

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sporothrix brasiliensis* NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

GABRIELA LADEIRA SANZO¹; ANGELITA REIS GOMES²; JULIANA TASENDE FERRANDO³; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁴; GIULIA BATISTA DE FREITAS⁵; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – sanzogabi@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – angelitagomes@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – tasendejul@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – giuliafreitas126.mm@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – renataosoriovet@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de inoculação subcutânea que afeta humanos e animais, e é caracterizada como uma zoonose (Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017). É uma doença negligenciada e emergente entre seres humanos e animais. Segundo Rabelo et. al 2020 a esporotricose atualmente é considerada a mais frequente micose subcutânea na América Latina. No Brasil é um grave problema de saúde pública e a maior epidemia zoonótica já registrada (GREMIÃO et al., 2017).

É causada por fungos do complexo *Sporothrix*, que compreende diversas espécies, as que causam doença pertencem ao clado patogênico que inclui *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. schenckii* e *S. luriei*, sendo *S. brasiliensis* e *S. schenckii* as de maior interesse clínico para cães e gatos (THOMSON et al., 2019; VIANA et al., 2018). No Brasil a espécie mais importante e prevalente é o *S. brasiliensis* (GREMIÃO et al., 2017).

Destes, *S. brasiliensis*, e *S. schenckii* são considerados altamente virulentos, provavelmente pela maior expressão de melanina, urease e proteases (Almeida-Paes et al., 2015). As espécies de *Sporothrix* diferem no seu potencial patogênico, na sua distribuição geográfica, na sua suscetibilidade à fármacos e outros compostos de bioprospecção e principalmente é de conhecimento que todas as espécies são reportadas no Brasil (Rodrigues et al., 2014b; Rodrigues et al., 2013b).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar molecularmente, por meio da técnica da PCR, as principais espécies de *Sporothrix* circulantes no Sul do Rio Grande do Sul, visto que essa é uma das regiões com grande casuística de esporotricose, traçando assim um perfil epidemiológico na região.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (Micvet), e no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária (LabMol-Vet), ambos laboratórios da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas cepas de *Sporothrix spp.* armazenadas na micoteca do Micvet, isoladas de casos de esporotricose em felinos e canino naturalmente infectados e provenientes de diversos municípios da região sudeste do estado do Rio Grande do Sul. As células fúngicas foram isoladas diretamente de lesões de pele, mucosas e órgãos e cultivadas em duplicata em Ágar

Mycosel® (DifcoLaboratorios, Detroit, Michigan) e Agar Sabouraud dextrose (DifcoLaboratorios, Detroit, Michigan) incubadas em temperaturas de 25°C e 37°C. Posteriormente à identificação fenotípica como *Sporothrix spp.* os isolados foram repicados em PDA (Agar potato dextrose - DifcoLaboratorios, Detroit, Michigan) e mantidos na micoteca. Esses isolados estocados na micoteca foram repicados em meio Agar Sabouraud dextrose e posteriormente realizada a extração do DNA para identificação molecular das espécies.

O DNA genômico dos isolados de *Sporothrix spp.* foi extraído diretamente de colônias miceliais por meio da técnica de extração de RNA/DNA por Brazol, técnica otimizada do popular método passo-único, baseado na metodologia desenvolvida por Chomczynski & Sacchi. Foi utilizado 100 ul de amostra para 333 ul de Brazol, agitado em vortex por 30 segundos e deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após foi adicionado 250ul de clorofórmio gelado, agitado novamente por aproximadamente 2 minutos e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 500 l de etanol absoluto gelado, agitado gentilmente por inversão por 2 minutos e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por aspiração com cuidado deixando o pellet, este foi lavado com etanol 70%, homogeneizado por inversão e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O conteúdo do sobrenadante é desprezado mais uma vez, o excesso de álcool restante no microtubo foi seco e o pellet foi dissolvido em tampão TE 1x estéril. A amostra foi quantificada quanto a sua concentração final de ácidos nucléicos através de leitura em espectrofotômetro estando após pronta para a amplificação.

O DNA obtido a partir das amostras foi amplificado pela reação de polimerização em cadeia (PCR) usando primers espécie-específico para de acordo com a região-alvo a ser amplificada (Saiki et al., 1988). As reações foram preparadas em volume final de 100 µL (0,2 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA Polimerase, 3,5 mM MgCl₂, tampão 1X, 0,2 pmol de cada primer). Realizadas em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto; anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão de 72 °C por 1 minuto; com extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos da amplificação (10 µL) acrescidos de 1µL de tampão de corrida 5X foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em TBE 1X (45 mM Tris, 4.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA dissódico, pH 8,3) e corados com brometo de etídio, durante 40 min a 100 v e visualizado em luz ultravioleta gerando bandas distintas para as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. mexicana*, *S. luriei* e *S. globosa* permitindo assim a diferenciação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a análise de 36 amostras, destas 30/36 (83,3%) foram caracterizadas molecularmente como *S. brasiliensis* e 6/36 (16,6%) se apresentaram negativas para a espécie. Destes isolados caracterizados molecularmente 21/30 (70%) pertenciam a gatos e 9/30 (30%) a cães. Em relação aos negativos para a espécie 5/6 (83,3%) eram provenientes de felinos e 1/6 (16,6%) de caninos. Para os isolados negativos para *S. brasiliensis*, as demais espécies patogênicas serão testadas.

Os resultados vêm de encontro com outros estudos, demonstrando que *S. brasiliensis* é a espécie predominante em epizootias no país (BOECHAT et al., 2018; MACÊDO-SALES et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2021a). *Sporothrix*

brasiliensis tem sido descrita como uma espécie emergente, altamente patogênica para o ser humano e animais, apresentando uma distribuição geográfica predominante no Brasil (BOECHAT et al., 2018). Embora a espécie *S. brasiliensis* seja a principal encontrada em animais, a grande maioria dos isolados ainda não foi caracterizada molecularmente, sendo assim a quantidade de isolados caracterizados ainda não é representativa da casuística.

Segundo Arrillaga-Moncrieff et al. (2009) *S. schenckii* pode ser considerada a segunda espécie com maior distribuição mundial, tendo sido relatados casos em seres humanos e animais no continente Americano, Europa, África do Sul e Ásia (MOUSSA et al., 2017; OLIVEIRA, M. et al., 2011). Em relação ao *S. globosa* em animais, apenas um isolado de felino originário do Japão foi caracterizado (MOUSSA et al., 2017) e tal espécie ainda não foi descrita em cães. O *Sporothrix luriei* é uma espécie rara, tendo sido isolada em casos humanos na África do Sul (MARIMON et al., 2008a) e Índia (PADHYE et al., 1992), e em um canino no Brasil (OLIVEIRA, D. et al., 2011).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se então que a maioria dos isolados foram de *S. brasiliensis*, indo de acordo com estudos prévios já realizados, demonstrando assim que estudos de epidemiologia molecular, apesar de ainda escassos, são importantes para melhor compreensão do perfil das espécies que circulam por cada região.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-PAES R., de Oliveira L.C., Oliveira M.M., Gutierrez-Galhardo M.C., Nosanchuk J.D., Zancope Â.; Oliveira R.M. **Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex.** Biomed Res Int. Apr:212308, 2015.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. et al. **Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model.** Clin Microbiol Infect, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.

BARROS, M. B. L., SCHUBACH, T. P., COLL, J. O., GREMIÃO, I. D., WANKE, B. & SCHUBACH, A. **Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia.** Rev Panam Salud Publica. 27: 455-460. 2010.

BOECHAT, J. S. et al. **Canine sporotrichosis: polyphasic taxonomy and antifungal susceptibility profiles of *Sporothrix* species in an endemic area in Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 52, n. 1, p. 135–143, 2 mar. 2021

Bonifaz A., Vázquez-González D. **Diagnosis and treatment of sporotrichosis lymphocutaneous: What are the options?** Curr. Fungal Infect. Rev. 2013;7:252–259.

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

DE CARVALHO, J. A. et al. **Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species.** *Studies in Mycology*, v. 100, p. 100129, set. 2021a

GREMIÃO IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira AS. **Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission.** *PLoS Pathog* 13(1), 2017.

MACÊDO-SALES, P. A. et al. **Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and noninfected populations.** *BMC Veterinary Research*, v. 14, n. 1, p. 19, 18 dez. 2018.

MADRID, I.M. V; Eccker, F.; Souza Neto, Franklin Mendonça. **Status epidemiológico da esporotricose na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul.** VIII Conferência Internacional de Medicina Veterinária do Coletivo. Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter), 2017

MARIMON, R. et al. ***Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin.** *Med Mycol*, v. 46, n.6, p. 621-625, 2008a.

Miranda L.H.M., Conceição-Silva F., Quintella L.P., Kuraiem B.P., Pereira S.A., Schubach T.M.P. **Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation.** *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013;36:425–432

MOUSSA, T. A. A. et al. **Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia.** *J Med Microbiol*, 2017. DOI 10.1099/jmm.0.000451.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. **Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil.** *Mycopathologia*. v. 172, n. 4, p. 257-267, 2011.

PADHYE, A. A. et al. **Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India.** *J Clin Microbiol*, v. 30, n. 9, p. 2492-2494, 1992.

Rabello V.B.S., Almeida M.A., Bernardes-Engemann A.R., Almeida-Paes R., de Macedo P.M., Zancopé-Oliveira R.M. **The Historical Burden of Sporotrichosis in Brazil: A Systematic Review of Cases Reported from 1907 to 2020.**

RODRIGUES, A.M. et al. **Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v. 55: p. 233-4, 2013b

RODRIGUES, A.M. de Hoog GS, Zhang Y, Camargo ZP. **Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species.** *Emerg Microbes Infect.* 3(5):e32, 2014b.

SOUZA, E.W. et al. **Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*.** *Sci. Rep.* 8, 9074, 2018.