A entrada do gato na cadeia de transmissão da esporotricose associada à alta virulência da espécie *S. brasiliensis* contribuem para que essa seja uma das principais zoonoses da atualidade. Uma vez que o aumento no número de casos nos gatos está associado ao número de casos em humanos, a esporotricose se enquadra em um grave problema de saúde pública. Com

a falta de informação da população levando ao abandono de animais nas ruas ou descarte inadequado de carcaças contaminadas, ausência de políticas públicas para contenção da doença e, além disso, diagnóstico e início de tratamento tardio, uma vez que o diagnóstico da esporotricose pode demorar até quatro semanas fez a transmissão da doença no Brasil atingir proporções epidêmicas (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Com isso, faz-se necessário o estudo de alternativas para o diagnóstico da esporotricose de forma que o mesmo seja rápido, barato, de fácil realização e acessível a população. Nesse contexto, testes sorológicos como o ELISA se mostram uma excelente alternativa. O presente trabalho propõe a utilização de ferramentas de bioinformática para a predição e seleção de peptídeos com potencial de uso para a desenvolvimento de novos métodos diagnósticos para a esporotricose, além da produção de um teste de ELISA utilizando peptídeos sintéticos para esporotricose em gatos domésticos (*Felis catus*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras - Banco de Soros

As amostras utilizadas para a avaliação de desempenho dos testes foram provenientes de banco de soros oriundos de projetos de extensão desenvolvidos por docentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (“Ações para enfrentamento dos casos de esporotricose animal em Belo Horizonte, Minas Gerais” e “Ações para enfrentamento da esporotricose felina no Distrito Riacho - Contagem, Minas Gerais”), descritas no Apêndice A.

As amostras foram provenientes de animais de vida livre e/ou semi-domiciliados. As amostras negativas foram coletadas de animais hígidos, e as amostras positivas foram provenientes de animais naturalmente infectados, positivos em teste padrão ouro (cultura e isolamento) e exame citológico, além de apresentarem sintomatologia clínica (lesões ulceradas em pele). Para verificação de reação cruzada com outras enfermidades que produzem sintomatologia clínica semelhante, também foram utilizadas amostras de gatos positivos para criptococose, naturalmente infectados, confirmado por cultura e exame citológico e leishmaniose, naturalmente infectados, confirmado em citologia e PCR, sendo os mesmos negativos para esporotricose. Ao todo foram 37 amostras de animais negativos para esporotricose, criptococose e leishmaniose, 25 de animais positivos para esporotricose e negativos para demais enfermidades, três amostras de animais positivos para criptococose e negativos para demais enfermidades, e duas amostras de animais positivos para leishmaniose e negativos para demais enfermidades. Devido a raridade de amostras e dificuldades encontradas no período de pandemia de *SARS-CoV-2* não foi possível a obtenção de amostras de soros de gatos naturalmente infectados positivos para histoplasmose, doença que também seria diagnóstico diferencial devido às características de lesões similares a esporotricose.

4.2 Predição e Seleção de Epítomos para Célula B

Bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foram utilizados para a obtenção de genomas e proteomas de *Sporothrix* spp.. O programa *Immunorank* (LOBO *et al.*, em preparação) desenvolvido no Laboratório de Genômica e Imunologia de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foi utilizado para a seleção de alvos sorológicos. O programa ranqueia as sequências

proteicas do organismo em questão com base em predição de epítomos de célula B e de desordem estrutural. O programa *Immunorank* permite a seleção de proteínas completas, com base em densidade de epítomos ou a seleção de peptídeos de nove a 15 aminoácidos com os maiores escores de predição. Após, foi utilizada a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) onde os alvos selecionados foram comparados com sequências do hospedeiro e, também, com sequências de *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp. e *Leishmania* spp., microrganismos que são diagnósticos diferenciais da esporotricose e/ou apresentam proximidade taxonômica semelhantes ao *Sporothrix* sp., e que poderiam causar reação cruzada. Foram excluídos os peptídeos que apresentaram similaridade e cobertura superiores a 50%. Para confirmação *in vitro* da especificidade e sensibilidade dos peptídeos selecionados na triagem por bioinformática, foram sintetizadas membranas de celulose pré-ativadas e derivatizadas contendo os peptídeos com maior pontuação (*score*) de predição de epítomo de célula B provenientes das análises de bioinformática.

4.3 Síntese de Peptídeos em Membrana de Celulose

O equipamento *Abimed Spot Synthesis* - ASP222 (Langenfeld, Alemanha) foi usado para a síntese múltipla de peptídeos e o programa de computação *Multipeps* (Intavis, Alemanha) foi usado para o plano de distribuição dos aminoácidos e determinação dos protocolos dos diversos peptídeos. Os grupos hidroxilas livres sobre a membrana de celulose servem de ponto de ancoragem para a síntese do peptídeo, sendo estes acoplados através de ligação estável com oito a dez unidades de etilenoglicol, tendo como objetivo afastar o peptídeo do suporte, além de conferir melhor estabilidade na ligação do peptídeo à membrana. O C-terminal do último aminoácido da sequência é onde inicia a síntese do peptídeo. Após desproteção do grupo ligado ao 9-fluorenilmetil-oxicarbonil pela adição de 20% de piperidina em dimetilformamida (DMF), as funções aminas são recuperadas e podem ser visualizadas pela coloração azul de bromofenol. Logo após, 150µL de cada aminoácido são ativados por DIC/HOBT (N-N' diisopropilcarbodiimida / hidroxibenzotriazol) e depositados para reinício de outro ciclo, no qual os ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. As funções aminos (NH₂) livres ou que não reagiram são acetiladas em anidrido acético 10% em DMF, para evitar a formação errônea de peptídeos ou outras ligações indesejáveis. Ao final da síntese, os grupos laterais dos aminoácidos são desprotegidos pela adição de ácido trifluoroacético associado a diclorometano e trietilsilano, fazendo com que os peptídeos permaneçam fixos de forma covalente sobre a membrana.

4.4 Imunoensaio com Peptídeos Ligados à Membrana

A capacidade de discriminação dos peptídeos foi avaliada submetendo as membranas à experimentos de reatividade contra *pool* de soros de felinos: *pool* de soros de animais negativos para esporotricose, criptococose e leishmaniose (Grupo A), *pool* de soros de animais positivos para esporotricose (Grupo B), *pool* de soros de animais positivos para criptococose e negativos para esporotricose e leishmaniose (Grupo C) ou *pool* de soros de animais positivos para leishmaniose e negativos para esporotricose e criptococose (Grupo D). As membranas contendo os peptídeos foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS) Tween 1% durante dez minutos cada, e incubada posteriormente com solução de bloqueio (albumina sérica bovina (BSA)) 5% e sacarose 4% em PBS 1x e pH 7,4), por 18 horas em temperatura ambiente sob agitação constante. As membranas foram lavadas mais três vezes por dez minutos em solução PBS Tween 1% após o bloqueio e incubadas com os *pools* de soros de animais dos grupos A, B, C e D, diluídos em solução PBS Tween 1% (diluição 1/500) por 120 min à 37°C em agitação. Após novas lavagens, foram adicionados os anticorpos conjugados com fosfatase alcalina diluídos em solução PBS Tween 1% (1/10.000) que foram mantidos sob agitação por 60 minutos em temperatura ambiente. Após três novas lavagens com T-TBS (do inglês: *Tris Buffered Saline with Tween*) a membrana foi transferida para bandeja do fotodocumentador digital LAS4000 (GE Healthcare, EUA) sobre a qual foi adicionada quantidade suficiente de Luminata Forte™ (Millipore Corporation, EUA) para cobrir a membrana. As leituras de reatividade foram realizadas e os dados analisados no *software* ImageJ (NIH, EUA). Os peptídeos que apresentaram reação na membrana foram selecionados para a montagem de peptídeos solúveis. Após a leitura, a membrana foi lavada três vezes com DMF por dez minutos em temperatura ambiente e agitação constante e foi incubada com solução desnaturante (ureia 8M e dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%) por 18 horas em temperatura ambiente e agitação constante. Logo após, foi lavada mais duas vezes com a solução desnaturante por 30 minutos, duas lavagens com água Milli-Q (Merck, Alemanha) por dois minutos e três lavagens com solução ácida (55% de etanol, 35% de água deionizada e 10% de ácido acético) por dez minutos. Após, foi realizada mais duas lavagens em água Milli-Q (Merck, Alemanha) por dois minutos e mais duas lavagens com etanol 100% por cinco minutos para remover toda a umidade. Ao final, a membrana secou em temperatura ambiente e foi armazenada a 4°C podendo ser reutilizada.

4.5 Síntese de Peptídeos Solúveis e Confirmação por MALDI/ToF

Os peptídeos selecionados foram então sintetizados em uma escala de 25 μ mol no ResPep SL sintetizador automatizado (Intavis[®], Alemanha). Os aminoácidos foram ativados com uma solução 1:1 de Oxyma Pure (Merck, Alemanha) e N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich, EUA). Logo após, os aminoácidos ativados foram incorporados às resinas TentaGel (Intavis[®], Alemanha) ou H-Rink Amide ChemMatrix (Sigma-Aldrich, EUA). A desproteção da 9-fluorenilmetil-oxicarbonil foi realizada repetidamente até que a síntese de cada peptídeo fosse completada utilizando 4-metilpiperidina 25% (25% v/v em DMF). Os peptídeos foram extraídos da resina através de um tratamento com uma solução contendo ácido trifluoroacético (92,5%), água (2,5%), triisopropilsilano (2,5%) e beta-mercaptoetanol (2,5%) em três horas sob agitação. O peptídeo foi precipitado com uma solução fria de metil terc butil e posteriormente liofilizado. Foi utilizada espectrometria de massas através do equipamento MALDI/TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, EUA) para a confirmação da massa molecular do peptídeo. Uma alíquota de 0,5 μ L de amostra concentrada do peptídeo foi misturada com 0,25mL de uma solução de matriz saturada [10mg/mL α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, EUA) e 50% de acetonitrila/0,1% de ácido trifluoroacético para a análise por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI/ToF). A amostra foi aplicada a uma placa MTP AnchorChip TM 600/384 (Bruker Daltonics, EUA) e secou a temperatura ambiente. Os dados brutos foram obtidos no MALDI/TOF Autoflex Speed utilizando um modo positivo/refletor controlado através do software FlexControlTM 3.3. (Bruker Daltonics, EUA) Foram utilizados peptídeos de referência (Peptide Standard, Bruker Daltonics, EUA) para a calibração do instrumento. Cada espectro foi produzido acumulando dados de, pelo menos, 200 lasers consecutivos de 127 disparos. Após a confirmação dos peptídeos por MALDI/ToF, os mesmos seguiram para as etapas de padronização de teste de ELISA para a espécie felina (*Felis catus*).

4.6 Produção de Antígeno Bruto de *Sporothrix brasiliensis*

Para a preparação do antígeno bruto foi utilizada a forma micelial do fungo *Sporothrix brasiliensis*, confirmado por PCR, seguindo método adaptado de Mendonza *et al.* (2002). A espécie *S. brasiliensis* foi selecionada por ser considerada a mais patogênica e por estar associada diretamente à transmissão zoonótica da esporotricose. A amostra, previamente caracterizada em fase micelial, foi inoculada em caldo Sabouraud dextrose seguido de

incubação a 30°C em agitador rotatório a 150 rpm por 14 dias. A cultura foi inativada pela adição de Timerosal (Sigma-Aldrich, EUA) (0,2g/L) por 48 horas em agitação a 150 rpm e temperatura ambiente (25°C). Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de acetato de celulose 0,45µm (Sartedt, Brasil). O filtrado foi concentrado por liofilização. A concentração de proteína foi medida pelo kit PierceTM BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA) e padronizada para 4500 µg/mL de forma a facilitar sua diluição e utilização. Após, o mesmo foi conservado sob refrigeração (4°C) até seu uso no teste de ELISA.

4.7 Ensaio de ELISA anti-IgG e anti-IgM

Após a síntese e confirmação dos peptídeos deu-se início a padronização de testes sorológicos utilizando a técnica de ELISA para felinos domésticos (*Felis catus*). Inicialmente, foram realizados estudos pilotos para a determinação da concentração de peptídeos, diluição de soros e diluição de anticorpos secundários. Para avaliar a melhor diluição de soros foram realizados testes em duas diferentes diluições (1:50, 1:100, v/v em PBS), para verificar a melhor concentração dos peptídeos, os testes foram realizados com quatro concentrações diferentes (100ng/poço; 500ng/poço; 1000ng/poço; 2000ng/poço) e para as diluições do anticorpo secundário, foram utilizadas as diluições 1:5000, 1:10.000, 1:20.000 e 1:30.000, v/v em PBS. Para o ensaio de ELISA foram utilizados os conjugados anti-IgG e anti-IgM marcados com peroxidase. Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon[→], BD Lab., EUA) de 96 orifícios e fundo plano para as reações. Os orifícios foram sensibilizados com 0,1µg de cada peptídeo ou com antígeno bruto de *S. brasiliensis* diluídos em 100µL de tampão carbonato. Em seguida as placas foram incubadas por 16h a 37°C. Após o período de sensibilização foram adicionados 150µL de solução para o bloqueio (BSA 5%) de sítios inespecíficos em cada orifício, seguindo de nova incubação a 37°C por 60 min. O excesso de solução de bloqueio foi retirado por três lavagens sucessivas. Os soros dos animais infectados com *Sporothrix* sp. foram diluídos 1:50.000 em tampão de incubação (BSA 2,5) e 100µL dessa solução foram aplicados em cada orifício. Foi realizada, em seguida, uma incubação por 60 min. a 37°C e o excesso do soro diluído foi removido por uma série de cinco lavagens (PBS 1X + Tween 20 0,5%). O conjugado foi diluído em 1:10.000 e 100µL, desta solução, acrescentados em cada orifício. Após nova incubação por 60 min. a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. Foi então, preparada a solução do substrato com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e acrescentados 100µL desta em cada orifício. O cromógeno utilizado foi o orto-

fenilenodiamina (OPD, Sigma Aldrich, EUA). A reação foi realizada por dez minutos em temperatura ambiente, sendo interrompida pela adição de 25µL de 4 N ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Merck, Alemanha), em cada orifício. Após cada lavagem, em todas as etapas descritas acima, as placas foram secas por inversão sobre papel absorvente. Foi, também, realizado um teste de ELISA adicionando 100µg/poço de ureia na concentração 6M em solução PBS-Tween 0,05% durante 0, 5, 10 e 20 minutos após a etapa de incubação das amostras de soro seguindo a metodologia proposta por Coelho e colaboradores (2019). As reações foram lidas em leitor de ELISA (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA) a 492 nm e os resultados expressos em valores de absorbância.

4.8 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas foi usado o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., EUA) e o programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft®, EUA). Os cálculos da normalidade dos dados foram avaliados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram detectadas por meio de teste t não pareado.

5 RESULTADOS

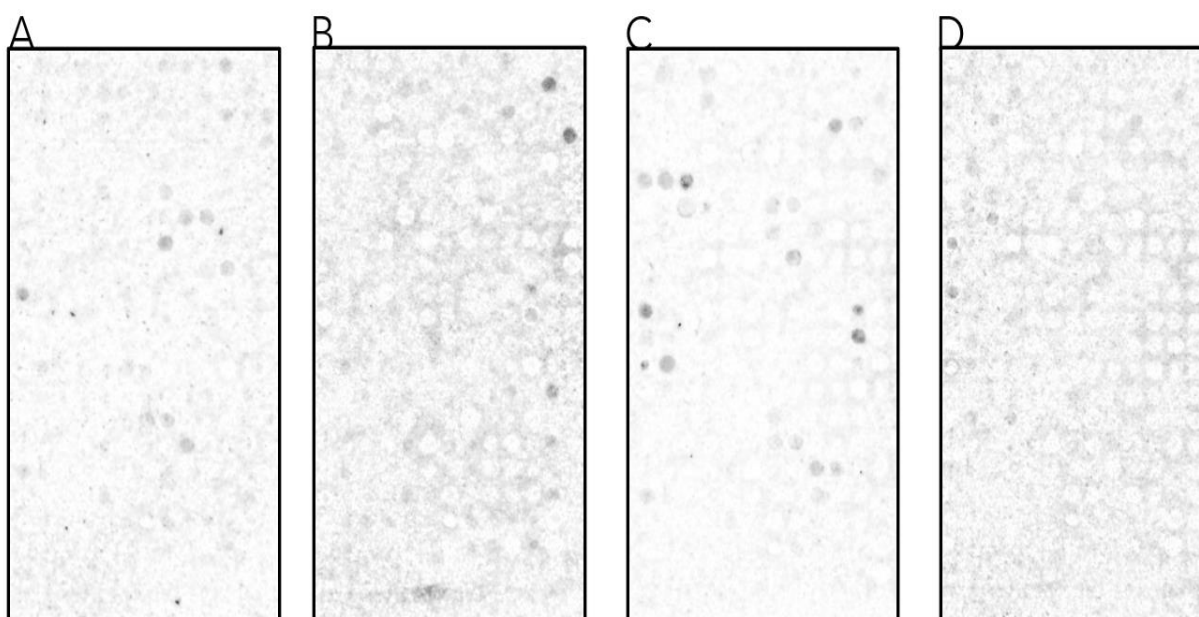
Após a utilização de ferramentas de bioinformática para a predição e seleção de epítomos de células B, foram selecionados 231 peptídeos com potencial uso para desenvolvimento de testes diagnósticos para a esporotricose (FIGURA 6).

FIGURA 6 - Peptídeos de células B para diagnóstico da esporotricose felina preditos pelo programa *Immunorank*.

GPGRPTSPPTGT	PESEDPDPDPRP	NSEDDPDDTKPPPQ	PPGNGPPSGPRAPG	PGPNGPPSGPRAPGA
PTESDTEPGGSSP	PNNPPAPPGEAGATP	EETGPKKPEPDPE	AAQSPAPRAPPSP	PGSDTESDTEPGG
DPPASGGGGGGG	NNPPPPPSASSST	TPGPKKPEPDPEPA	GPGGGRTSPPT	KPKPEPDEPAPAPA
NGPPGNGPPSGPRA	QDPPPTQPPQPGQQ	GNPSPSGPRAPGAP	FAPGNGPPGNGPP	SRATDPPDPDPDP
PQFAPGNGPPGPNQ	NNPPAPPGEAGATP	SQAAPGPGGPGGP	PGGGRTSPPTG	TPPNNPPAPPGEAG
TQDPPPTQPPQPNQ	TQDPPPTQPPQPGQ	DGPGSDTESDTEP	VNGGAPPPPPQQQ	PGRGGGGGGQPTS
GTPADQPPPTTTT	TPESDPDPDPRP	DPTESDTEPGGSS	RPGTPADQPPPTT	PQDQGGPPAPPAP
AAGPSPPAGPPQGG	EPGSGGGSPPPAP	NQQPSQGGPPSPSRP	GPGSDTESDTEPG	ESEDPDPDPRPG
PNQQPSQGGPPSPSR	TVTSTSPPTTQ	KPEPDEPAPAPAPA	EDDDTTPKPPQPT	QGGSTPDSPPPPV
DPPPTQPPQPNQQQ	TDPDPDPDPDKPM	PASGGGGGGGPR	GPKKPEPDEPAPA	ATDPPDPDPDPDK
GGWGNPPGPNPY	PPNPPAPPGEAGA	QFAPGNGPPGNGP	PGTPADQPPPTT	APDGNPDDGDP
PEQEPEPEEAES	PLGTPGSGSGPPG	GSDTESDTEPGGP	TRGTPADQPPPT	DPPPTQPPQPGQQQ
PAGPPQGGQPKPSQ	HNAGQPPNPPNPPN	ASGGGGGGGPRP	PPPPPSRRAAGG	STPPNPPAPPGE
GPPGNGPPSGPRAP	QPPPHGGPPQVAG	PNGPPGNGPPSGPR	PGGRTPPTGTR	PPNPPAPPGEAGAT
GGNEDDPTKPP	EDPEDPEDGADDD	QPSQGGPPSPSRPS	QQPSQGGPPSPSRPS	TPPNNPPAPPGEA
SDPTESDTEPGGPS	GDSEDPEDPEDGDA	AASSESTPTPPPP	AGPPQGGQPKPSQA	ASTAAAPPPGPAP
SDPPASGGGGGGP	GPLSPRGGPPSPRG	GNEDDPTKPPP	GWGNGPPGPNPY	QPPGASGSGGPT
SDAPPPPPSGDQ	PGPPRGGPEDDGD	SEDDPDTKPPPQ	APGNGPPGNGPPS	PDYGPSPGGGPT
QDPPPTQPPQPNQ	PSDPPSTAPNPPTS	NGGAPPPPPQQQ	AGSPAPGPPGQGP	QDQGGPPAPPAPS
DAPPPPPSTSGDQR	QTPPPPTDAPQT	QDSGSTPDSPPPPV	ETGPKKPEPDPEP	PTGSTPPNPPA
PPPPQESESEQPKQA	SGSTPDSPPPPVPA	DSGSTPDSPPPPV	GSTPDSPPPPVPAD	SPTPEAPTDPAPA
SPPPPSPSDDGPF	GPGGPRGGPEDDGD	APPATPQPTEQPQ	PPPTSPPPQPPGH	PSSNPPASSPPSDP
HQPPPPQPPQGA	SDREPSQQPPPPP	SPPSPPSTAPNPP	PPSPRGGPPSYGAQ	GQADGPPPPESSPP
KQAPPPPTQDPPPTQ	PPPPQPSKKA	ETETGPTSEPPPP	PPAPEEKKGGPPQ	TETGPTSEPPPPPL
KQPTPEPEPEPEP	PPPPGAEVPEE	SNPPASSPPDPPS	HGGGPPRGGPEDD	DSEDPEDPEDGADG
PADGAPGSPPPSE	DSDSPPPPAAPS	PPTSPSPQPPQGH	SSPPSPPSTAPNP	PPATPQPTEQPQT
PATAPPPGGPPEGH	PPQGAAPDEDEDEP	TGQADGPPPPPESS	DGQADGPPPPPESSP	PPPPQGAAPDEDE
TPSPTPEAPTDP	PPPPSPSGTTAGG	SDPPSSTAPNPPTST	PEAPPATPQPTEQ	GSDSDSPPPPAAPS
SPADGAPGSPPPS	PETETGPTSEPPPP	PATPQPTEQPQTP	TPETETGPTSEPP	PPPPPADSHDGNAD
APTSPTEAPTDP	QADGPPPPPESSPPG	PPRGGPEDDGD	GGPPRGGPEDDGD	PPSDPPSSTAPNPPT
HGSSGQPPPPPP	PPASSPPDPPSTA	HGGGPPRGGPEDD	SPPPPSPSGTTAG	PPPPQGAAPDEDE
DPAPTSPTEAPT	PPPPPADSHDGN	APPEEKKGGPPQPR	PPQGAAPDEDEDE	EPTEPPAEPPEQ
PSPPPPPATQEEEG	PPPPGAEVPEED	PPASSPPDPPSST	EQPPTPPPPQTPDA	DSDREPSQQPPPPP
STPDSPPPPVPADD	SEPTSPTPSPTDKD	QQQQRPPPPPPPTS	EAPPATPQPTEQP	PEEEKKGGPPQPRP
PSPADGAPGSPPP	TSEPTSPTPSPTDK	TEQPPTPPPPQTPD	SEDPEDPEDGADG	PPQTPDAPQTPTPT
PPSPADGAPGSPPP	RSPPPSPPSDDGDP	NPPASSPPDPPSS	SLPDQSPQPPPGPT	KSTTPSSPPTSEPT
HSNPSPPQPPPP	PPPPQESESEQPK	KPQEPTPKPERPQ	KKKQPEPTPKPE	PPPSPPSGTTAGGG
SPDAPTSPTEPA	PGGVDGPPGGGSP	PPPPQGAAPDDED	PASSPPDPPSSTAP	ATDQADGPPPPPE
GSGSTPDSPPPPVP	SPPPPPATQEEEGE	ATPQPTEQPQTPP	GPPRGGPEDDGD	PAPEEKKGGPPQ
EQPKQAPPPPTQDPP	QNRSSPPGPPQPP	ASSPPDPPSSTAPN	PTSEPTSPTPSPTD	PRGGPEDDGD
GGGVDGPPGGGG	YGGGAPNGGGGG	PHHGGGGPPGPPED	SSNPPASSPPDPP	KPKQPEPTPKPER
PPPPQESESEQPKQ	SEQPKQAPPPPTQD	ASPNRKGPPPPPP	TAPPKKGGPPKKT	PPPTQPPAPESDA
EYTPESDPDPDP	YTPESDPDPDPDP	DEPPPPQRQTQPPQ	PSGHHGSPPPAPPT	AQPPGASGSGG
TGPSTTPPNNPPAP	VDEPPPPQRQTQPP	DQGGPPAPPAPSQ	PVDEPPPPQRQTQ	SEPDPDPDPRPGF
RATDPPDPDPDP	DGPGSPRRPSPSP	APTGPSTTPPNNPP	QGGPPAPPAPSQ	QSPPPPPATQEE
DGPNPDDGDPDK	DYPGSPGGGTE	ESPYEPPDYGPS	LGTPGSGSGPPGP	GQTPPPPPGWGQPP
		KDEPSGHHGSPPP		

Em seguida, esses 231 peptídeos selecionados foram sintetizados em membrana de celulose pré-ativadas e derivatizadas e submetidos a ensaios de *immunoblotting*, onde foram utilizados *pool* de soros de animais dos grupos A, B, C ou D. Os resultados podem ser observados na FIGURA 7, onde quanto maior a reação do *spot* do peptídeo, mais forte e escura a coloração deste na membrana.

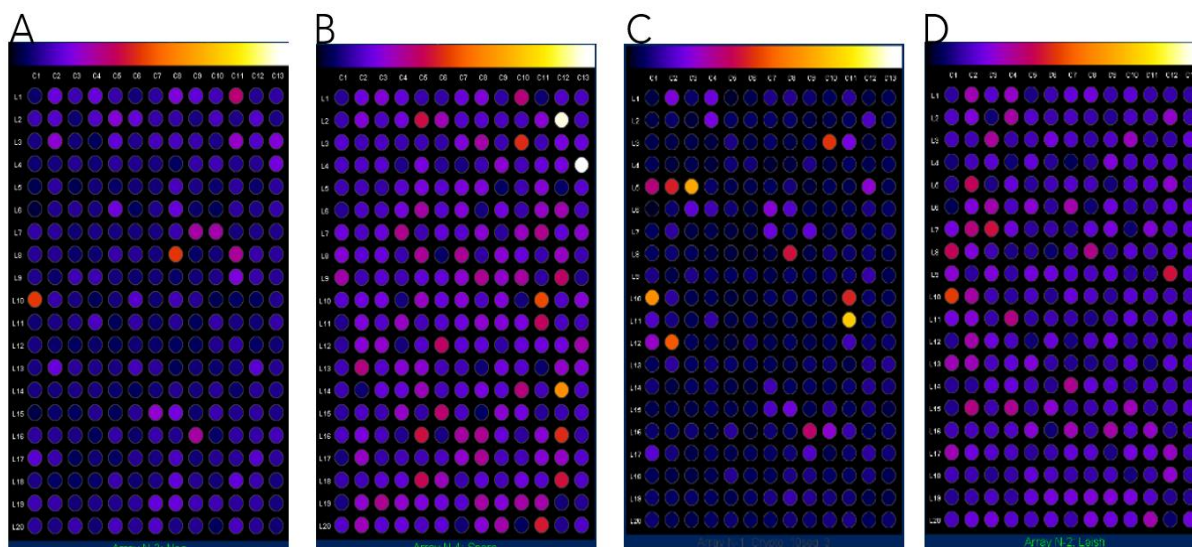
FIGURA 7 - Membranas reveladas com Luminata (Sigma Aldrich, EUA) em fotodocumentador digital LAS4000® (GE Healthcare, EUA).



A) *Pool* de soros de animais negativos para esporotricose, criptococose e leishmaniose; B) *Pool* de soros de animais positivos para esporotricose; C) *Pool* de soros de animais positivos para criptococose e negativos para esporotricose e leishmaniose; D) *Pool* de soros de animais positivos para leishmaniose e negativos para esporotricose e criptococose. Quanto maior a reação do peptídeo, mais escura a coloração do *spot* na membrana.

O software ImageJ foi utilizado para as análises densitométricas. Consideram-se pouco reativos os *spots* de peptídeos com a coloração mais próxima ao branco e mais reativos a coloração mais próxima da cor preta, conforme os mapas de calor na barra acima de cada imagem (FIGURA 8). Foram considerados bons alvos os *spots* de peptídeos que apresentaram reatividade no mapa de *pool* de animais positivos para esporotricose e não apresentaram reatividade nos demais *pools*.

FIGURA 8 - Mapas de calor normalizados das membranas pelo programa ImageJ (NIH, EUA).



A) *Pool* de soros de animais negativos para esporotricose, criptococose e leishmaniose; B) *Pool* de soros de animais positivos para esporotricose; C) *Pool* de soros de animais positivos para criptococose e negativos para esporotricose e leishmaniose; D) *Pool* de soros de animais positivos para leishmaniose e negativos para esporotricose e criptococose. Quanto maior a reação do peptídeo, mais próximo da cor branca o *spot* na membrana, seguindo o padrão de mapa de calor acima de cada grupo.

Os peptídeos solúveis que obtiveram melhor *score* no grupo B, ultrapassando o valor de *cut-off*, e que obtiveram valores abaixo do *cut-off* nos demais grupos foram selecionados (QUADRO 1). O *cut-off* para a seleção dos peptídeos foi determinado como a média mais três vezes o desvio padrão.

QUADRO 1 - Análise densitométrica dos *spots* selecionados nos ensaios de *immunoblotting*: Peptídeos selecionados após análise densitométrica utilizando o software ImageJ.

Posição na membrana	Peptídeo	Análise de densitometria				Razão positivo: negativo
		Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	
C12L2	S-P-T-P-E-P-A-P-T-P-D-P-A-P-A	7871	42793	7268	11514	5,43679
C12L14	T-P-S-P-T-P-E-P-A-P-T-P-D-P-A	5124	28081	4868	6796	5,48028
C13L4	S-P-D-P-A-P-T-P-S-P-T-P-E-P-A	9616	45230	2646	6768	4,70361
C6L12	S-E-P-D-P-D-P-D-P-D-P-R-P-G-F	3796	16713	3720	9016	4,40279
C8L9	E-Q-P-Q-P-T-P-P-P-Q-T-P-D-A	3107	14322	3211	7501	4,60959

Valores dos resultados gerados pela análise densitométrica do software ImageJ

Média= 5379,423 Desvio Padrão= 2662,624 Média mais três vezes o desvio padrão= 13367,3 (*cut-off*)

Observou-se que três peptídeos apresentaram sequências semelhantes entre si, e foi realizada a combinação dos peptídeos em “janela deslizante” de forma a obter um único peptídeo. Outros dois peptídeos também apresentaram boa reatividade, porém não apresentavam sequências semelhantes, portanto não seriam combináveis. Foram então selecionados três peptídeos para dar continuidade nos testes (FIGURA 9).

FIGURA 9 - Sequência dos peptídeos com potencial uso para o diagnóstico da esporotricose.

Combinação de peptídeos em “janela deslizante” em um alvo único:

SPTPEPAPTPDPAPA
 TPSPTPEPAPTPDPA
 SPDPAPTPSPTPEPA

 SPDPAPTPSPTPEPAPTPDPAPA

Peptídeos diferentes, não combináveis em uma janela:

SEPDPDPDPDRPGF
 EQPQTPPPPQTPDA

No final, 3 peptídeos:

Pep1: SPDPAPTPSPTPEPAPTPDPAPA
 Pep2: SEPDPDPDPDRPGF
 Pep3: EQPQTPPPPQTPDA

O peptídeo Pep1, foi denominado de Peptídeo PepSPSK.

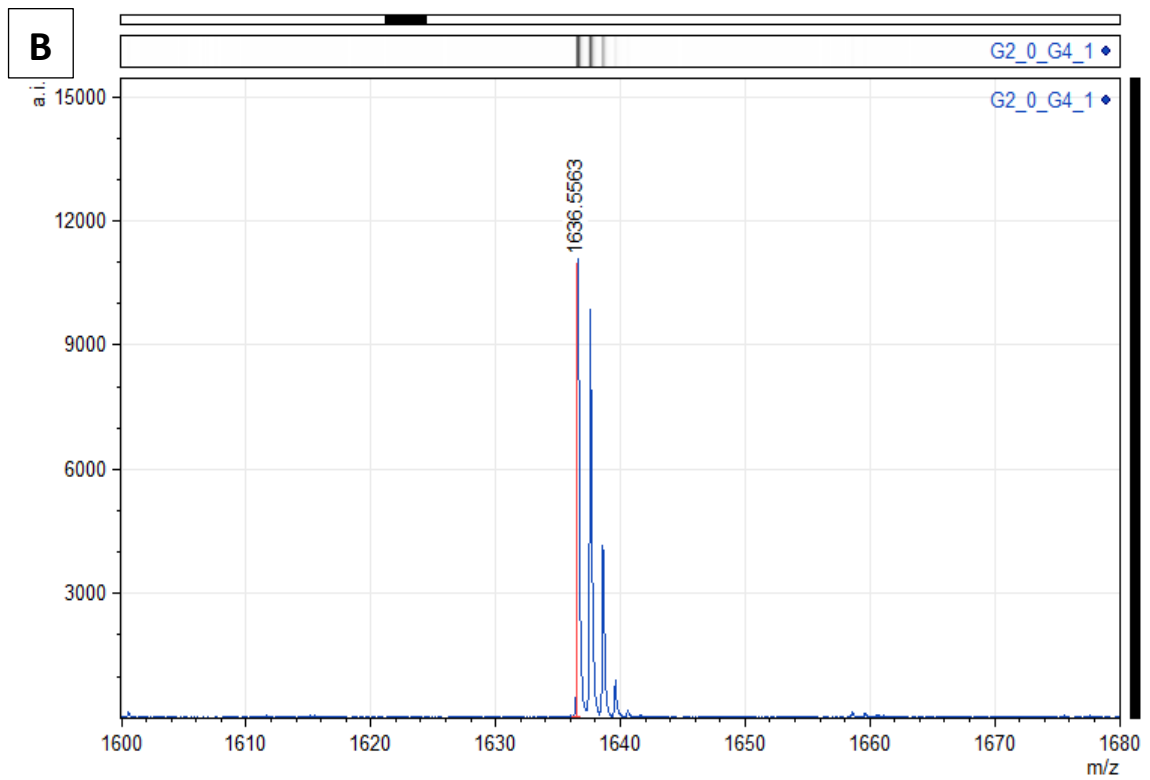
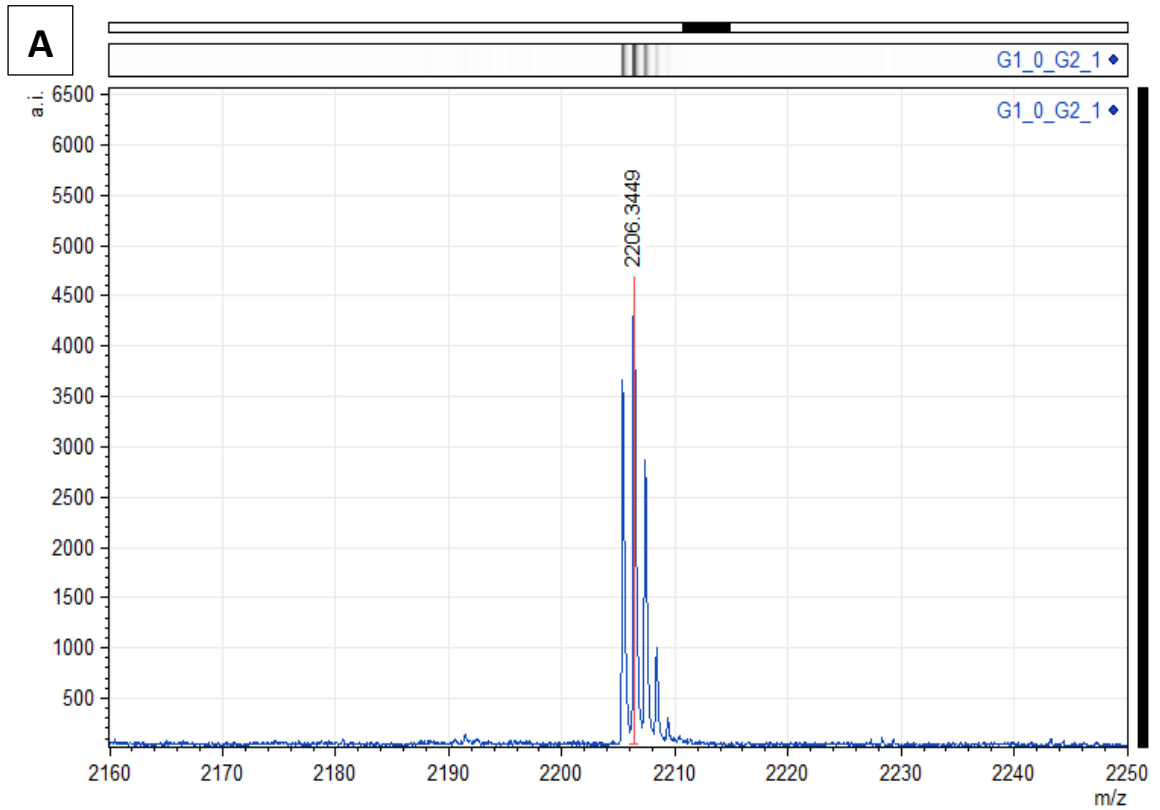
Os três peptídeos solúveis selecionados na etapa anterior foram sintetizados, e apresentaram massa molecular conforme o QUADRO 2. A espectrometria de massa por MALDI/ToF foi utilizada para confirmação da identidade dos peptídeos após a síntese, conforme FIGURA 10.

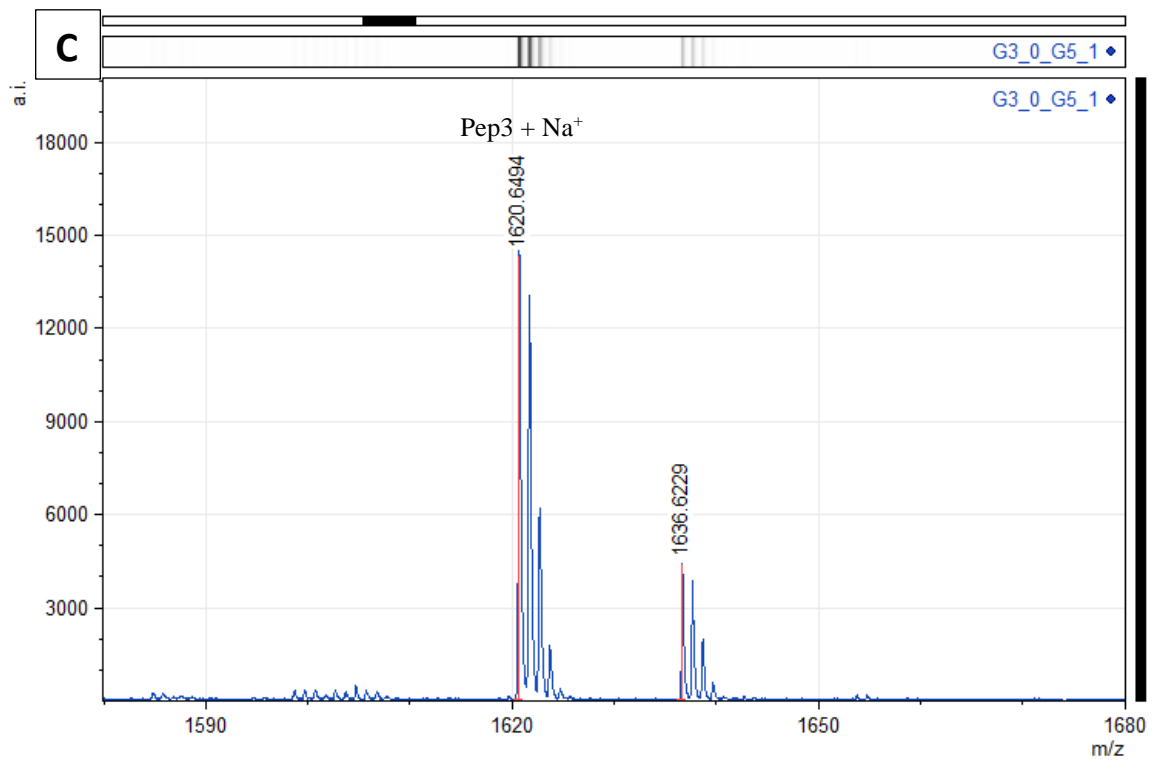
QUADRO 2 - Sequência dos peptídeos com potencial uso para o diagnóstico da esporotricose, e suas respectivas massas moleculares, confirmadas por MALDI/ToF.

NOME	SEQUÊNCIA	Nº AA	MASSA MOLECULAR (g/mol)
PepSPSK	SPDPAPTPSPTPEPAPTPDPAPA	23	2206,34
Pep2	SEPDPDPDPDRPGF	15	1635,72
Pep3	EQPQTPPPPQTPDA	15	1597,77

Nº AA= Número de Aminoácidos

FIGURA 10 - Gráfico do MALDI/ToF para a confirmação das massas moleculares dos peptídeos solúveis sintetizados. A) PepSPSK B) Pep2 C) Pep3.





Após a síntese e confirmação dos peptídeos, estes seguiram para os ensaios de otimização para o desenvolvimento do teste de ELISA. Foram realizados estudos piloto para avaliar a melhor diluição dos soros (FIGURA 11), a melhor concentração dos peptídeos solúveis (FIGURA 12) e do anticorpo secundário (FIGURA 13). Em seguida, também foram realizados testes utilizando antígeno bruto.

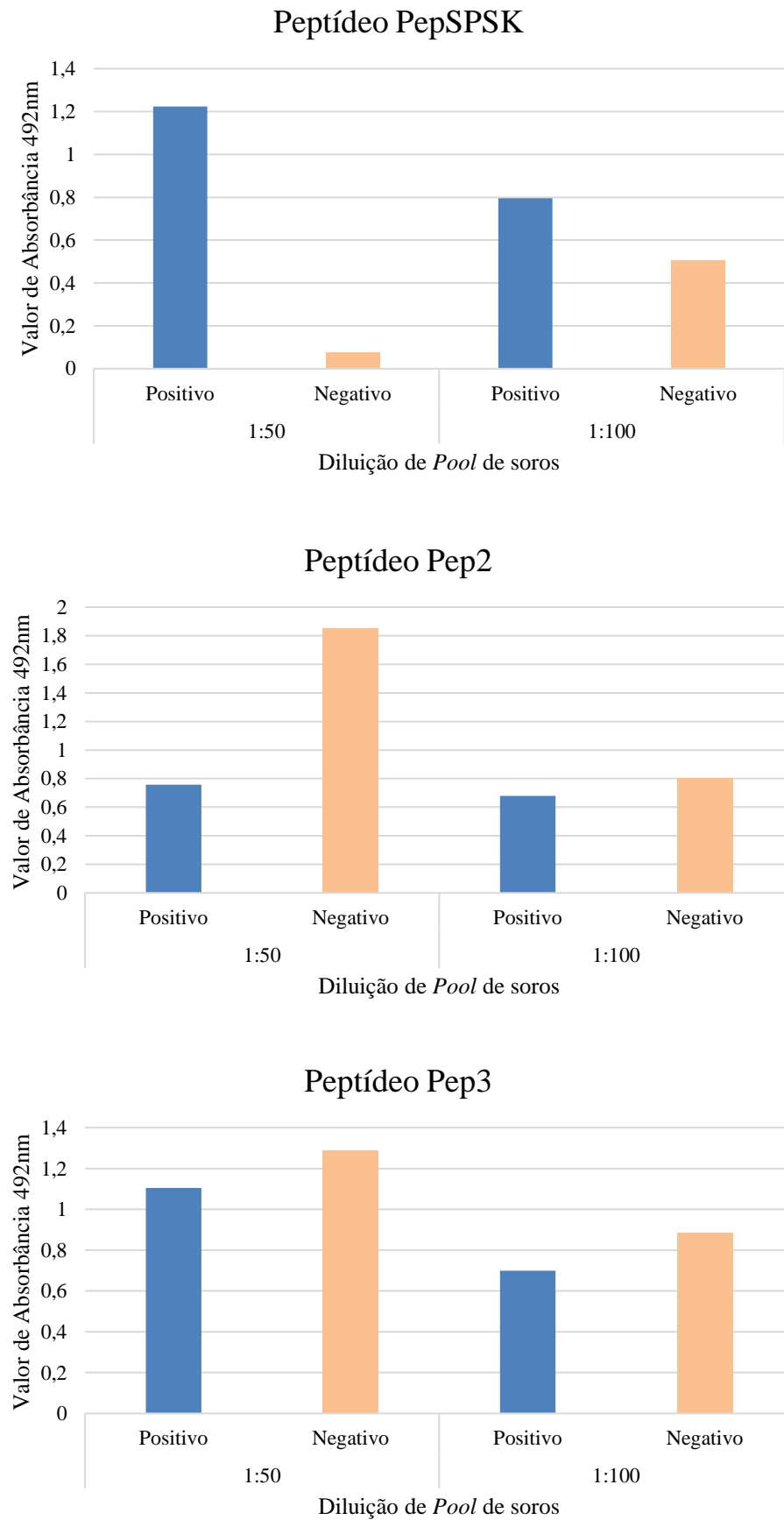
FIGURA 11 - Resultados de teste de ELISA em diferentes diluições de *pool* de soros.

FIGURA 12 - Resultados de teste de ELISA em diferentes concentrações dos peptídeos solúveis.

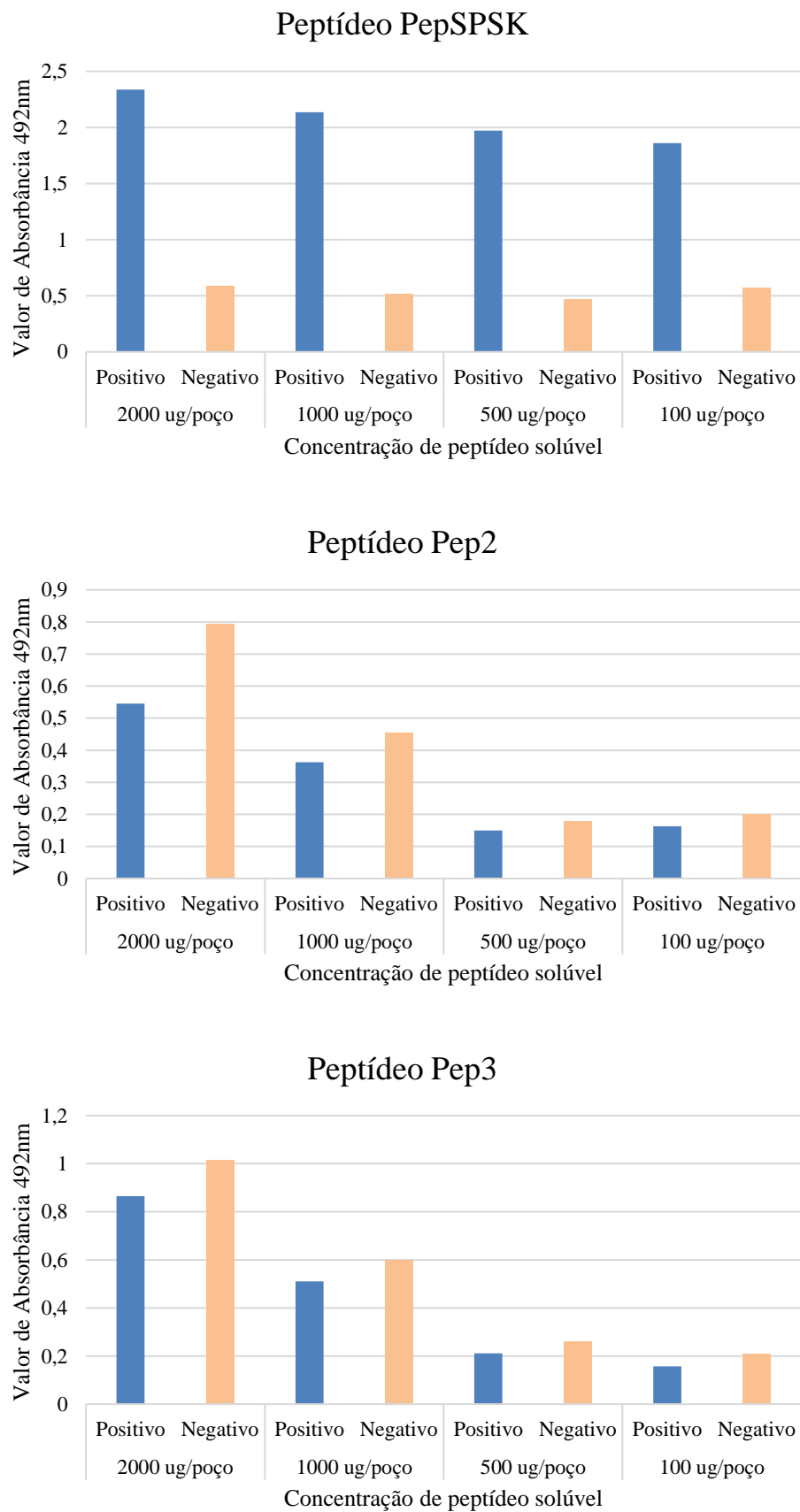
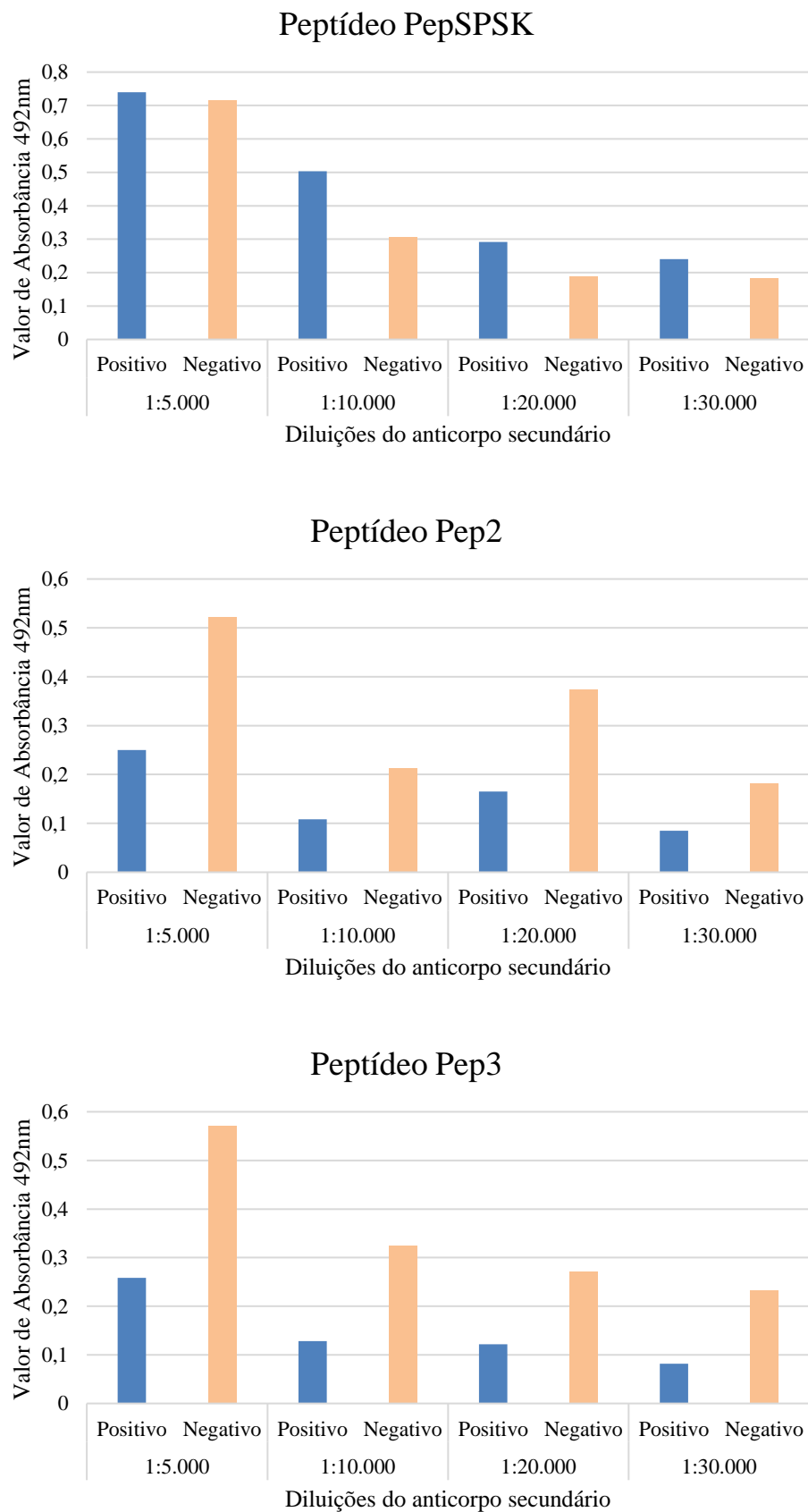


FIGURA 13 - Resultados de teste de ELISA em diferentes diluições do anticorpo secundário.

Foi selecionada a diluição 1:50 para os soros, uma vez que esta apresentou melhor razão entre as densidades ópticas dos grupos positivos e negativos.

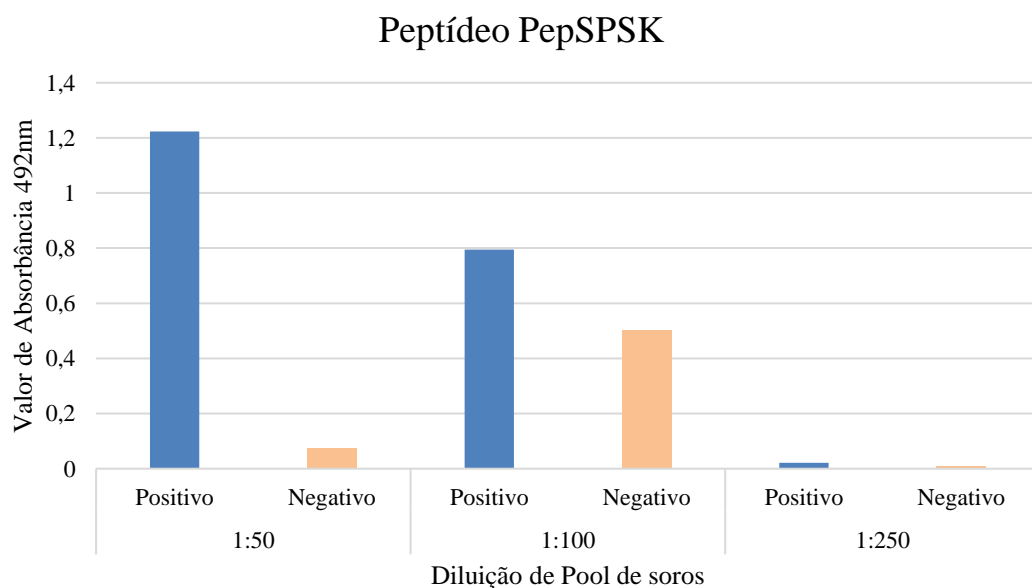
A concentração dos peptídeos solúveis selecionada foi de 1000ng/poço, e para diluição do anticorpo secundário foi selecionada a diluição 1:10.000 uma vez que a razão das densidades ópticas entre os grupos positivos e negativos foi superior nessa concentração e diluição, respectivamente.

Nesse momento, observamos que apenas o Peptídeo PepSPSK apresentou boa discriminação entre positivos e negativos, enquanto os outros dois peptídeos não diferenciaram adequadamente entre os grupos.

Com isso, apenas o peptídeo PepSPSK seguiu para a realização dos demais ensaios. Com base nesses resultados, o teste de ELISA foi padronizado da seguinte forma: diluição do soro 1:50, concentração de antígeno 1000ng/poço e diluição do anticorpo secundário 1:10.000. Assim, o presente trabalho conseguiu desenvolver um teste de ELISA indireto e prosseguiu-se para as etapas de avaliação do desempenho analítico do teste.

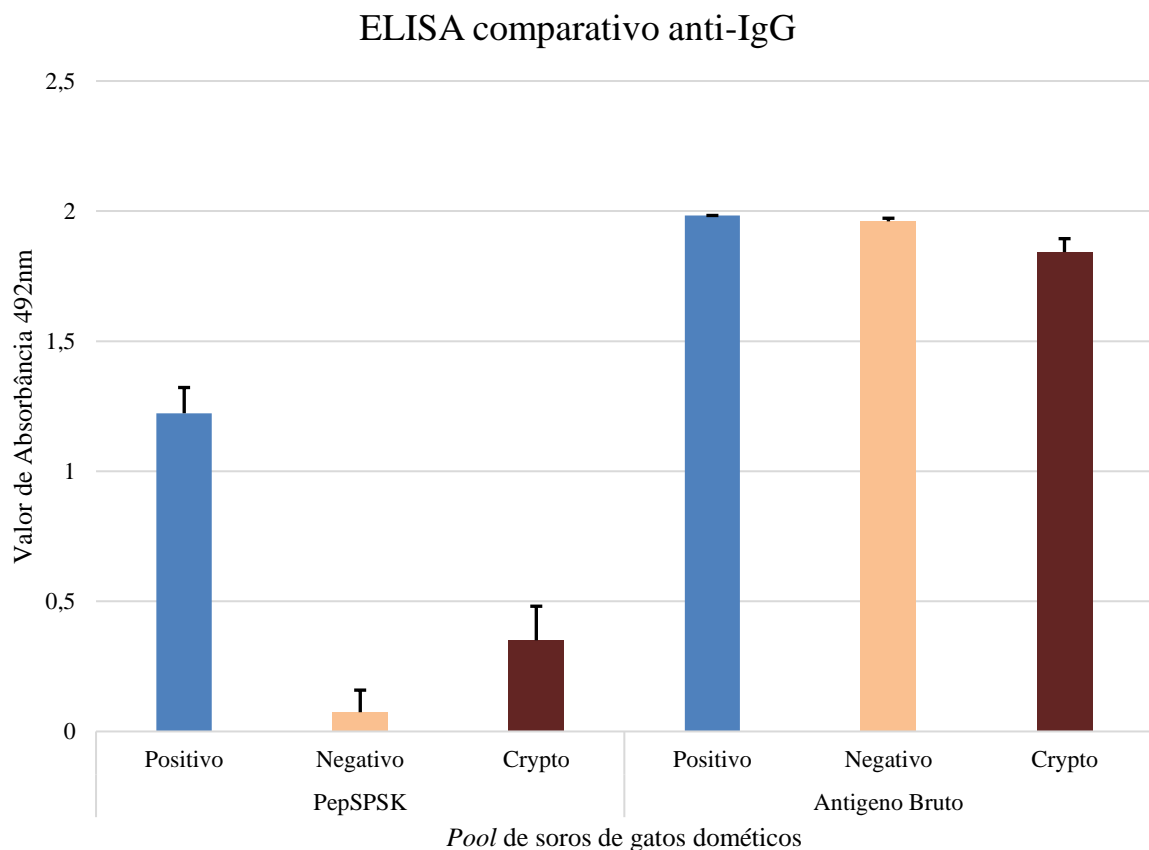
Para a avaliação da sensibilidade analítica foram realizadas diluições do soro para verificar a menor concentração detectável de anticorpos anti-*Sporothrix brasiliensis* (FIGURA 14). Na diluição 1:250 não houve resposta detectável, sendo assim, a diluição 1:100 foi considerada como da sensibilidade analítica do teste.

FIGURA 14 - Gráfico representativo da análise de sensibilidade analítica do peptídeo sintético PepSPSK.



Para avaliar a especificidade analítica, descrita como a capacidade do teste em diferenciar o analito alvo de possíveis analitos que gerem reações cruzadas no teste foi realizado um ELISA comparativo utilizando *pool* de soros dos animais positivos para esporotricose e *pool* de soros de animais positivos para criptococose. Devido a raridade da amostra e pouca quantidade de soro obtida, não foi possível realizar a comparação com grupo de animais positivos para leishmaniose. Observamos que o peptídeo sintético foi capaz de diferenciar significativamente entre os grupos ($p < 0,05$), e ressaltamos que o antígeno bruto não foi capaz de diferenciar o *pool* de soros de animais positivos para esporotricose do *pool* soros de animais positivos para criptococose ($p > 0,05$) (FIGURA 15).

FIGURA 15 - Gráficos representativos da análise de especificidade analítica do peptídeo sintético PepSPSK e do antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* utilizando *pool* de soros de gatos domésticos.

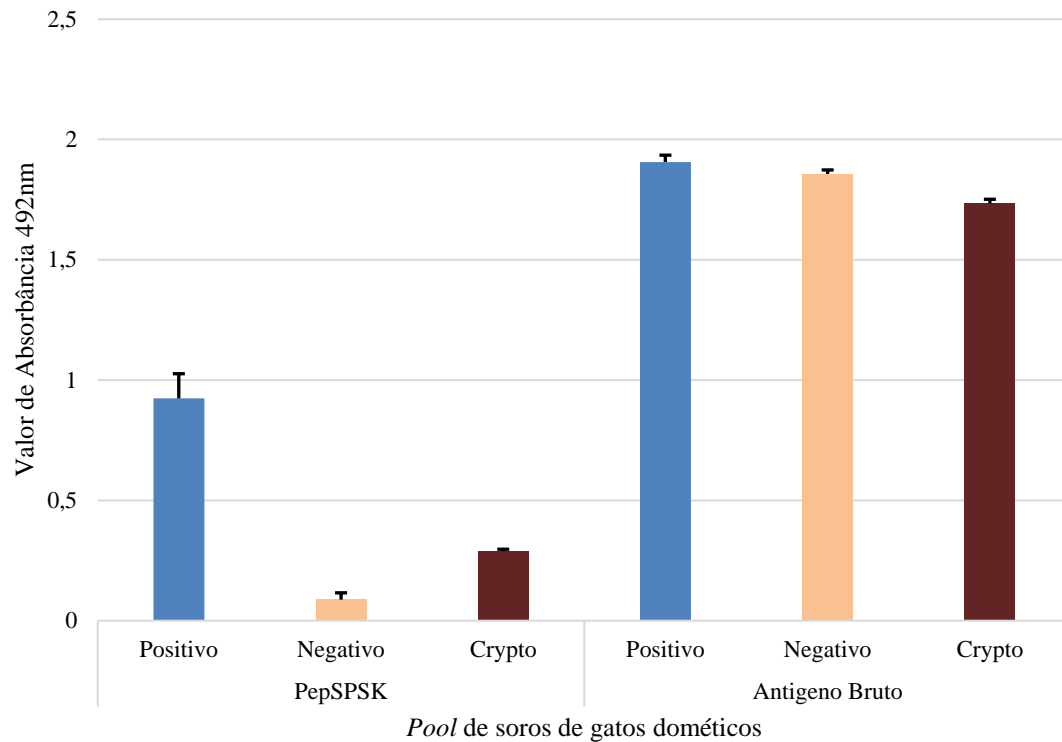


Positivos: *Pool* de soros de animais positivos para esporotricose.

Negativo: *Pool* de soros de animais negativos para esporotricose e criptococose.

Crypto: *Pool* de soros de animais positivos para criptococose e negativos para esporotricose.

ELISA comparativo anti-IgM



Positivos: *Pool* de soros de animais positivos para esporotricose.

Negativo: *Pool* de soros de animais negativos para esporotricose e criptococose.

Crypto: *Pool* de soros de animais positivos para criptococose e negativos para esporotricose.

Para avaliação preliminar da repetibilidade foram realizados testes variando os operadores e os dias de realização dos ensaios. Obteve-se um coeficiente de variação entre 2% e 19%, conforme observado no QUADRO 3.

QUADRO 3 - Coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade do peptídeo sintético PepSPSK e antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* sp. em felinos domésticos.

IgM				
Antígeno	Grupo	Operador 1	Operador 2	Coeficiente de Variação
Antígeno Bruto	Positivo	2,2115	2,2600	2,34%
	Negativo	2,1395	2,1195	4,54%
PepSPSK	Positivo	0,9240	0,9820	4,30%
	Negativo	0,0875	0,1045	12,52%

IgG				
Antígeno	Grupo	Operador 1	Operador 2	Coefficiente de Variação
Antígeno Bruto	Positivo	1,9825	2,49175	16,10%
	Negativo	1,9605	2,41755	14,76%
PepSPSK	Positivo	1,2230	1,31900	5,34%
	Negativo	0,2620	0,34400	19,40%

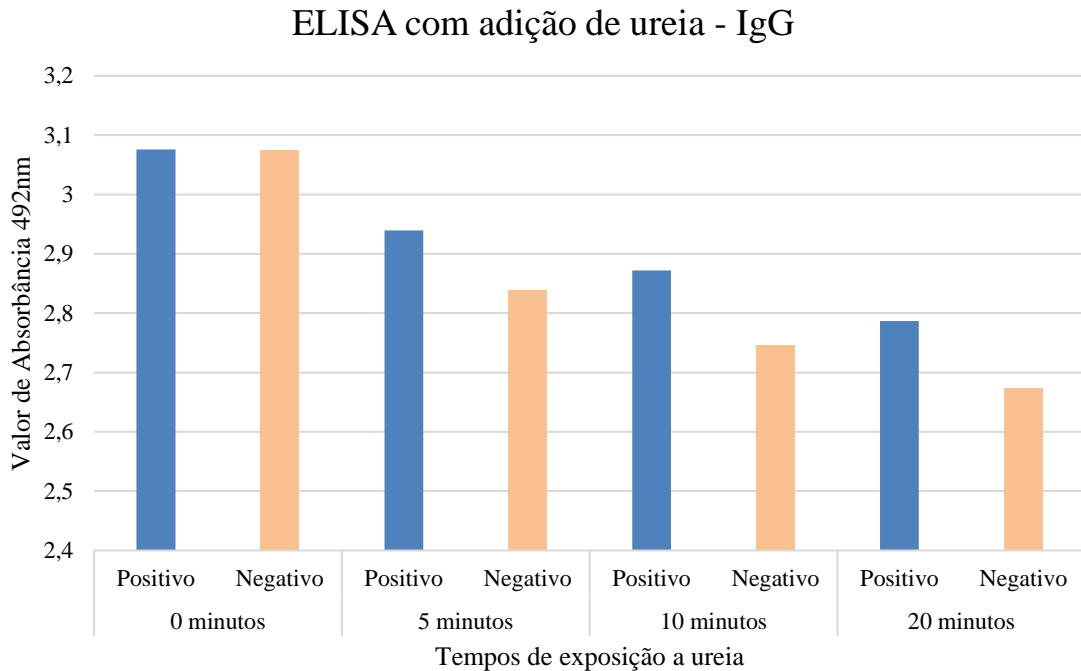
Para avaliação preliminar da reprodutibilidade foram realizados testes em diferentes laboratórios, utilizando as mesmas amostras e condições dos ensaios. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Quadro 4). O coeficiente de variação variou de 16% a 19% demonstrando boa similaridade entre os testes e, portanto, apresentando boa reprodutibilidade.

QUADRO 4 - Coeficiente de variação para avaliação da reprodutibilidade do peptídeo sintético PepSPSK e antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* sp. em felinos domésticos.

Antígeno	Grupo	LAMICO	ICB	Coefficiente de Variação
Antígeno Bruto	Positivo	3,13775	2,49175	16%
	Negativo	3,07017	2,41755	16%
PepSPSK	Positivo	1,77260	1,38900	17%
	Negativo	0,46545	0,35400	19%

Observou-se que houve baixa diferenciação entre grupos quando utilizado antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis*. Como uma forma de aumentar o poder de discriminação do teste de ELISA utilizando antígeno bruto, foi realizado um teste adicionando 100µg/poço de ureia em diferentes tempos (FIGURA 16).

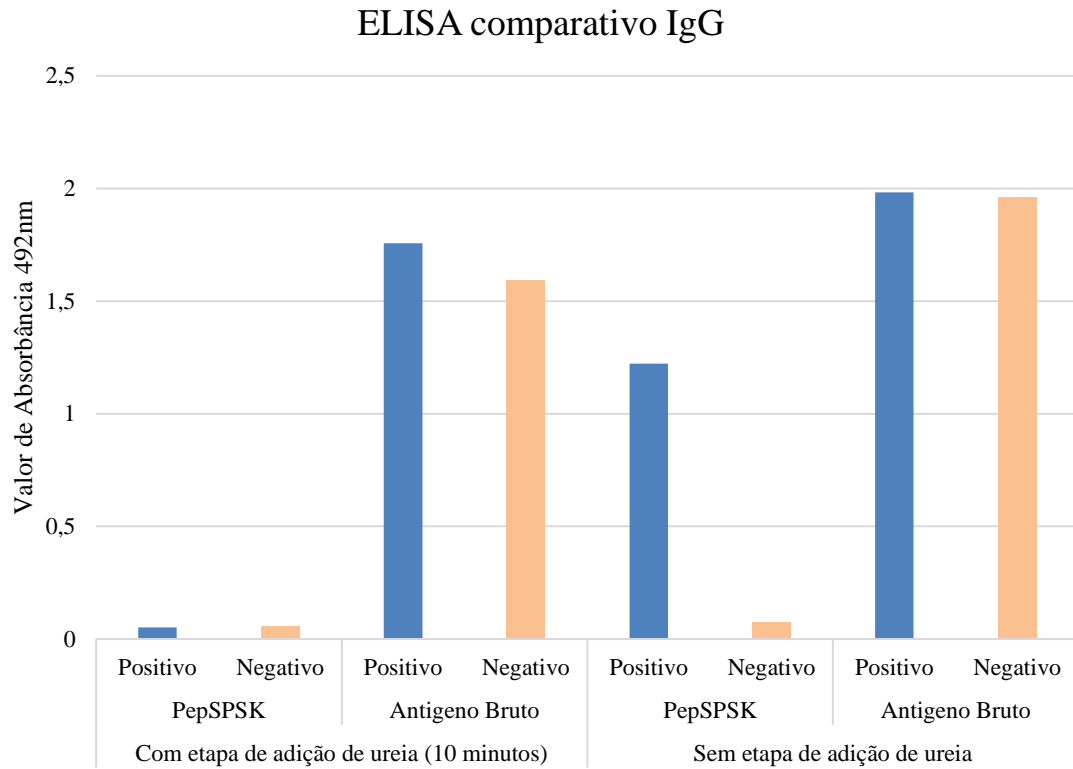
FIGURA 16 - Gráfico de teste de ELISA utilizando antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* com adição de ureia 6M por 0, 5, 10 e 20 minutos.



Notamos que mesmo com a adição desta etapa, a diferenciação entre os grupos foi baixa. Foi selecionado o tempo de exposição em 10 minutos por apresentar melhor razão entre positivos e negativos quando comparado aos outros tempos.

Foi realizado teste de ELISA com adição de ureia utilizando peptídeo sintético PepSPSK. Porém, a adição de ureia acabou por desligar o peptídeo previamente sensibilizado na placa, não sendo possível a realização desta etapa quando se trata de ELISA utilizando peptídeos sintéticos (FIGURA 17). Embora a adição de ureia tenha aumentado a capacidade discriminatória do ELISA usando antígeno bruto, esta não foi significativa quando comparado ao teste de ELISA sem a adição desta etapa.

FIGURA 17 - Gráfico comparativo entre ELISA com peptídeo sintético PepSPSK e antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis* com etapa de adição de ureia (10 minutos) e sem a etapa de adição de ureia.



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho traz de forma inédita a utilização de peptídeos sintéticos, preditos por ferramentas de bioinformática, com alto potencial para desenvolvimento e aprimoramento de métodos diagnósticos da esporotricose felina.

Quando se fala de pesquisa através de novos métodos diagnósticos para uma enfermidade, a busca por antígenos é de suma importância para sua utilização, desenvolvimento e validação de novos ensaios. A síntese de peptídeos que simulam epítomos de proteínas antigênicas de patógenos se torna uma alternativa na produção dos mesmos, além de ser relatado que o uso de peptídeos sintéticos é capaz de aumentar a especificidade de imunoenaios quando comparados com técnicas utilizando antígenos brutos (FERRER *et al.*, 2003).

A identificação de epítomos de célula B, assim como sua caracterização, são importantes para testes imunológicos, produção de anticorpos e desenhos de vacinas. Os epítomos podem ser identificados por métodos estruturais e funcionais. Os métodos estruturais envolvem cintilografia de raio-X, ressonância magnética e microscopia eletrônica, e identificam epítomos estruturais definidos por um grupo de átomos ou resíduos na proteína antigênica que contactam átomos ou resíduos do anticorpo. Os métodos funcionais já utilizam de técnicas como ressonância em superfície plasmática, espectrometria de massa, assim como imunoenaios, incluindo testes de ELISA e testes Western blot, sendo os epítomos constituídos por resíduos que aumentam a ligação ao anticorpo (SUNDBERG, MARIUZZA, 2004; PATTNAIK, 2005).

Uma vez que a identificação de epítomos de célula B através de ensaios experimentais apresenta limitações como demora de mapeamentos de alvos, além do elevado custo, a utilização de ferramentas de bioinformática se mostra uma abordagem eficiente (FERRER *et al.*, 2003; SAHA, RAGHAVA, 2006; SALIMI *et al.*, 2010).

A bioinformática é uma crescente área da ciência que utiliza de ferramentas computacionais para responder e resolver inúmeras questões biológicas, envolvendo áreas da ciência da computação, biologia, estatística e matemática. Com as ferramentas de bioinformática é possível analisar genomas, dados de sequências biológicas, realizar predição de funções e estruturas macromoleculares, realizar inferências a partir de dados de biologia molecular, fazer conexões e derivar predições. Atualmente foram desenvolvidas várias ferramentas computacionais capazes de realizar a predição de epítomos de célula B (PETERS *et al.*, 2005; SAHA, RAGHAVA, 2006; SALIMI *et al.*, 2010).

Guedes e colaboradores (2019) realizaram a predição de epítomos de células B *in silico* para cepas de *Tripanossoma vivax* da América do Sul e África, onde conseguiram um total de 2278, 3936 e 4062 epítomos lineares de célula B de *T. vivax* LIEM-176 (Venezuela), *T. vivax* IL1392 (Nigeria) e *T. vivax* Lins (Brasil), respectivamente, com potencial uso em métodos diagnóstico. Costa e colaboradores (2011) utilizaram o programa BepiPred 2.0 para identificar antígenos de *Leishmania chagasi*, conseguindo prever 180 peptídeos, sendo que destes, 25 demonstraram potencial para uso em sorodiagnóstico.

Faria e colaboradores (2011) utilizaram as ferramentas de bioinformática ABCPred, BCPred e BepiPred para a busca de epítomos de célula B de *Leishmania infantum*. selecionando 360 peptídeos, dos quais 10 demonstraram maior reatividade e foram utilizados em testes de ELISA com grande potencial para uso em imunodiagnóstico. No presente trabalho, as ferramentas utilizadas foram capazes de selecionar 231 peptídeos de célula B com potencial uso para desenvolvimento de novos testes diagnósticos para esporotricose, e ao sintetizá-los em membrana e submetê-los a análise de *immunoblotting* conseguiu-se selecionar cinco peptídeos.

Ao utilizarmos a bioinformática selecionamos alvos com maior probabilidade de gerar reatividade em testes de imunodiagnósticos e o *immunoblotting* permite a realização da triagem destes peptídeos selecionados evitando testar cada um individualmente, economizando tempo e insumos. A possibilidade de síntese desses peptídeos permite melhor padronização entre lotes e sua produção em larga escala, não havendo a necessidade de manutenção de microrganismos em laboratório para utilização na produção de extratos, antígenos brutos ou expressão de proteínas. Microrganismos estes que necessitam de observação constante, também, para que não haja perda de expressão de proteína alvo, mutação ou morte, prejudicando de forma significativa a produção de antígenos.

Embora a imunidade inata seja considerada a principal defesa contra agentes fúngicos, sabemos que a imunidade humoral também é importante na resposta do hospedeiro às doenças (DE ALMEIDA *et al.*, 2014; PORTUONDO *et al.*, 2016). Estudos realizados em modelo murinos e em pacientes humanos descrevem a presença de anticorpos IgG, IgM e IgA durante o curso da doença, porém, os mesmos não se mantiveram detectáveis ao final do tratamento (DE BEER *et al.*, 2003; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007a; CARNERO *et al.*, 2018). Até o momento, não há dados da curva de anticorpos IgG e IgM na espécie felina durante o curso da infecção por *Sporothrix* spp., porém, estudos revelaram a presença de anticorpos de gatos naturalmente infectados contra as glicoproteínas Gp60 e Gp70. (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; CARNERO *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2018). Portanto, o desenvolvimento de novos testes de imunodiagnóstico é possível e uma alternativa frente aos métodos já existentes,

sendo necessários mais estudos a respeito do comportamento das imunoglobulinas em felinos domésticos.

Com o objetivo de demonstrar o potencial uso dos peptídeos selecionados para desenvolvimento de novos testes diagnósticos, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de um ELISA. Durante os testes preliminares, o peptídeo PepSPSK foi selecionado por demonstrar boa diferenciação entre grupos negativos e positivos, seguindo para etapas de avaliação de desempenho analítico.

O ELISA utilizando o peptídeo PepSPSK apresentou boa sensibilidade analítica preliminar e especificidade, obtendo melhor desempenho quando comparado ao ELISA utilizando antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis*. A avaliação preliminar de repetibilidade obteve um coeficiente entre 2% e 19%. Para essa etapa foi considerado como adequado um coeficiente de variação menor que 20%, conforme Jacobson (1998). A avaliação preliminar da reprodutibilidade analítica apresentou baixa variação entre testes realizados em diferentes laboratórios, variando entre 16% e 19%, representando boa reprodutibilidade do teste. Para essa etapa também foi considerado como adequado um coeficiente de variação menor que 20%.

Foi realizado um ELISA indireto comparativo de forma a avaliar o desempenho do Peptídeo PepSPSK na diferenciação entre animais positivos para esporotricose, animais negativos e animais positivos para criptococose. A criptococose entra como diagnóstico diferencial da esporotricose por ser uma doença fúngica que apresenta lesões semelhantes às da esporotricose, principalmente em seu estágio inicial (SANTOS *et al.*, 2018). O peptídeo apresentou boa capacidade discriminatória e desempenho melhor quando comparado ao ELISA utilizando antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis*.

Com a preocupação para a produção de testes diagnósticos mais rápidos e eficientes para a esporotricose, alguns grupos se dedicaram ao estudo do desenvolvimento de testes de ELISA. Bernardes-Engemann *et al.* (2005) desenvolveram um ELISA utilizando SsCbF, que é descrito como uma preparação antigênica purificada da parede celular de *S. schenckii*. Esse ELISA visou o diagnóstico da esporotricose humana. Em 2015, Bernardes-Engemann e colaboradores repetiram o experimento com ELISA, desta vez utilizando SsCbF purificado. Almeida-Paes e colaboradores (2007b) também desenvolveram um ELISA visando o diagnóstico em humanos, porém utilizando extrato bruto de cultivo de *S. schenckii* em sua forma filamentosa. Alvarado e colaboradores (2015) desenvolveram um ELISA utilizando antígeno bruto de *S. schenckii* obtido de sua forma filamentosa para pacientes humanos infectados por *S. schenckii*. Coelho e colaboradores (2019) padronizaram um ELISA utilizando antígeno bruto de *S. schenckii* e avaliaram os efeitos da utilização de solução de ureia 6M de

forma a melhorar o desempenho em testes de ELISA diminuindo reações cruzadas e inespecíficas. Fernandes e colaboradores (2011) padronizaram um ELISA para diagnóstico da esporotricose felina utilizando o antígeno purificado SsCBF e extrato bruto de exoantígeno.

Como uma forma de aumentar a capacidade discriminatória no ELISA utilizando antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis*, foi incluída uma etapa de adição de ureia. A ureia possui a capacidade de quebrar reações inespecíficas entre o antígeno e anticorpo, o que visa diminuir a ocorrência de reações cruzadas e aumentar a sensibilidade do teste.

No presente estudo, o antígeno bruto foi produzido a partir de amostras de *Sporothrix brasiliensis*. A espécie foi escolhida por ser considerada a espécie mais patogênica, com maior predominância em território nacional e por estar relacionada a transmissão zoonótica da esporotricose (RODRIGUES *et al.*, 2020). O ELISA de antígeno bruto, mesmo após a etapa de adição de ureia não foi capaz de boa diferenciação entre *pool* de animais negativos do *pool* de animais positivos. Uma possível explicação para esse fato seria pelo *Sporothrix brasiliensis* produzir além da glicoproteína Gp70, a glicoproteína Gp60. Essa glicoproteína (Gp60), descrita somente na espécie *Sporothrix brasiliensis* é altamente imunogênica e expressa em grandes quantidades por essa espécie (DE BEER *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2013), o que pode ter causado reações inespecíficas e consequente diminuição do poder discriminatório do teste de ELISA, sendo necessário mais estudos para otimização e produção de um ELISA de antígeno bruto de *Sporothrix brasiliensis*. A adição de ureia no ELISA utilizando peptídeo solúvel não se mostrou viável uma vez que este desligou da placa. A adição dessa etapa apresenta a desvantagem por aumentar o tempo de realização do teste e a quantidade de insumos.

Até o momento, apenas um ELISA foi desenvolvido visando a espécie felina, sendo o diagnóstico em gatos domésticos tão importante para controle da doença na população. O presente trabalho demonstrou que o peptídeo sintético predito por ferramentas de bioinformática, PepSPSK, possui alto potencial para seu uso em testes diagnósticos sorológicos da esporotricose felina. O trabalho também desenvolveu um teste de ELISA indireto utilizando o peptídeo PepSPSK com boa performance nas avaliações preliminares de desempenho analítico. O ELISA utilizando o peptídeo solúvel apresenta vantagens quando comparado aos demais testes ELISA já desenvolvidos até o momento, por não necessitar da manutenção de culturas do fungo ou de microrganismos em laboratório para produção e expressão de proteínas; pelo peptídeo poder ser produzido em grande escala e com maior uniformidade entre lotes; além de possibilitar o uso do peptídeo para desenvolvimento de novos testes para esporotricose em diferentes espécies animais.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu o peptídeo sintético predito por ferramentas bioinformática, PepSPSK, como potencial antígeno para desenvolvimento de novos testes diagnóstico da esporotricose felina. Ressalta-se que os resultados apresentados foram obtidos com amostras de animais naturalmente infectados e animais saudáveis de vida livre e/ou semi-domiciliados, representando o que seria uma amostragem encontrada na população.

Além disso, dados preliminares de repetibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade analítica do teste de ELISA utilizando o peptídeo PepSPSK, mostraram que o teste foi capaz de diferenciar entre animais positivos e negativos, e, também, foi capaz de diferenciar de animais com criptococose, diagnóstico diferencial da esporotricose. Vale ressaltar que o peptídeo PepSPSK ainda apresenta potencial para desenvolvimento de testes diagnóstico abrangendo outras espécies animais.

Nesse estudo completou-se as etapas necessárias para avaliação preliminar de desempenho para desenvolvimento de um novo teste diagnóstico. Porém, são necessários mais estudos antes que o produto possa ser disponibilizado para o mercado. O grupo pretende dar continuidade nesses estudos, realizando a validação completa do teste ELISA, além de desenvolver e validar um teste de imunoenensaio em fluxo lateral para esporotricose utilizando o peptídeo PepSPSK.

REFERÊNCIAS

ALBERICI, F.; PATIES, C. T.; LOMBARDI, G.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L.; CHANDLER, F. *Sporothrix schenckii* var *luriei* as the cause of sporotrichosis in Italy. **European Journal of Epidemiology**, v. 5, n. 2, p. 173-177, 1989.

ALBORNOZ, M. B.; VILLANUEVA, E.; DE TORRES, E. D. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 85, n. 3, p. 177-183, 1984

ALMEIDA, A. J.; REIS, N. F.; LOURENÇO, C. S.; COSTA, N. Q.; BERNARDINO, M. L.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Sporotrichosis in domestic felines (*Felis catus domesticus*) in Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1438–1443, 2018.

ALMEIDA, F. D.; SAMPAIO, S. A.; LACAZ, C. D. S.; FERNANDES, J. D. C. Statistical data on sporotrichosis; analysis of 344 cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 30, n. 1, 1955.

ALMEIDA-PAES, R.; BAILÃO, A. M.; PIZZINI, C. V.; REIS, R. S.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; PERALTA, J. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Cell-free antigens of *Sporothrix brasiliensis*: antigenic diversity and application in an immunoblot assay. **Mycoses**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2012.

ALMEIDA-PAES, R.; PIMENTA, M. A.; PIZZINI, C. V., MONTEIRO, P. C. F.; PERALTA, J. M., NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 244-249, 2007.

ALMEIDA-PAES, R.; PIMENTA, M. A.; MONTEIRO, P. C. F.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1149–1157, 2007a.

ALMEIDA-PAES, R.; PIMENTA, M. A.; PIZZINI, C. V.; MONTEIRO, P. C. F.; PERALTA, J. M.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 244-249, 2007b.

ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1-10, 2015.

ALVARADO, P.; OSTOS, A.; FRANQUIZ, N.; ROSCHMAN-GONZÁLEZ, A.; ZAMBRANO, E. A.; MENDOZA, M. Serological diagnosis of sporotrichosis using an antigen of *Sporothrix schenckii* sensu stricto mycelium. **Journal of Clinical Investigation**, V. 56, n. 2, p. 111-122, 2015.

ALVES, S. H.; BOETTCHER, C. S.; OLIVEIRA, D. C. D.; TRONCO-ALVES, G. R.; SGARIA, M. A.; THADEU, P.; OLIVEIRA, L. T.; SANTURIO, J. M. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 523-525, 2010.

ANDRADE, E. H. P.; BASTOS, C. V.; SILVA, A. V. D.; MOREIRA, S. M.; COSTA, T. G. D. A.; SALVATO, L. A.; COLOMBO, S. A.; OLIVEIRA, C. S. F.; SOARES, D. F. M.; KELLER, M. K.; AZEVEDO, M. I. D. Household outbreak of sporotrichosis: towards the One Health approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022.

AYALA, F. J. Teleological explanations in evolutionary biology. **Philosophy of Science**, v. 37, n. 1, p. 1-15, 1970.

BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, A. D. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S. WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; OROFINO COSTA, R. C.; MIGUENS, B. P.; PENHA, C. V. L.; NEVES, E.; PEREIRA, B. A. S.; DIAS, C. M. P.; MATTOS, M.; GUTIERREZ, M. C.; SCHUBACH, A. OLIVEIRA NETO, M. P.; LAZÉRA, M.; LOPES-BEZERRA, L. M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 487-493, 2005.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; DE LIMA BARROS, M.; ZEITUNE, T.; RUSSI, D. C.; OROFINO-COSTA, R.; LOPES-BEZERRA, L. M. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 28-33, 2015.

BERNSTEIN, J. A.; DIDIER, P. J. Nonhuman primate dermatology: a literature review. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 3, p. 145-156, 2009.

BLAUWKAMP, T. A.; THAIR, S.; ROSEN, M. J.; BLAIR, L.; LINDNER, M. S.; VILFAN, I. D.; CHEUNG, A. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 663-674, 2019.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.

BONIFAZ, A.; VAZQUEZ-GONZALEZ, D. Sporotrichosis: an update. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 145, n. 5, p. 659-673, 2010.

BOSCARATO, A. G.; ALBERTON, L. R.; KOMOCHENA, H. A. E. dos S.; BOTELHO, E.; RIBEIRO, R. de C. L.; ORLANDINI, C. F.; STEINER, D. Equine Sporotrichosis and Iatrogenic Hypothyroidism. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 44, no. 1, p. 6, 2016.

BUJANG, M. A.; ADNAN, T. H. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 10, p. YE01, 2016.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 550-576, 2010.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L. A.; OTRANTO, D. Fungal diseases of horses. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1-2, p. 215-234, 2013.

CAFARCHIA, C.; SASANELLI, M.; LIA, R. P.; DE CAPRARIIS, D.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from southern Italy: case report. **Mycopathologia**, v. 163, n. 2, p. 75-79, 2007.

CAMPOS, P.; ARENAS, R.; CORONADO, H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 38-41, 1994.

CARLOS, I. Z.; SASSÁ, M. F.; DA GRAÇA SGARBI, D. B.; PLACERES, M. C. P.; MAIA, D. C. G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n. 1, p. 1-10, 2009.

CARNERO, L. C. G.; LOZOYA PÉREZ, N. E.; HERNÁNDEZ, S. E. G.; ÁLVAREZ, J. A. M. Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 100, 2018.

CASTRO, R. A.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; TEIXEIRA, P. A.; SANCHES, G. F.; TEIXEIRA, M. M.; QUINTELLA, L. P.; ALMEIDA, S. R.; COSTA, R. O.; CAMARGO, Z. P.; FELIPE, M. S. S.; SOUZA, W.; DE SOUZA, W. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1-17, 2013.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CHAKRABARTI, A.; ROY, S. K.; DHAR, S.; KUMAR, B. Sporotrichosis in north-west India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 100, p. 62-65, 1994.

COELHO, L. M. L.; GRISOLIA, J. C.; LÚCIA, M., BOCZAR, M.; FERREIRA, E. B.; NOGUEIRA, D. A.; CHAVASCO, J. K.; CAMARGO, Z. P.; BEZERRA, L. M. L.; COELHO, L. F. L. MALAQUIAS, L. C. C. Effects of metaperiodate and urea solutions on the serological diagnosis of human sporotrichosis using an indirect ELISA test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 139-145, 2019.

CONIAS, S.; WILSON, P. Epidemic cutaneous sporotrichosis: report of 16 cases in Queensland due to mouldy hay. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 39, n. 1, p. 34-37, 1998.

COSTA, M. M.; ANDRADE, H. M.; BARTHOLOMEU, D. C.; FREITAS, L. M.; PIRES, S. F.; CHAPEAUROUGE, A. D.; PERALES, J.; FERREIRA, A. T.; GIUSTA, M. S. MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 5, p. 2172-2184, 2011.

CRISEO, G.; MALARA, G.; ROMEO, O.; GUERRA A. P. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 159-162, 2008.

CROWTHER, J. B. Validation of pharmaceutical test methods. In: AHUJA, S.; SCYPINSKI, S. (Eds.) **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis**. New York: Academic Press, 2001. p. 415-443.

DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; KAIHAMI, G. H.; BREDA, L. C. D.; FERREIRA, K. S.; DE ALMEIDA, S. R. An immunoproteomic approach revealing peptides from *Sporothrix brasiliensis* that induce a cellular immune response in subcutaneous sporotrichosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

DE ALMEIDA, J. R. F.; KAIHAMI, G. H.; JANNUZZI, G. P.; DE ALMEIDA, S. R. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 42–50, 2014.

DE BEER, Z. W.; HARRINGTON, T. C.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 434–441, 2003.

DE JESUS, A. C. P.; DE OLIVEIRA, A. L. G.; GUIMARÃES, N. S.; MENDOZA, L.; FUJIWARA, R. T.; DA SILVA MENEZES, C. A.; VILELA, R. V. R. Serological tests using *Sporothrix* species antigens for the accurate diagnosis of sporotrichosis: a meta-analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 98, n. 3, p. 115131, 2020.

DE LIMA FRANCO, D.; NASCIMENTO, R. C.; FERREIRA, K. S.; ALMEIDA, S. R. D. Antibodies against *Sporothrix schenckii* enhance TNF- α production and killing by macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 2, p. 142–146, 2012.

DE OLIVEIRA, M. M. E.; VERÍSSIMO, C.; SABINO, R.; ARANHA, J.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 388-390, 2014.

DEEPE, G. S.; GIBBONS, R. S. Protective and Memory Immunity to *Histoplasma capsulatum* in the Absence of IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5353–5362, 2003.

DIAS, N. M.; OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; LIMA, N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1975, 2011.

DOOLEY, D. P.; BOSTIC, P. S.; BECKIUS, M. L. Spook house sporotrichosis: a point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted house. **Archives of Internal Medicine**, v. 157, n. 16, p. 1885-1887, 1997.

EIGLER, A.; GRETEN, T. F.; SINHA, B.; HASLBERGER, C.; SULLIVAN, G. W.; ENDRES, S. Endogenous adenosine curtails lipopolysaccharide-stimulated tumour necrosis factor synthesis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 2, p. 132–139, 1997.

FARIA, A. R.; COSTA, M. M.; GIUSTA, M. S.; GRIMALDI JR, G.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 9, p. e1310, 2011.

FEENEY, K. T.; ARTHUR, I. H.; WHITTLE, A. J.; ALTMAN, S. A.; SPEERS, D. J. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1228, 2007.

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; AMARAL, C. C.; SASAKI, A. A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. **Open Mycology Journal**, v. 3, n. 1, p. 48-58, 2009.

FERNANDES, G. F.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; SCHUBACH, T. M. P.; DIAS, M. A. G., PEREIRA, S. A.; DE CAMARGO, Z. P. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3-4, p. 445-449, 2011.

FERREIRA, A. M.; SANTOS, I. D.; SAMPAIO, C. E. O cuidado de enfermagem nos procedimentos de coleta para análise microbiológica de feridas: aplicabilidade de duas técnicas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 3, p. 137-41, 2004.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L. W.; ONYANGO-ABUJE, J. A.; GARETE, T.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83-94, 2003.

FINDLAY, G. H. The epidemiology of sporotrichosis in the Transvaal. **Sabouraudia**, v. 7, n. 3, p. 231-236, 1969.

FRANCESCHI, N. T.; SPANAMBERG, A.; DHEIN, J. D. O.; BAZOTTI, M. S.; RAVAZZOLO, A. P.; SILVA, I. T. D.; COSTA, F. V. A.; FERREIRO, L. Esporotricose óssea em gato causada por *Sporothrix brasiliensis*. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 45, n. 1, Pub. 241, p. 1-5, 2018.

FUKUSHIRO, R. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology**, v. 257, n. 2, p. 228-233, 1984.

GARCÍA-VARGAS, A.; MAYORGA, J.; SOTO-ORTIZ, A. Sporotrichosis in children. Study of 133 cases in the Dermatological Institute of Jalisco “Dr. José Barba Rubio.”. **Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana**, v. 36, p. 18-22, 2008.

GHOSH, A.; CHAKRABARTI, A.; SHARMA, V. K.; SINGH, K.; SINGH, A. Sporotrichosis in Himachal Pradesh (north India). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 1, p. 41-45, 1999.

GHOSH, L. M. An unusual case of sporotrichosis. **The Indian Medical Gazette**, v. 67, n. 10, p. 570, 1932.

GILLMAN, B. M.; BATCHELDER, J.; FLAHERTY, P.; WEIDANZ, W. P. Suppression of *Plasmodium chabaudi* parasitemia is independent of the action of reactive oxygen intermediates and/or nitric oxide. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6359–6366, 2004.

GONZÁLEZ, A. G; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

GOVENDER, N. P.; MAPHANGA, T. G.; ZULU, T. G.; PATEL, J.; WALAZA, S.; JACOBS, C.; EBONWU, J. I.; NTULI, S. NAICKER, S. D. THOMAS, J. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. 1-15, 2015.

GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 1, p. 145-146, 1995.

GREINER, M; PFEIFFER, D; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 1-2, p. 23-41, 2000.

GREINER, M; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 1-2, p. 3-22, 2000.

GREMIÃO, I. D. F., PEREIRA, S. A., RODRIGUES, A. M., FIGUEIREDO, F. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.; SANTOS, I. B.; SCHUBACH, T. M. P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 221- 223, 2006.

GUEDES, R. L. M., RODRIGUES, C. M. F., COATNOAN, N., COSSON, A., CADIOLI, F. A., GARCIA, H. A., GERBER, A. L.; MACHADO, R. Z.; MINOPRIO, P. M. C.; TEIXEIRA, M. M. G.; DE VASCONCELOS, A. T. R. A comparative in silico linear B-cell epitope prediction and characterization for South American and African *Trypanosoma vivax* strains. **Genomics**, v. 111, n. 3, p. 407-417, 2019.

GUMAA, S. A. Sporotrichosis in Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 637-640, 1978.

GUZMAN-BELTRAN, S.; PEREZ-TORRES, A.; CORONEL-CRUZ, C.; TORRES-GUERRERO, H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1093–1101, 2012.

HU, S.; CHUNG, W. H.; HUNG, S. I.; HO, H. C.; WANG, Z. W.; CHEN, C. H.; LU, S.C.; KUO, T. T.; HONG, H. S. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1414-1418, 2003.

HUMPHREYS, F. A.; HELMER, D. E. Pulmonary sporotrichosis in a cattle beast. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 7, n. 7, p. 199-204, 1943.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M. Molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 41, n. 4, p. 245-249, 2000.

ITOH, M.; OKAMOTO, S.; KARIYA, H. Survey of 200 cases of sporotrichosis. **Dermatologica**, v. 172, n. 4, p. 209-13, 1986

JACYK, W. K.; LAWANDE, R. V.; TULPUL, S. S. Deep mycoses in West Africa: a report of 13 cases and review of the Nigerian literature. **Journal of the National Medical Association**, v. 73, n. 3, p. 251, 1981.

JACOBSON, R. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 2, p. 469-486, 1998

KAWASAKI, M.; ANZAWA, K.; MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H. New strain typing method with *Sporothrix schenckii* using mitochondrial DNA and polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique: New strain typing method with *S. schenckii*. **The Journal of Dermatology**, vol. 39, no. 4, p. 362–365, 2012.

KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.-D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1077–1081, 2006.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LI, H. Y.; SONG, J.; ZHANG, Y.; LU, Y. J.; ZHAO, X. Y. Epidemiological survey of sporotrichosis in Zhaodong, Heilongjiang. **Chinese Journal of Dermatology**, v. 28, p. 401-402, 1995.

LIU, X.; LIAN, C.; JIN, L.; AN, L.; YANG, G.; LIN, X. Characterization of *Sporothrix schenckii* by random amplification of polymorphic DNA assay. **Chinese Medical Journal**, v. 116, n. 2, p. 239-242, 2003.

LIU, T. T.; ZHANG, K.; ZHOU, X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 15, n. 1, p. 100-108, 2014.

LISBOA, P. J. G. A review of evidence of health benefit from artificial neural networks in medical intervention. **Neural Networks: The Official journal of the International Neural Network Society**, v. 15, n. 1, p. 11–39, 2002

LOMBARDI, V.; VAN OVERTVELT, L.; HORIOT, S.; MOINGEON, P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN- γ , and IL-17A by naive CD4⁺ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 6, p. 3372-3379, 2009.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 293-308, 2006.

LOPES-BEZERRA, L. M.; WALKER, L. A.; NIÑO-VEGA, G.; MORA-MONTES, H. M.; NEVES, G. W.; VILLALOBOS-DUNO, H.; BARRETO, L.; GARCIA, K.; FRANCO, B.; MARTINEZ-ÁLVARES, J. A.; MUNRO, C. A. GOW, N. A. R. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–25, 2018.

LÓPEZ-RODAS, V.; FLORES-MOYA, A.; MANEIRO, E.; PERDIGONES, N.; MARVA, F.; GARCÍA, M. E.; COSTAS, E. Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. **Evolutionary Ecology**, vol. 21, no. 4, p. 535–547, 2007.

LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, M. D. R.; PÉREZ-TORRES, A.; RUIZ-BACA, E.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; MORA-MONTES, H. M.; FLORES-CARREÓN, A.; TORIELLO, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 85–102, 2011.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 10, n. 21, p. 443-450, 1907.

MACOTELA-RUIZ, E.; NOCHEBUENA-RAMOS, E. Sporotrichosis among rural communities in the Northern Sierra in Puebla: Report of 55 cases September 1995-December 2005. **Gaceta Médica de México**, v. 142, n. 5, p. 377-380, 2006.

MAGAND, F.; PERROT, J-L; CAMBAZARD, F.; RABERIN, M-H; LABELLE, B. Sporotrichose cutanée autochtone française. **Annales de Dermatologie et de Venerologie**, vol. 136, no. 3, p. 273–275, 2009.

MARIAT, F. Ecology of *Sporothrix schenckii* and of *Ceratocystis stenoceras* in Corsica and Alsace, French provinces free of sporotrichosis. **Sabouraudia**, v. 13, n. 2, p. 217-225, 1975.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; PÉREZ-GARCÍA, L. A.; MELLADO-MOJICA, E.; LÓPEZ, M. G.; MARTÍNEZ-DUNCKER, I.; LÓPEZ-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M. *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 05 p. 843, 2017.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; PÉREZ-GARCÍA, L. A.; FLORES-CARREÓN, A.; MORA-MONTES, H. M. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 62–66, 2014.

MASCARENHAS, M. B.; LOPES, N. L.; PINTO, T. G.; COSTA, T. S.; PEIXOTO, A. P.; RAMADINHA, R. R.; FERNANDES, J. I. Canine sporotrichosis: report of 15 advanced cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 477-481, 2018.

MATA-ESSAYAG, S.; DELGADO, A.; COLELLA, M. T.; LANDAETA-NEZER, M. E.; ROSELLO, A.; PEREZ DE SALAZAR, C.; OLAIZOLA, C.; HARTUNG, C.; MAGALDI, S.; VELASQUEZ, E. Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 8, p. 974-980, 2013.

MAULDIN, E. A.; PETERS-KENNEDY, J. Integumentary system. In: GRANT MAXIE, M. (Ed.) **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1**. United States: Elsevier, 2016. p. 509-736

MAYORGA, J.; TARANGO, M. V.; BARBA-RUBIO, J. E. Esporotricosis. 100 años después (1898-1998). **Dermatología Revista Mexicana**, v. 43, p. S22-S29, 1999.

MAYORGA, R.; CÁCERES, A.; TORIELLO, C.; GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, O.; RAMIREZ, M. E.; MARIAT, F. Étude d'une zone d'endemie sporotrichosique au Guatemala. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 16, n. 3, p. 185-198, 1978.

MIGAKI, G.; FONT, R. L.; KAPLAN, W.; ASPER, E. D. Sporotrichosis in a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 12, p. 1916-1919, 1978.

MIRANDA, L. H.; SANTIAGO, M. D. A.; SCHUBACH, T. M.; MORGADO, F. N.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. D. V. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8^{low} cells and a decrease in CD4⁺ cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29-39, 2016.

MEHTA, K. I. S.; SHARMA, N. L.; KANGA, A. K.; MAHAJAN, V. K.; RANJAN, N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 496-501, 2007.

Mendoza, M.; Diaz, A. M.; Hung, M. B.; Zambrano, E. A.; Diaz, E.; Albornoz, M. D. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. **Medical mycology**, v. 40, n. 5, p. 447-454, 2002.

MESA-ARANGO, A. C.; DEL ROCÍO REYES-MONTES, M.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚNIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3004-3011, 2002.

MOCHIZUKI, T.; ANZAWA, K. Deep mycosis in Japan. In: EUN, H. C.; KIM, S. C.; LEE, W. S. (Eds.). **Aging and skin diseases. Special book of the 22nd World Congress of Dermatology**. Seoul, Korea: Medrang Inc, 2011. p. 393-397.

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A. M.; DIAS, M. A. G.; DA SILVA, E. A.; BERNARDI, F.; DE CAMARGO, Z. P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2014.

MORA-MONTES, H. M. Special Issue “*Sporothrix* and Sporotrichosis”. **Journal of Fungi**, v. 116, n. 4, p. 1–4, 2018.

MORA-MONTES, H. M.; DANTAS, A. S.; TRUJILLO-ESQUIVEL, E.; BAPTISTA, A. R. S.; LOPES-BEZERRA, L. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, p. 1-10. 2015.

NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 241–247, 2005.

NETEA, M. G.; VAN DE VEERDONK, F.; VERSCHUEREN, I; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 118–123, 2008.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P. A.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1348-1352, 2005.

O'REILLY, L. C.; ALTMAN, S. A. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2547-2552, 2006.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018 Disponível em <<https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/>> Acesso em: 26 jan. 2020

OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2019 Disponível em <<https://www.oie.int/standard-setting/aquatic-manual/>> Acesso em: 25 jan. 2020

OLIVEIRA, M. M. E.; SAMPAIO, P.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2159-2162, 2012.

OMICCIOLI, E.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; MAGNANI, M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. **Food Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 615-622, 2009.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P. M. D.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606-620, 2017.

PADHYE, A. A.; KAUFMAN, L.; DURRY, E.; BANERJEE, C. K.; JINDAL, S. K.; TALWAR, P.; CHAKRABARTI, A. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2492-2494, 1992

PAIVA, M. T.; OLIVEIRA, C. S. F.; NICOLINO, R. R.; BASTOS, C. V.; LECCA, L. O.; AZEVEDO, M. I.; KELLER, K. M.; SALVATO, L. A.; BRANDÃO, S. T.; OLIVEIRA, H. M. R.; MORAIS, M. H. F.; ECCO, R. LECH, A. J. Z.; HADDAD, J. P. A.; SOARES, D. F. M. Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemics. **Preventive veterinary medicine**, v. 183, p. 105125, 2020.

PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 126, n. 2, p. 79-92, 2005.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SCHUBACH, T. M. P. 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.

PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIAO, I. D.; SILVA, J. N. O.; HONSE, C.; FIGUEIREDO, F. B.; SILVA, D. T.; KITADA, A. A. B.; REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220-223, 2011.

PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P.; GREMIÃO, I. D. F.; SILVA, D. T. da; FIGUEIREDO, F. B.; ASSIS, N. V. de; PASSOS, S. R. L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 311, 2018.

PETERS, B.; SIDNEY, J.; BOURNE, P.; BUI, H. H.; BUUS, S.; DOH, G.; FLERI, W.; KRONENBERG, M.; KUBO, R. LUND, O.; NEMAZEE, D.; PONOMARENKO, J. V.; SATHIAMURTHY, M.; SETTE, A. The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. **PLoS biology**, v. 3, n. 3, p. e91, 2005.

PIJPER, A.; PULLINGER, B. D. An outbreak of sporotrichosis among south African native miners. **Lancet**, v. 210, n. 5435, p. 914–916, 1927.

PINN, T. G. Sporotrichosis in a Queensland bushwalker. **The Medical Journal of Australia**, v. 169, n. 5, p. 287-287, 1998.

PINTO, P. N.; RODRIGUES, M. P.; BISCOTO, G. L.; SALVATO, L. A.; DIAS, R. R. D. S.; NOGUEIRA, M. M.; MARTINS, N. R. S.; ECCO, R.; AZEVEDO, M. I.; KELLER, K. M. Atlas de Micologia Médica Veterinária. **Caderno técnico de Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n. 94, p. 01-109 p, 2019.

PIRATININGA, S. N. Esporotricose em luar. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo**, v. 2, n. 3, p. 219-222, 1943.

PORTUONDO, D. L.; BATISTA-DUHARTE, A.; FERREIRA, L. S.; MARTÍNEZ, D. T.; POLES, M. C.; DUARTE, R. A.; SILVA, A. C. A. P.; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M. F.; CARLOS, I. Z. A cell wall protein-based vaccine candidate induce protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 300–309, 2016.

QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BENARD, G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 1–23, 2019.

QUINTAL, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 4, n. 1, p. 51-54, 2000.

REIS, É. G.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; ROCHA, R. F. D. B.; CASTRO, V. S. P.; BARROS, M. B. L.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 399–404, 2012.

RODRIGUES, A. M.; DELLA TERRA, P. P.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813-842, 2020.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, S. D. E.; CAMARGO, Z. P. D. E. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405-412, 2013.

RODRIGUES, A. M.; NAJAFZADEH, M. J.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1385, 2015.

RODRÍGUEZ, G.; SARMIENTO, L. The asteroid bodies of sporotrichosis. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 20, n. 3, p. 246-249, 1998.

ROSS, M. D.; GELFAND, M. Deep Fungal Infections in Rhodesia-A 10-Year Survey of Histological Material. **Central African Journal of Medicine**, v. 24, n. 12, p. 262-267, 1978.

ROSSATO, L.; MORENO, L. F.; JAMALIAN, A.; STIELOW, B.; DE ALMEIDA, S. R.; DE HOOG, S.; FREEKE, J. Proteins Potentially Involved in Immune Evasion Strategies in *Sporothrix brasiliensis* Elucidated by Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry. **mSphere**, v. 3, n. 3, p. 514-517, 2018.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 40-48, 2006.

SALIMI, N.; FLERI, W.; PETERS, B.; SETTE, A. Design and utilization of epitope-based databases and predictive tools. **Immunogenetics**, v. 62, n. 4, p. 185-196, 2010.

SANTOS, A. F.; ROCHA, B. D.; BASTOS, C. V.; OLIVEIRA, C. S. F.; SOARES, D. F. M.; PAIS, G. C. T.; XAULIM, G. M. D.; KELLER, K. M.; SALVATO, L. A.; LECCA, L. O.; FERREIRA, L.; SARAIVA, L. H. G.; ANDRADE, M. B.; PAIVA, M. T.; ALVES, M. R. S.; MORAIS, M. H. F.; AZEVEDO, M. I.; TEIXEIRA, M. K. I.; ECCO, R.; BRANDÃO, S. T. Guia prático para enfrentamento da esporotricose felina em Minas Gerais. **Revista Veterinária & Zootecnia em Minas**, v. 137, n. 38, p. 16-27, 2018.

SASSÁ, M. F.; FERREIRA, L. S.; DE ABREU RIBEIRO, L. C.; CARLOS, I. Z. Immune Response Against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-Deficient Mice. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 21–30, 2012.

SCHECHTMAN, R. C.; FALCÃO, E. M. M.; CARARD, M.; GARCÍA, M. S. C.; MERCADO, D. S.; HAY, R. J. Esporotricose: hiperendêmica por transmissão zoonótica, com apresentações atípicas, reações de hipersensibilidade e maior gravidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 1, p. 1-13, 2022.

SCHUBACH, T. M. P.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DOS REIS, R. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C. M.; MONTEIRO, D. F.; BARROS, M. B.L.; BRAUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MONTEIRO, P. C. F.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v. 153, n. 2, p. 83-86, 2002.

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. P.; DE LIMA BARROS, M. B.; WANKE, B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1952, 2005.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A. WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998 – 2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, T. M., SCHUBACH, A., OKAMOTO, T., BARROS, M. B., FIGUEIREDO, F. B., CUZZI, T.; PEREIRA, S. A.; DOS SANTOS, I. B.; PAES, R. A.; LEME, L. R. P.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2006.

SHIRAIISHI, A.; NAKAGAKI, K.; ARAI, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. **Mycopathologia**, v. 120, n. 1, p. 15–21, 1992.

SILVA, J. N.; PASSOS, S. R. L.; MENEZES, C. R.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B. F.; PEREIRA, S. A. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 880-884, 2015.

SIVAGNANAM, S.; BANNAN, A. M.; CHEN, S. C. A.; RALPH, A. P. Sporotrichosis (*Sporothrix schenckii* infection) in the New South Wales mid-north coast, 2000–2010. **Medical Journal of Australia**, v. 196, n. 9, p. 588-590, 2012.

SOMOZA, E; MOSSMAN, D. Comparing and optimizing diagnostic tests: an information-theoretical approach. **Medical Decision Making**, v. 12, n. 3, p. 179-188, 1992.

SONG, Y.; LI, S. S.; ZHONG, S. X.; LIU, Y. Y.; YAO, L.; HUO, S. S. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 3, p. 313-318, 2013.

SOUZA, N. T.; NASCIMENTO, A. C. B. M.; SOUZA, J. O. T.; SANTOS, F. C. G. C. A.; CASTRO, R. B. Esporotricose canina: Relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 572–576, 2009.

SUNDBERG, E. J.; MARIUZZA, R. A. Antibody structure and recognition of antigen. **Molecular Biology of B Cells. Elsevier Science (USA)**, v.1, n.1 p. 491-509, 2004.

SYMMERS, W. S. Sporotrichosis in Ireland. **The Ulster Medical Journal**, v. 37, n. 2, p. 85, 1968.

TAN, J. W.; LIU, W.; WAN, Z.; LI, R. Y. Reclassification of 33 clinical strains of *Sporothrix* from northern China based on phenotypic and molecular characters. **Mycosystem**, v. 32, n. 2, p. 161-167, 2013.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNEHERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: Environment and fungal pathogenicity. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 160, n.11, p. 2352–2365, 2014.

TORINUKI, W.; TAGAMI, H. Complement activation by *Sporothrix schenckii*. **Archives of Dermatological Research**, v. 277, n. 4, p. 332–333, 1985.

UENOTSUCHI, T.; TAKEUCHI, S.; MATSUDA, T.; URABE, K.; KOGA, T.; UCHI, H.; NAKAHARA, T.; FUKAGAWA, S.; KAWASAKI, M.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; MOROI, Y. FURUE, M. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **International Immunology**, v. 18, n. 12, p. 1637–1646, 2006.

VENTIN, M.; RAMÍREZ, C.; RIBERA, M.; FERRANDIZ, C.; SAVALL, R.; PEYRI, J. A significant geographical area for the study of the epidemiological and ecological aspect of Mediterranean sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 99, n. 1, p. 41-43, 1987.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VIDAL, G., RODRIGUEZ-DE-KOPP, N. Sporotrichosis: clinical, therapeutic and epidemiologic overview. **Archivos Argentinos de Dermatología**, v. 63, p. 221-234, 1993.

VISMER, H. F.; HULL, P. R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 137-143, 1997.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; WEINER, R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 10, p. 1962-1973, 2007.

WELSH, R. D. Zoonosis Update - Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 8, p. 1123–1126, 2003.

YANG, F. Z.; LI, Y. Z.; YAO, J. Y. Clinical analysis of 224 cases of cutaneous sporotrichosis. **Chinese Journal of Leprosy Skin Disease**, v. 21, p. 59-60, 2005.

YU, X.; WAN, Z.; ZHANG, Z.; LI, F.; LI, R.; LIU, X. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 67-74, 2013.

ZAHAROPOULOS, P. Fine-needle aspiration cytologic diagnosis of lymphocutaneous sporotrichosis: A case report. **Diagnostic Cytopathology**, v. 20, n. 2, p. 74-77, 1999.

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 Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 7219, 2019.

ZHANG, Z.; LIU, X.; LV, X.; LIN J. Variation in genotype and higher virulence of a strain of *Sporothrix schenckii* causing disseminated cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 439-446, 2011.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 153-165, 2013.

APÊNDICE A - Caracterização das amostras utilizadas para o desenvolvimento de testes diagnósticos da esporotricose felina.

continua

Amostra	Tipo	Sintomatologia clínica	Confirmação de diagnóstico
Sporothrix 01	Animal domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 02	Animal domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 03	Animal domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 04	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 05	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 06	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 07	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 08	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 09	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 10	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 11	Animal domiciliado	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 12	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 13	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 14	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 15	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 16	Animal semi-domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 17	Animal domiciliado	Forma Cutânea Localizada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 18	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 19	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 20	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 21	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 22	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 23	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 24	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia
Sporothrix 25	Animal de vida livre	Forma Cutânea Disseminada	Cultura e isolamento/ Citologia

APÊNDICE A - Caracterização das amostras utilizadas para o desenvolvimento de testes diagnósticos da esporotricose felina.

continuação

Cryptococcus 01	Animal semi-domiciliado	Ceratoconjuntivite	Cultura e isolamento
Cryptococcus 02	Animal semi-domiciliado	Acometimento tegumentar	Cultura e isolamento
Cryptococcus 03	Animal semi-domiciliado	Nódulo em região de pescoço	Cultura e isolamento
Leishmaniose 01	Animal de vida livre	Acometimento tegumentar	PCR
Leishmaniose 02	Animal semi-domiciliado	Acometimento tegumentar	PCR
Sadio 01	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 02	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 03	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 04	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 05	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 06	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 07	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 08	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 09	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 10	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 11	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 12	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 13	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 14	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 15	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 16	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 17	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 18	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 19	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 20	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 21	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 22	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma

APÊNDICE A - Caracterização das amostras utilizadas para o desenvolvimento de testes diagnósticos da esporotricose felina.

conclusão

Sadio 23	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 24	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 25	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 26	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 27	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 28	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 29	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 30	Animal de vida livre	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 31	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 32	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 33	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 34	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 35	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 36	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma
Sadio 37	Animal semi-domiciliado	Nenhuma	Nenhuma