

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO INFRAVERMELHO COM  
TRANSFORMADA DE FOURIER NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
*Sporothrix* spp.**

MICAELA FEDERIZZI

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO INFRAVERMELHO COM  
TRANSFORMADA DE FOURIER NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
*Sporothrix spp***

MICAELA FEDERIZZI

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Lúcia Scroferneker

**Co-orientador:** Prof. Dr. Valeriano Antonio  
Corbellini

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências  
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas.

Porto Alegre

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Federizzi, Micaela  
ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO  
INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER NA  
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Sporothrix* spp. / Micaela  
Federizzi. -- 2022.  
104 f.  
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Coorientador: Valeriano Antonio Corbellini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Esporotricose. 2. Espectroscopia FTIR. 3.  
Quimiometria. 4. *Sporothrix schenckii*. I.  
Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Corbellini,  
Valeriano Antonio, coorient. III. Título.

*"... o farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe  
ungentos úteis à saúde, e seu trabalho não  
terminará, até que a paz divina se estenda sobre a  
face da terra."*

*Eclesiástico 38:7-8*

## DEDICATÓRIA

À minha querida mãe *Teresinha Lurdes Federizzi* por sempre me incentivar a seguir o caminho dos estudos e me ensinar o valor do amor e do caráter. Sem seu apoio, confiança e principalmente pelo teu amor, nada disso teria sido possível. Tudo que alcancei até hoje foi graças à Deus e a ti, que nunca me deixaste desistir, ou me abater com as dificuldades. Essa conquista também é sua. Não tenho palavras para expressar o quanto eu te amo! Obrigada por ensinar-me o verdadeiro significado de MÃE.

**EU TE AMO MUITO, MUITO, MUITO MAIS!!!**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida. Por ter escutado as minhas orações e por ter me guiado na busca de todas as minhas conquistas.

À minha mãe Teresinha, por me apoiar em cada decisão, mesmo sabendo que minhas escolhas foram para longe. Sem teu amor eu jamais seria quem sou. Eu te amo, e te amarei eternamente.

Às minhas irmãs Patrícia e Mabli pelo carinho e apoio nessa jornada acadêmica que escolhi seguir. E por entender minha ausência na vida de vocês e de meus sobrinhos durante este período. Amo vocês!

Ao meu namorado Glaiton, para os íntimos cleitinho, pela paciência nos meus momentos de nervosismo, por nunca deixar eu desistir e principalmente por acreditar em mim, sou feliz por tê-lo ao meu lado. Te amo!

À minha querida sogra Eliane, pelo acolhimento em sua família, pelas conversas de apoio e pelo incentivo na continuação dos meus estudos.

Ao meu primo Luis Carlos Federizzi, pelos ensinamentos da vida. “Estou criando minha mala de ferramentas”.

À minha amiga e companheira de apartamento Lavínia, pelas inúmeras conversas atirada na cama, pelos bolos feitos em conjunto e pelas risadas aleatórias.

Aos meus amigos, Kerolin, Bruno, Jennifer, Guilherme, Maria Clara, Bianca e Eduarda por todas as amigas do grupo Perfeita Alegria, que sempre torceram por mim e me apoiaram nessa conquista.

Às minhas amigas farmacêuticas Luana, Juli e Flavi, do hospital Tacchini – BG, pelo apoio em seguir essa carreira.

Ao meu psicólogo Eduardo Eggres, por ser um profissional maravilhoso, que com seus ensinamentos me ajudou a crescer pessoalmente e profissionalmente.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo PPGCM pela oportunidade de ingresso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Scroferneker que me acolheu como membro da sua equipe e ao meu co-orientador Dr. Valeriano Corbelline pela confiança para realizar este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Alessandra Koehler, pela paciência em me orientar e ensinar nesse ciclo.

À professora Dr<sup>a</sup>. Cheila Stopiglia, por me incentivar a seguir no caminho da microbiologia, sem ela, eu não teria conhecido esse mundo lindo e apaixonante.

À técnica de laboratório da UNISC, Joce, pelo apoio e auxílio no meu experimento.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse o mestrado.

Meu muito obrigada a todos!

## RESUMO

**Introdução:** A esporotricose é um grave problema de saúde pública, por ser uma micose subcutânea causada pela implantação traumática do fungo dimórfico *Sporothrix* spp na pele, possuindo maior incidência na América Latina, tornando-se um problema grave de saúde pública. Seu diagnóstico é realizado através de exame direto e cultural à nível de gênero, e molecular para a identificação a nível de espécie, sendo uma técnica de alto custo. Deste modo, procuram-se novas ferramentas de identificação de micro-organismos, de fácil acesso e de baixo custo. Uma tecnologia inovadora para identificação é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) associada à quimiometria.

**Objetivo:** Identificar e diferenciar espécies de *Sporothrix* spp., utilizando FTIR e análises quimiométricas.

**Métodos:** Foram estudados 54 isolados genotipados de *Sporothrix*. Os isolados foram cultivados em placas com ágar Sabouraud, então preparados para a análise de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) no espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer). Cinco espectros foram adquiridos na faixa de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  para cada isolado. As análises quimiométricas foram realizadas no software Pirouette 4.5 (Infometrix), incluindo análise exploratória por meio de análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA).

**Resultados:** Os espectros foram semelhantes, com as bandas principais até aproximadamente 1700  $\text{cm}^{-1}$  e 1495  $\text{cm}^{-1}$  (bandas amida I e amida II). Esta mesma região foi responsável pela separação das amostras em PCA. O modelo OPLS-DA foi capaz de classificar corretamente todas as amostras com apenas uma variável latente, apresentando 100% de especificidade, sensibilidade e acurácia para *S. schenckii* e *S. brasiliensis* em relação às demais amostras.

**Conclusão:** A FTIR pode ser uma alternativa rápida e barata para identificação de espécies de fungo do gênero *Sporothrix*, principalmente quando associado à modelagem OPLS-DA.

**Palavras-chave:** Espectroscopia no Infravermelho; quimiometria; *Sporothrix* spp; *S. schenckii*; *S. brasiliensis*;

## ABSTRACT

**Background:** Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the traumatic implantation of the dimorphic fungus *Sporothrix* spp in the skin, having its highest incidence in Latin America, becoming a serious public health problem. Its diagnosis is carried out through direct and cultural examination at the gender level, and molecular for species-level identification, being a high cost technique. Therefore, new tools are being searched for the identification of microorganisms, easy to access and low cost. An innovative technology for identification is Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) associated with chemometrics.

**Objective:** Identify and differentiate species of *Sporothrix* spp. using FTIR and chemometric analyses.

**Methods:** A total of 54 genotyped *Sporothrix* isolates were studied. The isolates were cultivated on plates with Sabouraud agar, then prepared for a Attenuated Total Reflectance Analysis (FTIR-ATR) using a Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spectrometer (Perkin Elmer). Five spectrums were obtained in the range 4000 to 650  $\text{cm}^{-1}$  for each isolate. The chemometrics analyses were performed in Pirouette 4.5 software (Infometrix), including exploratory analysis using Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA).

**Results:** The spectrums were similar, with the main bands up to approximately 1700  $\text{cm}^{-1}$  and 1495  $\text{cm}^{-1}$  (amide I and amide II bands). This same region was responsible for the separation of the samples in PCA. The OPLS-DA model was able to correctly classify all samples with only one latent variable, showing 100% specificity, sensitivity and accuracy for *S. schenckii* and *S. brasiliensis* in relation to the other samples.

**Conclusion:** FTIR can be a fast and low-cost alternative for identification of species of fungus of the *Sporothrix* gender, especially when associated with OPLS-DA modeling.

**Keywords:** Infrared spectroscopy; chemometrics; *Sporothrix* spp; *S. schenckii*; *S. brasiliensis*;

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Macromorfologia do *Sporothrix chilensis* **A)** cultivo em ágar Sabouraud Dextrose após 14 dias de crescimento á 35°C, apresentando colônias membranosas de cor branca. **B)** cultivo em ágar Batata Dextrose após 7 dias de crescimento á 35°C, apresentando colônias cremosas de cor branca.....21
- Figura 2** – Microcultivo do *Sporothrix chilensis* **A)** característica microscópica da fase filamentosa corada com azul de algodão mostrando delicadas hifas hialinas septadas. **B)** presença de microconídeos em forma de flor de margarida.....22
- Figura 3** – Distribuição geográfica dos casos de esporotricose causadas por *S. brasiliensis* entre 1998 e 2016.....26
- Figura 4:** Diferentes manifestações clínicas causadas pela esporotricose. **A)** Lesões ulcerativas no membro superior – forma lifocutânea; **B)** Lesão eritematosa na face – forma cutânea fixa; **C)** Lesões ulcerativas nos membros inferiores – forma cutânea disseminada; **D)** Lesão ulceratia no membro superior – forma extracutânea.....29
- Figura 5:** Diferença entre as culturas de *Sporothrix sp.*: á esquerda, cultura em ágar Sabouroud Dextrose á 35°C por 14 dias apresentando melanização na cor marrom-preto; á direita, cultura em ágar Sabouroud Dextrose á 35°C por 14 dias na cor branca-bege sem a presença de melanina.....31
- Figura** - Marco conceitual da pesquisa realizada.....45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estratégia de busca de estudos para a revisão da literatura.....	19
<b>Tabela 2</b> - Interpretação de bandas normalmente encontradas em espectros no infravermelho microbiano.....	39
<b>Tabela 3</b> - Estudos de avaliação de fungos patogênicos humanos a partir de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AMB	<i>Amphotericin B</i> (Anfotericina B)
ANN	<i>Artificial Neural Network</i> (Redes Neurais Artificiais)
A/R	<i>Absorbance/Reflectance</i> (Absorbância/Refletância )
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
A/T	<i>Absorbance/Transmission</i> (Absorção/Transmissão)
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Reflexão Total Atenuada)
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Cromoblastomicose
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DRIFTS	<i>Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy</i>

ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FIR	<i>Far-infrared</i> (Infravermelho Distante)
FLU	<i>Fluconazole</i> (Fluconazol)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)
HCA	<i>Hierarchical cluster analysis</i> (Análise de Agrupamentos Hierárquicos)
HE	<i>Hematoxilina e Eosina</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IV	Infravermelho
IZT	<i>Itraconazole</i> (Itraconazol)
KET	<i>Ketoconazole</i> (Cetoconazol)
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight</i>

(ionização e desorção a laser assistida por matriz com analisador de tempo de voo)

MEA	<i>Malt extract agar</i> (Ágar Extrato de Malte)
MEB	<i>Malt Extract Broth</i> (Caldo Extrato de Malte)
MIR	<i>Mid-infrared</i> (Infravermelho Médio)
NIR	<i>Near-infrared</i> (Infravermelho Próximo)
PAS	<i>Ácido Periódico Schiff</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em Cadeia da Polimerase
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Ágar Batata Dextrose)
PLS	<i>Partial least squares regression</i> (Regressão por mínimos quadrados parciais)
PLSDA	Discriminant analysis by partial least squares (Análise discriminante por mínimos quadrados parciais)
PRM	<i>Peptídeo Rhamnomanano</i>

PSZ	<i>Posaconazole</i> (Posaconazol)
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (DNA polimórfico amplificado ao acaso)
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
SIMCA	Soft Independent Modeling by Class Analogy (Modelagem Independente Soft por Analogia de Classes)
SNC	Sistema Nervoso Central
SSKI	Solução Saturada de Iodeto de Potássio
<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
TOF-MS	<i>Time of Flight Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de tempo de voo)
TRB	<i>Terbinafine</i> (Terbinafina)
VRZ	<i>Voriconazole</i> (Voriconazol)
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (Extrato Levedura Peptona Dextrose)
YEPDA	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Agar</i> (Agar Extrato Levedura Peptona Dextrose)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Esporotricose</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Definição e aspectos gerais</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Fatos históricos</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Agentes etiológicos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Aspectos zoonóticos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Morfologia</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.7</b>	<b>Manifestações clínicas</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1.7.1</b>	<b>Forma linfocutânea</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1.7.2</b>	<b>Forma cutânea Fixa</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.7.3</b>	<b>Forma cutânea disseminada</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.7.4</b>	<b>Forma extracutânea</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1.8</b>	<b>Melanina</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1.9</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1.10</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Identificação de micro-organismos por FTIR</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.1.1</b>	<b>Identificação de fungos patogênicos humanos por FTIR</b> .....	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>MARCO CONCEITUAL</b> .....	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivo primário</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivos secundários</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>100</b>
<b>10.1</b>	<b>Comprovante de submissão à Revista Mycoses</b> .....	<b>100</b>
<b>10.2</b>	<b>STROBE Statement - checklist</b> .....	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose ou “doença do jardineiro” é uma micose causada pela implantação traumática do fungo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) na pele, que por sua vez é um fungo dimórfico presente tanto na forma micelial quanto na forma leveduriforme<sup>1,2</sup>. É a micose subcutânea mais comum na América Latina, tornando-se um problema grave de saúde pública<sup>3</sup>. O Rio de Janeiro é o estado com maior incidência de esporotricose, seguido pelo Rio Grande do Sul<sup>4</sup>. O complexo *Sporothrix* é composto por diferentes espécies: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. lurei*, *S. pallida* e *S. albicans*, com especial valor ao *S. brasiliensis*, considerada a mais virulenta do gênero *Sporothrix* e mais prevalente em humanos e animais, isolado exclusivamente no território brasileiro<sup>5,6</sup>.

A transmissão da esporotricose ocorre desde arranhões e mordidas de animais infectados a pequenas lesões durante as atividades de lazer, como jardinagem e horticultura<sup>7</sup>. Esta micose pode acometer diversos tipos de animais, contudo, os felinos possuem um importante papel epidemiológico na transmissão e na propagação da doença, devido à alta quantidade de células fúngicas infectantes, caracterizando-os como a principal fonte de infecção<sup>8,9</sup>. Por ser uma doença polimórfica, a esporotricose apresenta diferentes manifestações clínicas: a forma linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada e extracutânea, sendo as duas primeiras as mais frequentes em pacientes<sup>10</sup>. Alguns fatores contribuem na patogênese da esporotricose, como a profundidade do trauma, a imunidade do hospedeiro e a espécie de *Sporothrix* envolvida<sup>11</sup>.

Seu diagnóstico ocorre através de técnicas clássicas, como o cultivo microbiológico, exames citológicos e histopatológicos, até a utilização de técnicas moleculares complexas<sup>12</sup>. A suspeita clínica é o passo inicial para o diagnóstico precoce da esporotricose, visto que, em situações hiperendêmicas, o diagnóstico clínico e epidemiológico é aceitável para iniciar o tratamento, por isto a confirmação diagnóstica é fundamental para um tratamento correto<sup>13,14</sup>. A cultura fúngica é considerada o padrão ouro do diagnóstico da esporotricose, onde o isolamento de *S. schenckii* é obtido através do cultivo da amostra, tais como saliva e puncionado das lesões purulentas cultivados em ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana, ou em meio Cicloheximida na qual reduz a contaminação por alguns fungos saprófitos<sup>15,16</sup>. Microscopicamente o gênero *Sporothrix* apresenta hifas finas, septadas e ramificadas, com arranjo semelhante a “flor de margarida”<sup>17</sup>.

A esporotricose necessita de métodos precisos e confiáveis para sua identificação correta, e atualmente ao nível de espécie são utilizadas metodologias convencionais como a

biologia molecular, porém, estes métodos apresentam limitações, como custo elevado, tempo relativamente longo para obtenção dos resultados e alta geração de resíduos <sup>18,19</sup>. Portanto, nos últimos anos, novas metodologias para identificação de micro-organismos vêm sendo desenvolvidas, e um método que possui grande potencial é a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), essa técnica gera espectros que contêm a “impressão digital” da amostra e possui amplas aplicações na área médica e biológica <sup>20</sup>.

Uma das principais vantagens do uso do FTIR é a utilização de pequena quantidade de amostra e a necessidade mínima de preparação, resultando em pouca ou nenhuma geração de resíduos, precisão e rapidez da análise, além de armazenamento dos dados de maneira diretamente computadorizada <sup>21</sup>. Existem poucos estudos na literatura utilizando FTIR para identificação de fungos, no entanto, as metodologias já apresentadas possuem resultados promissores <sup>22,23</sup>. Considerando que a esporotricose é uma micose causada por um fungo patogênico, é realmente fundamental a realização de estudos que ampliem o conhecimento e tragam melhorias no diagnóstico e terapia desta micose, sendo a diferenciação a nível de espécies a maneira de obter um tratamento diferenciado e seguro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura está focada nos aspectos relacionados à esporotricose, junto com seus subtítulos (Definição, Histórico, Agentes Etiológicos, Epidemiologia, Aspectos Zoonóticos, Morfologia, Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Tratamento) e a Identificação de fungos no Infravermelho com Transformada de Fourier. Para a estratégia foram utilizadas revisões dos últimos cinco anos, envolvendo as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS e Embase, no período de 11 de fevereiro de 2022 a 04 de abril de 2022, além de referências relevantes citadas nos artigos encontrados para embasar alguns resultados não previstos na busca inicial. Os termos utilizados encontram-se na **Tabela 1**, na qual apresenta o esquema de busca utilizado, número de artigos encontrados, repetidos e incluídos em cada tópico de revisão de literatura.

**Tabela 1** - Estratégia de busca de estudos para a revisão da literatura.

<b>PALAVRAS-CHAVE / BASES DE DADOS</b>	<b>PUBMED</b>	<b>LILACS</b>	<b>EMBASE</b>	<b>REPETIDOS</b>	<b>INCLUÍDOS</b>
Sporotrichosis e suas derivações	565	58	816	432	69
Total de artigos em Esporotricose: Definição e aspectos gerais; Fatos históricos; Agentes etiológicos; Epidemiologia; Aspectos Zoonóticos; Morfologia; Manifestações clínicas; Diagnóstico; Tratamento.					<b>69</b>
Sporotrichosis AND Fourier Transform Infrared Spectroscopy	1	0	9	1	0
Fungi identification AND Fourier Transform Infrared Spectroscopy	122	0	66	14	10
Total de artigos em Infravermelho com Transformada de Fourier: Identificação de fungos por Infravermelho com Transformada de Fourier; Identificação de fungos patogênicos humanos por FTIR.					<b>10</b>

## 2.1 Esporotricose

### 2.1.1 Definição e aspectos gerais

A esporotricose, anteriormente conhecida como “doença do jardineiro”, é considerada uma micose subaguda ou crônica causada pelo agente etiológico *S. schenckii*, que por sua vez é um fungo dimorfo, presente tanto na forma miceliar quanto leveduriforme<sup>17</sup>. Localizadas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, esta infecção causada pelo *Sporothrix* ocorre devido a inoculação traumática do fungo na pele através de fragmentos vegetais, lesões causadas por animais ou matéria orgânica contaminada, e também pela inalação de esporos<sup>7,24,25</sup>.

Após a implantação do fungo no tecido do hospedeiro, o fungo se transforma na sua forma leveduriforme, causando então a infecção<sup>2</sup>. Na maioria dos casos, a esporotricose é uma infecção benigna, limita a pele e outros tecidos, em outros, a doença pode ser sistêmica, acometendo diferentes órgãos, como o pulmão<sup>26</sup>. Os pacientes acometidos com o fungo sofrem de sintomas relativamente comuns, como febre, fadiga, perda de peso, em alguns casos pneumonia e, claro, manifestações cutâneas típicas causadas pelo fungo<sup>27</sup>.

Considerada uma das zoonoses mais importantes e também como uma doença negligenciada, a esporotricose é considerada uma doença curável quando diagnosticada precocemente<sup>28</sup>. São raros os casos fatais, em geral, isso ocorre devido a extensão da lesão e ao tempo decorrido desde seu contato com o fungo<sup>29</sup>. Embora não seja considerada uma doença oportunista, pacientes imunocomprometidos, principalmente, portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), diabetes, entre outros, são considerados fatores predisponentes<sup>7</sup>.

### 2.1.2 Fatos históricos

O primeiro relato de esporotricose com o isolamento do fungo foi publicado em 1898 no Hospital John Hopkins, em Baltimore, Estados Unidos (EUA), pelo estudante de medicina Benjamin Schenck, denominando-o como *Sporotricha*<sup>30</sup>. O fungo foi isolado de lesões no antebraço e do dedo indicador de um paciente do sexo masculino, e analisado pelo fitopatologista Erwin Smith que o identificou como a espécie pertencente ao gênero *Sporotrichum*<sup>30</sup>. Após dois anos, em Chicago, EUA, Hektoen e Perkins relataram o segundo

isolamento do fungo em um ferimento no dedo indicador esquerdo de um menino de 5 anos, detalhando morfológicamente o patógeno, na qual passaram a chamar de *Sporothrix schenckii*<sup>31</sup>.

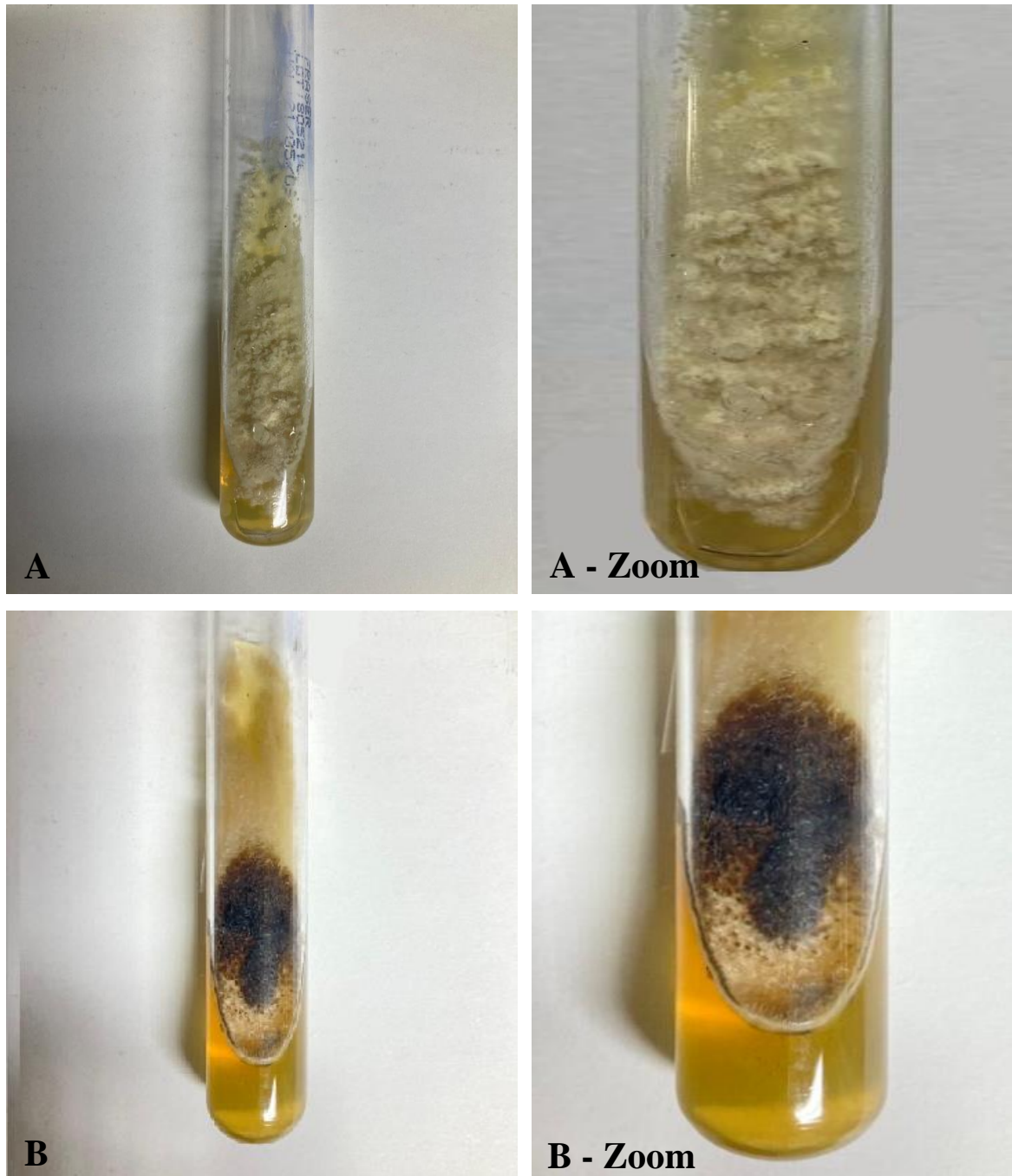
Em 1903, dois pesquisadores da França, De Beurmann e Ramond, relataram o primeiro isolado, e consideraram ser diferente do isolado descrito por Schenck, nominando-o então como *Sporotrichum beurmanni*<sup>32</sup>. Em 1910, Matruchot, redescreveu o fungo como *Sporotrichum schenckii*<sup>33</sup>. Carmichael, em 1963, propôs o nome do fungo *Sporothrix schenckii* após EUA e França considerarem que os isolados eram idênticos<sup>34</sup>.

Os primeiros relatos de esporotricose em ratos e humanos no Brasil foram descritos em São Paulo no ano de 1907 por Lutz e Splendore, quando cultivaram sua fase parasitária *in vitro*<sup>35</sup>. No Rio de Janeiro, a primeira descoberta do patógeno em humanos foi descrita por Terra e Rebelo, no ano de 1912, e casos de esporotricose felina foram descritos em 1998 por Baroni et al<sup>36,37</sup>. No Rio Grande do Sul, o primeiro caso foi descrito em 1964, em dois cães infectados<sup>38</sup>.

### 2.1.3 Agentes etiológicos

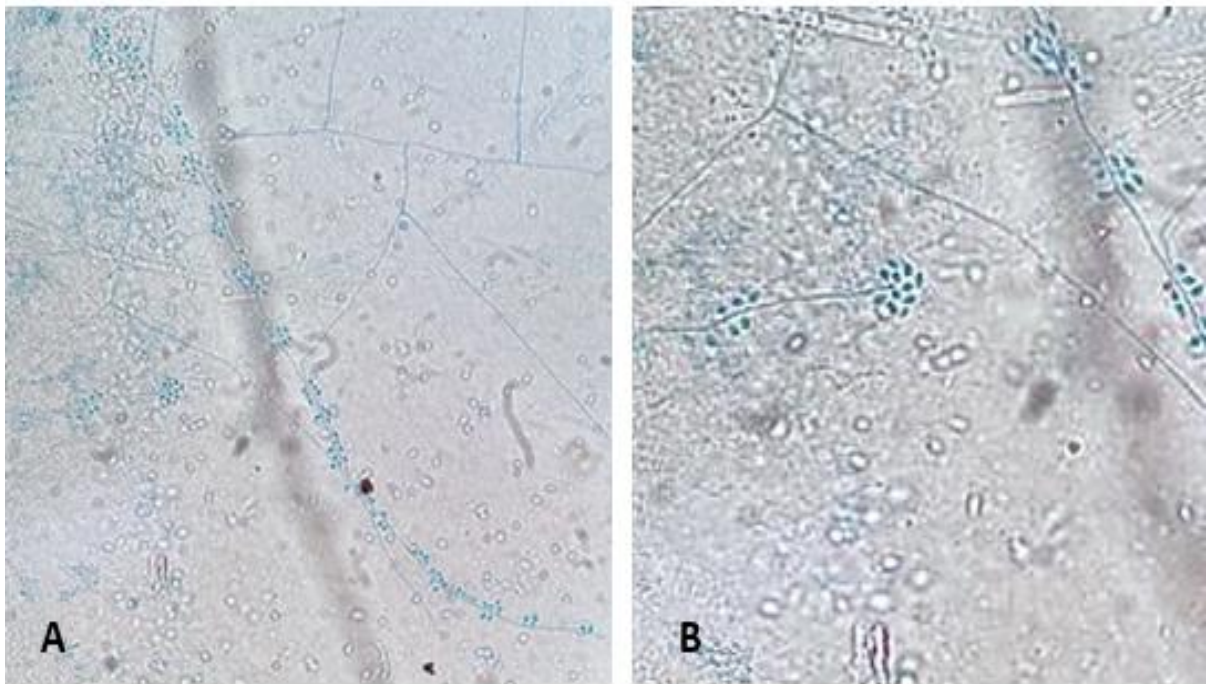
*Sporothrix schenckii*, causador da esporotricose, é um fungo dimorfo e saprófito pertencente à divisão *Ascomycota*, classe *Pyrenomycetos*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae* e gênero *Sporothrix*<sup>12,39</sup>. Considerado patogênico entre humanos e animais, o gênero *Sporothrix* engloba várias espécies com morfologias semelhantes<sup>7</sup>.

Seu dimorfismo é descrito pela forma leveduriforme, considerada forma parasitária, cultivada em 37°C, apresentando colônias brancas amareladas, com aspecto cremoso, de superfície lisa e úmida, sua micro-morfologia é caracterizada por células arredondadas, e pela forma filamentosa (micelial), cultivada entre 25 e 30°C, possuindo aspecto membranoso, inicialmente de cor branca-acinzentada assumindo uma coloração marrom devido à produção de melanina, representado na **Figura 1**<sup>8,40</sup>. Microscopicamente a forma filamentosa possui hinas hialinas e ramificadas, criando um enraizamento de conidióforos alongados, com conídios dispostos em forma de “flor de margarida”, representado na **Figura 2**<sup>17</sup>.



**Figura 1:** Macromorfologia do *Sporothrix sp.* **A)** cultivo em ágar Sabouraud Dextrose após 14 dias de crescimento á 35°C, apresentando colônias membranosas de cor branca. **B)** cultivo em ágar Sabouraud Dextrose após 14 dias de crescimento á 35°C, apresentando colônias membranosas de cor branco – marrom.

Fonte: Autoria própria.



**Figura 2:** Microcultivo do *Sporothrix chilensis* **A)** característica microscópica da fase filamentosa corada com azul de algodão mostrando delicadas hifas hialinas septadas. **B)** presença de microconídeos em forma de flor de margarida.

Fonte: Autoria própria.

A transformação da forma micelial para a leveduriforme ocorre com êxito entre as espécies clínicas *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. brasiliensis*, sendo esta última, considerada a mais virulenta do gênero *Sporothrix* prevalente em humanos e animais no Brasil<sup>5,6</sup>. Em contrapartida, as espécies ambientais *S. inflata*, *S. humicola*, *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis* produzem poucas células leveduriformes<sup>41</sup>.

A esporotricose já foi relatada em humanos e em diversas espécies de animais, desde chimpanzés a felinos, e está altamente dispersa na natureza, encontrada principalmente em material orgânico em decomposição<sup>42,43</sup>. Há uma importância regional em relação ao crescimento do fungo, em locais com clima tropical e subtropical onde a umidade é de 92 a 100%, proporcionando condições ideais de temperatura para seu desenvolvimento<sup>8,42</sup>. Na África do Sul e Austrália há uma predominância de *S. schenckii*, enquanto na região asiática a espécie predominante é *S. globosa*<sup>11</sup>.

#### 2.1.4 Epidemiologia

A esporotricose, conhecida como “doença do jardineiro”, é uma micose subaguda ou crônica, cuja seu agente etiológico, *Sporothrix schenckii*, está amplamente distribuído na natureza, acometendo horticultores, jardineiros, floristas e pescadores, devido a lesões causadas por plantas (espinhos, madeira, talos, flores, etc.)<sup>7</sup>. Contudo, além da transmissão sapronótica (plantas), há a transmissão zoonótica, normalmente associada ao agente etiológico *S. brasiliensis*, acometendo donas de casa, caçadores e, principalmente no Brasil, veterinários, devido a arranhaduras e mordidas de animais contaminados<sup>25,44</sup>.

Considerada uma doença cosmopolita, a esporotricose tornou-se a infecção subcutânea mais comum em humanos e animais da América Latina, distribuída em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no México, Brasil, Malásia, Índia, Japão e Peru<sup>8,12,45</sup>. Embora não seja uma doença de notificação compulsória, é alvo de numerosos estudos, esses, na maioria das vezes, publicados em casos clínicos<sup>7</sup>.

A maior epidemia já registrada ocorreu na África do Sul, em Witwatersrand, na década de 1940, quando mais de 3.000 trabalhadores de uma mina de ouro se infectaram devido à presença do fungo nas vigas de madeira que sustentavam os túneis<sup>46</sup>. Um estudo transversal mostrou que a epidemia de HIV e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) presente na África do Sul, não estão associadas ao aumento de casos de esporotricose<sup>47</sup>.

Outra grande epidemia ocorreu nos EUA, no ano de 1988, durante um programa de reflorestamento, onde 84 pessoas de 15 estados diferentes infectaram-se com um musgo contaminado por *S. schenckii*, devido à exposição á mudas de plantas<sup>48</sup>. Na década seguinte, houve uma pequena epidemia de esporotricose, após uma festa de Halloween, onde o feno presente no local estava contaminado<sup>49</sup>.

Recentemente, na Austrália, houve um aumento na incidência de esporotricose por *S. schenckii* devido à contaminação de feno presente em áreas rurais<sup>50</sup>. Outras áreas já consideradas endêmicas foram Japão, com cerca de 150 casos a cada ano durante as décadas de 1940 e 1980, Peru, com aproximadamente 28 anos de duração, e França, onde Beurmann e Gougerot descreveram centenas de casos<sup>51-53</sup>. Embora o fungo tenha sido isolado pela primeira vez na França, e até o século passado era alvo de uma grande epidemia, atualmente, há raros casos de infecção por *Sporothrix*<sup>11,53</sup>.

No Brasil, a esporotricose tornou-se uma micose muito comum, principalmente pelo envolvimento entre humanos e animais, sendo o sudeste brasileiro a área mais afetada, em

especial os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul <sup>54</sup>. No estado de São Paulo, casos de esporotricose foram relatados na década de 1920 quando Aguiar Pupo descreveu 76 casos de esporotricose humana transmitidos por via sapronótica. Após 30 anos, na década de 1950, foram relatados 344 casos de esporotricose, alguns, associados a felinos doentes <sup>55,56</sup>.

Ainda no século XX, o estado de São Paulo começou a relatar diversos casos de esporotricose humana, mas só no século seguinte houve um aumento nas infecções causadas por animais infectados <sup>57,58</sup>. Em 2011, o primeiro isolado genotipado como *S. brasiliensis* foi de casos humanos do distrito de Itaquera, zona leste de São Paulo <sup>59</sup>. Um estudo transversal mostrou que 40% dos casos de esporotricose humana no período de 2003 a 2013 estavam associados ao contato com felinos doentes, sendo 44% associados a trabalhadores rurais, 16% a empregadas domésticas e 12% a veterinários <sup>60</sup>. No período de 2010 a 2018, 260 casos de esporotricose humana foram diagnosticados, sendo 700% maior o número de casos no triênio 2016-2018 quando comparado ao triênio 2013-2015, já em felinos, foram relados 685 casos no triênio 2014-2016, e 3.081 no triênio 2017-2019, um aumento de 450% <sup>59,61,62</sup>.

No Rio Grande do Sul, até o ano de 1987, foram relatados 311 casos de esporotricose diagnosticados, sendo, 189 moradores do município de Santa Maria <sup>63</sup>. Dando continuidade ao estudo de Londero et al., Lopes e colaboradores, entre os anos 1988 a 1997, relataram 31 casos de esporotricose diagnosticados no Hospital Universitário de Santa Maria, destacando um declínio na incidência desta micose <sup>64</sup>. Na capital do estado, no município de Porto Alegre, entre 1967 e 2002, foram diagnosticados 304 casos de esporotricose humana provenientes do hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre <sup>65</sup>. No litoral do estado, no município de Rio Grande, 129 casos de felinos infectados com esporotricose foram confirmados no período de 2010 e 2014 <sup>66</sup>.

A ocorrência da esporotricose acomete animais e seres humanos de diversos lugares e regiões, mas nenhum deles atingiu proporções epidêmicas tão grande como o estado do Rio de Janeiro, tornando a esporotricose uma doença de notificação obrigatória, ou seja, todos os casos suspeitos devem ser registrados no Sistema de Informação de Notificação de Acidentes de acordo com as diretrizes da Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro <sup>5,8</sup>. Mais de 4.000 casos de esporotricose foram relatados entre os anos 1997 e 2011 pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) <sup>28</sup>. Na década anterior, entre 1987 e 1997, apenas 13 casos humanos de esporotricose havia sido relatado, em 1998 já eram 66 casos humanos, 7 caninos e 117 casos em felinos.

Desde então, os números aumentaram constantemente <sup>3,67</sup>. Em 2004 os números de infectados já alcançada quase 800 humanos e 1.600 felinos <sup>67</sup>.

Até o ano de 2015, a Fiocruz já havia relatado quase 5.000 casos de esporotricose humana e animal, separadamente <sup>8,54</sup>. Segundo o boletim epidemiológico de esporotricose do estado do Rio de Janeiro, em 2019, 1.586 pacientes foram confirmados com a doença e em 2020 houve uma diminuição de casos, sendo relatados 1.030 <sup>68</sup>.

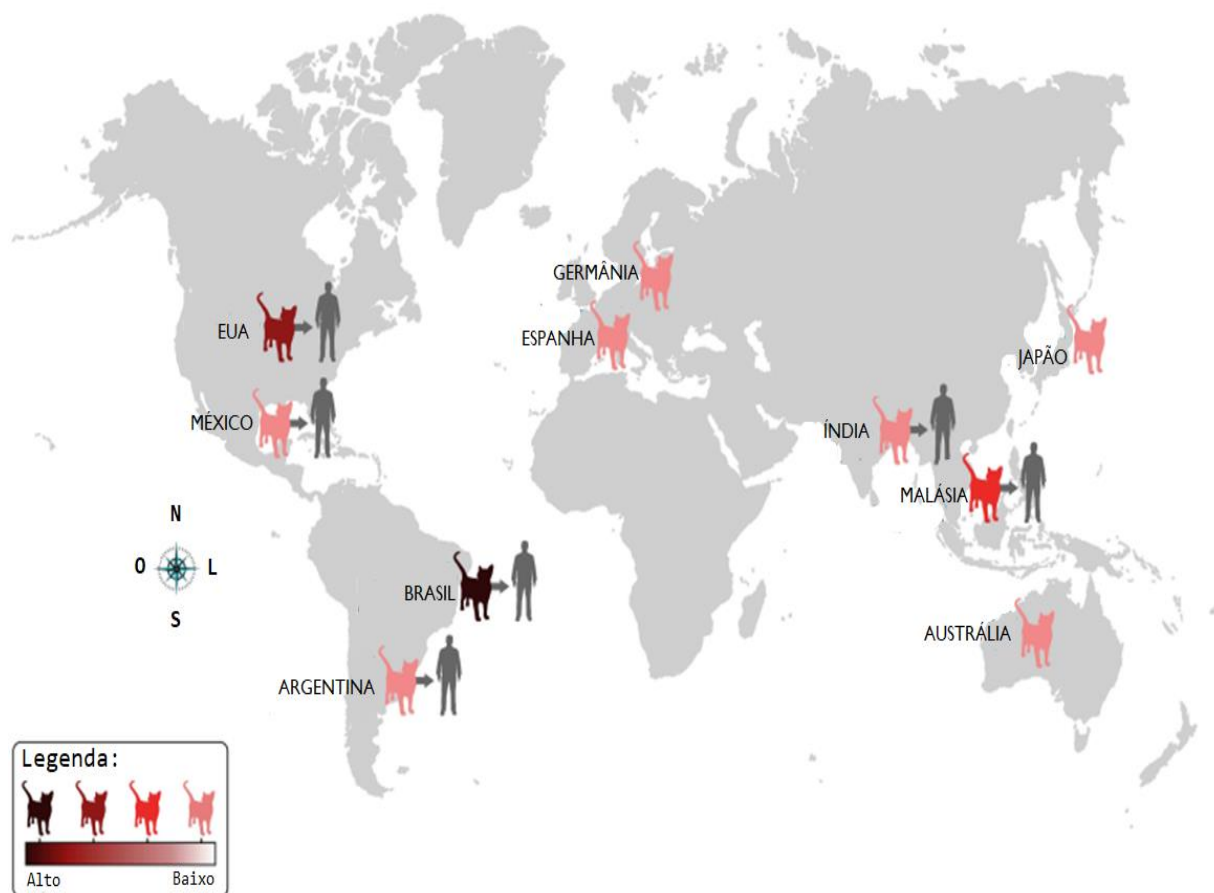
Fatores como idade, raça e sexo, não interferem no contágio da doença, contudo, há uma prevalência maior de mulheres infectadas na Índia e Japão devido ao grande número de mulheres na agricultura nestes países <sup>69</sup>.

### 2.1.5 Aspectos zoonóticos

Nos últimos 20 anos, a esporotricose tem chamando a atenção devido à sua transmissão zoonótica entre humanos e felinos em algumas regiões brasileiras, devido ao fato de conviverem no mesmo âmbito familiar, facilitando o contágio <sup>8</sup>. Em 1952, Singer e Muncie levantaram a hipótese da existência da transmissão zoonótica envolvendo gatos e humanos, mas só na década de 1980 o potencial zoonótico foi reconhecido, quando Read e Sperling relataram cinco indivíduos expostos a um gato infectado, sendo sua transmissão através de arranhões e mordidas desse animal <sup>70,71</sup>.

Os felinos domésticos são os principais transmissores da micose no homem quando comparado a cães, tatu, roedores, ou outros animais que demonstram um perfil zoonótico não tão significativo <sup>9</sup>. Com a domesticação destes gatos, houve uma facilidade na propagação desta zoonose <sup>9</sup>. Isso ocorre devido a quantidades elevadas de leveduras (alta carga fúngica) nas lesões cutâneas, apresentando maior sensibilidade à espécie *S. brasiliensis*, considerada esta, a espécie mais virulenta do complexo *Sporothrix* spp. <sup>6,72</sup>.

No Brasil, desde 1998 há relatos de transmissão zoonótica causada pela espécie *S. brasiliensis*, sendo o Rio de Janeiro o estado considerado hiperendêmico, associado a gatos doentes em relação as outras regiões que apresentam casos esporádicos de esporotricose (**Figura 3**) <sup>5,8,12,54</sup>. Nos demais países a esporotricose zoonótica causada por *S. brasiliensis* é praticamente inexistente, exceto na Argentina, que apresenta casos esporádicos <sup>73</sup>. Em contrapartida, a esporotricose zoonótica associada a *S. schenckii* tem sido descrita em inúmeros países, como EUA, México, Japão, Panamá, Malásia e Índia <sup>8,44</sup>.



**Figura 3:** Distribuição geográfica dos casos de esporotricose causadas por *S. brasiliensis* entre os anos de 1998 e 2016.

Fonte: Adaptado de Gremião et al. <sup>8</sup>.

### 2.1.6 Morfologia

O gênero *Sporothrix* engloba diferentes espécies, entre elas, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. albicans* e *S. chilensis*, ambas com morfologias semelhantes à forma filamentosa de *S. schenckii* <sup>2,17</sup>. Caracterizado como um fungo dimorfo capaz de infectar tanto humanos quanto animais, o *Sporothrix* apresenta duas fases morfológicas, a saprofítica (miceliar) cultivadas a 25°C, e a fase parasitária (leveduriforme) cultivadas a 37°C <sup>2</sup>. Macroscopicamente, o fungo na sua forma saprófita apresenta, dentro de duas semanas, colônias membranosas, com coloração branca amarelada que gradativamente assumem coloração marrom a negra, devido à formação de conídios e melanina <sup>2</sup>. Suas características

micromorfológicas são caracterizadas pela presença de conidiósporos alongados, com conídios unicelulares com formas elípticos ou ovaladas em forma de “ flor de margarida ”, suas hifas são hialinas e septadas <sup>17,74</sup>.

O *Sporothrix* na sua forma parasitária possui colônias cremosas de cor creme a cinza, e micromorfológicamente há a presença de células leveduriformes pequenas, ovaladas e em forma de “ charuto ”, podendo apresentar brotamento simples ou múltiplo <sup>17,75</sup>. Em 2007, Marinon e colaboradores consideraram a possibilidade da caracterização das espécies de *S. schenckii* através da morfologia dos conídios <sup>76</sup>.

Fungos saprófitas degradam todos os tipos de matéria orgânica, e o contato dos seres vivos com os metabólitos produzidos por eles, causam infecções, devido à perda da função decompositora, adaptando-se ao novo ambiente <sup>77</sup>. Durante esta evolução, espécies de *Sporothrix* desenvolveram alguns fatores de virulência para lidar com estresses ambientais, entre eles destacam-se a produção de melanina, que auxiliam na sobrevivência do micro-organismo <sup>78,79</sup>. Recentemente um estudo mostrou que na presença de algumas bactérias, a espécie *S. brasiliensis* produz maiores quantidade de melanina <sup>80</sup>.

## **2.1.7 Manifestações clínicas**

Por ser uma doença polimórfica, a esporotricose apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo elas, a linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada e extracutânea <sup>10</sup>. A forma linfocutânea e cutânea fixa são as mais frequentes em pacientes, enquanto a cutânea disseminada e extracutânea aparecem com menos frequência na população, mas quase sempre acometendo pacientes imunocomprometidos (HIV/AIDS, câncer, diabetes, alcoolismo) <sup>81</sup>. A forma de manifestação extracutânea resulta da inalação dos esporos, e mesmo sendo rara pode ser fatal <sup>7</sup>. Alguns fatores contribuem na patogênese da esporotricose, como a imunidade do hospedeiro, profundidade do trauma, quantidade do inóculo e a espécie de *Sporothrix* envolvida <sup>11</sup>.

### **2.1.7.1 Forma linfocutânea**

Das diferentes manifestações clínicas, a forma linfocutânea é considerada a mais frequente (80% dos casos), sendo resultado da inoculação dos esporos fúngicos na pele, principalmente em mãos e antebraços seguido por ulceração da lesão cerca de quatro semanas

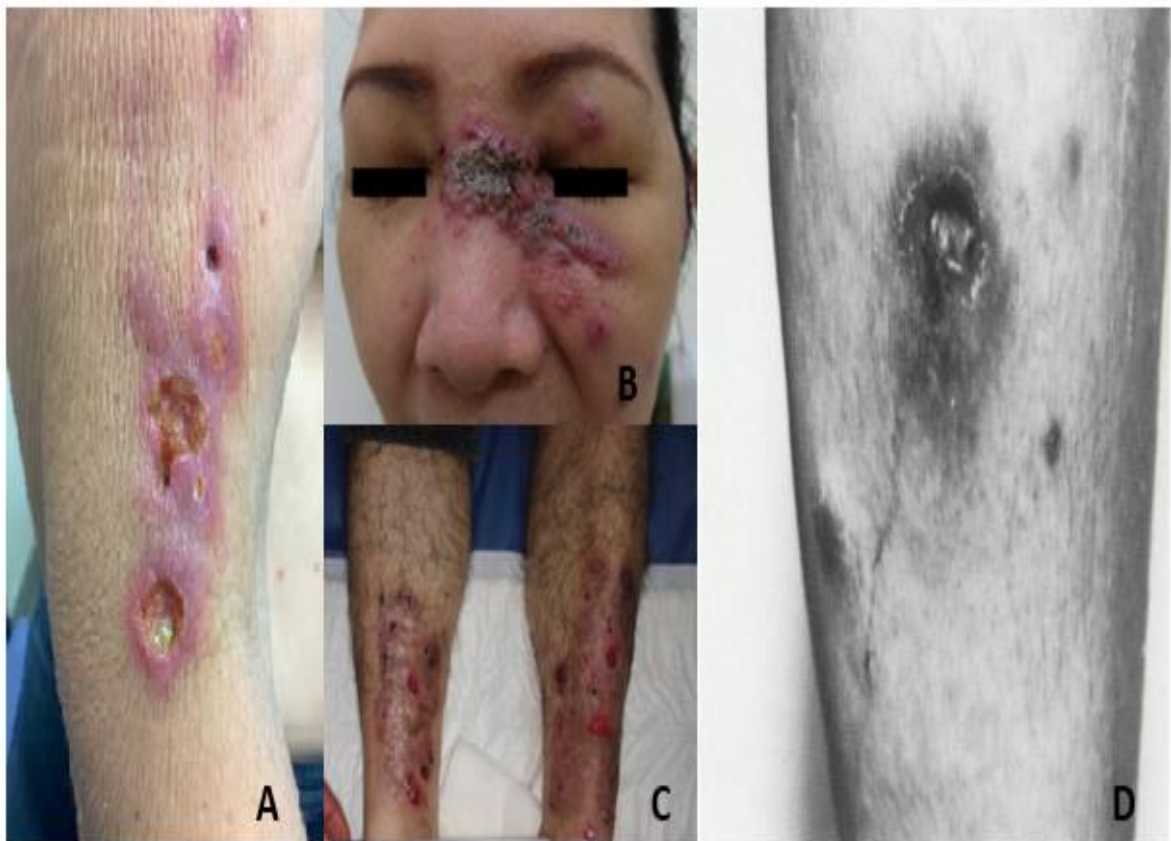
após o contágio (**Figura 4A**)<sup>81,82</sup>. A forma linfocutânea pode acometer pessoas de diferentes idades, sendo que em crianças ela se manifesta com lesões faciais e formação de nódulos, dificultando a diferenciação entre a forma cutânea fixa<sup>65,83,84</sup>. Na lesão primária, a infecção segue pelo trajeto linfático com a presença de nódulos indolores, já na lesão secundária há uma variação de morfologia na qual nódulos ou pápulas eritematosas ulceram, produzindo material purulento<sup>13,85</sup>. A cicatrização das lesões, se tratadas corretamente, ocorrem entre algumas semanas, podendo tornar-se crônicas caso não tratadas<sup>12</sup>.

#### **2.1.7.2 Forma cutânea fixa**

A forma cutânea fixa é vista em cerca de 20% dos infectados com esporotricose e geralmente acomete indivíduos de todas as idades, causando lesões papulosas com placas verrucosas ou ulceradas na face, pescoço, braços, mãos e pernas, normalmente indolores e restritas ao sítio de inoculação, sem comprometimento linfático (**Figura 4B**)<sup>13,86,87</sup>. As lesões causadas pela forma fixa tendem a apresentar remissão espontânea, mas podem recidivar, levando a cronicidade do caso, podendo persistir durante anos<sup>17</sup>.

#### **2.1.7.3 Forma cutânea disseminada**

A forma cutânea disseminada é relativamente rara, correspondendo cerca de 8% dos casos de esporotricose, podendo resultar da disseminação hematogênica geralmente associadas a pacientes imunossuprimidos (pacientes com HIV/AIDS, diabetes, etilista, uso de quimioterapia ou drogas imunossupressoras) causando lesões ósseas, pulmonares e articulares, devido a inalação ou ingestão dos esporos de *S. schenckii*<sup>7,88,89</sup>. Há relatos de esporotricose cutânea disseminada em pacientes de diferentes idades, mas poucos relatos em pacientes imunocompetes<sup>82,90,91</sup>. Inicialmente a forma disseminada pode apresentar lesões cutâneas verrugosas após três semanas do contágio, e ao alcançar a circulação linfática forma nódulos ulcerativos que podem liberar secreção (**Figura 4C**)<sup>92</sup>.



**Figura 4:** Diferentes manifestações clínicas causadas pela esporotricose. **A)** Lesões ulcerativas no membro superior – forma lifocutânea; **B)** Lesão eritematosa na face – forma cutânea fixa; **C)** Lesões ulcerativas nos membros inferiores – forma cutânea disseminada; **D)** Lesão ulcerativa no membro superior – forma extracutânea.

Fonte: Adaptado de Belda et al. <sup>85</sup>; Taninratapat et al. <sup>87</sup>; Alvarez-Rivero et al. <sup>91</sup>; Friedman et al. <sup>93</sup>, respectivamente.

#### **2.1.7.4 Forma extracutânea**

Entre as manifestações clínicas da esporotricose, a menos frequente é a forma extracutânea, caracterizada por afetar um ou mais órgãos devido a sua disseminação hematogênea, normalmente em pacientes imunocomprometidos <sup>7</sup>. Por ser de caráter oportunista, pode haver comprometimento dos ossos, pulmões, sistema nervoso central (SNC), olhos, articulações e pele <sup>17,94,95</sup>. Distúrbios osteoarticulares são os mais frequentes, podendo ocorrer mesmo sem a presença da lesão cutânea, afetando os metacarpos, a tíbia, articulações

do cotovelo e tornozelo, ou qualquer outro osso (**Figura 4D**)<sup>96</sup>. A esporotricose pulmonar ocorre mais comumente por meio da inalação dos conídios, e casos esporádicos tem sido descrito em pacientes portadores de HIV/AIDS, podendo ser confundida no primeiro instante como tuberculose, devido sua apresentação clínica semelhante<sup>97,98</sup>. O comprometimento do SNC é de difícil diagnóstico, sendo mais visto na forma de meningoencefalite e hidrocefalia, e na maior parte também associada a pacientes portadores de HIV/AIDS<sup>17</sup>.

### 2.1.8 Melanina

A pigmentação de cor marrom e/ou preta presente nas diferentes espécies de *Sporothrix* ocorre devido à deposição de melanina na sua parede celular, sendo esta, considerada fator de virulência no desenvolvimento da doença<sup>80</sup>. Além disso, a melanina possui o mecanismo de proteção ao fungo, seja ele contra altas temperaturas, condições de estresse, predação de outros micro-organismos presentes no solo, como também contra a fagocitose e morte por macrófagos, monócitos, e proteinases extracelulares, garantindo a sobrevivência dos fungos no ambiente e durante a infecção<sup>79,99,100</sup>. As principais espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* capazes de sintetizar pelo menos um dos três tipos de melanina (DHN-melanina, a L-DOPA-melanina, e a Piomelanina) são: *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*<sup>77,101</sup>. No presente estudo, as amostras melanizadas não interferiram no crescimento e na metodologia utilizada.

Além do gênero *Sporothrix*, outros fungos apresentam esta característica de melanização, como o *Paracoccidioides brasiliensis* e também agentes da cromoblastomicose (CBM), como visto no estudo de Heidrich e colaboradores, onde foi verificado que a melanina presente nos agentes da CBM conferiu proteção contra o estresse oxidativo em todos os isolados<sup>102-104</sup>. Na **Figura 5** é possível observar a diferença entre a cultura com e sem a presença de melanina.



**Figura 5:** Diferença entre as culturas de *Sporothrix sp* em ágar Sabouroud Dextrose a 35°C por 14 dias; à esquerda apresentando melanização; à direita, cultura branca-bege não-mielinizada.

Fonte: Autorial própria.

### 2.1.9 Diagnóstico

A esporotricose necessita de métodos precisos e confiáveis para sua identificação correta, e seu diagnóstico ocorre através de técnicas clássicas, como o cultivo microbiológico, exames citológicos e histopatológicos, sorodiagnóstico, até a utilização de técnicas moleculares complexas <sup>12</sup>. A suspeita clínica é o primeiro passo para o diagnóstico precoce da esporotricose, visto que, suas lesões cutâneas fazem diagnóstico diferencial com a leishmaniose tegumentar, tuberculose cutânea, paracoccidioidomicose, cromoblastomicose, blastomicose, e outras micobacterioses atípicas <sup>13</sup>. Em situações hiperendêmicas, o diagnóstico clínico e epidemiológico é aceitável para iniciar o tratamento, contudo, é importante ressaltar que o tratamento prévio com antifúngicos pode reduzir a sensibilidade dos exames laboratoriais para o diagnóstico da infecção, por isto a confirmação diagnóstica é fundamental para um tratamento correto, diminuindo a morbidade que impacta a saúde pública <sup>14</sup>.

A cultura fúngica é considerada o padrão ouro do diagnóstico da esporotricose, onde o isolamento de *S. schenckii* é obtido através do cultivo da amostra, tais como, saliva, fragmento

das lesões cutâneas, puncionado das lesões purulentas, secreção nasal, sangue e até líquidos sinovial, cultivados em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana, ou em meio ciclo-heximida na qual reduz a contaminação por alguns fungos saprófitos<sup>15,16</sup>. O cultivo é feito a 25°C e exige em média sete dias para o crescimento inicial do fungo, onde há o aparecimento de colônias filamentosas hialinas, inicialmente brancas, que com o tempo tornam-se de cor marrom no centro da colônia, devido à formação de melanina<sup>105</sup>. Microscopicamente observam-se hifas finas, septadas e ramificadas, com arranjo semelhante a “flor de margarida”<sup>17</sup>.

Por ser considerado um fungo de crescimento lento, é necessário a conversão da fase filamentosa para a leveduriforme por subcultura a 37°C em ágar sangue ou em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) para confirmar o suposto agente<sup>2</sup>. Entre cinco a sete dias, a colônia assumirá um aspecto cremoso de cor bege amarelado, sua micromorfologia apresenta células leveduriformes hialinas e globosas<sup>75</sup>. Para a confecção do microcultivo tanto na forma leveduriforme quanto filamentosa, a lâmina é feita utilizando lactofenol-azul de algodão em um microscópio óptico nos aumentos 100 e 400X<sup>106</sup>. Estas características morfológicas analisadas no microcultivo determinam a correta identificação do gênero, mas não são capazes de diferenciar as diferentes espécies do complexo *Sporothrix*<sup>107</sup>. É importante ressaltar que amostras sem crescimento em até duas semanas, não devem ser consideradas negativas, em algumas culturas é necessário manter por pelo menos 30 dias devido à possibilidade de crescimento tardio<sup>108</sup>.

Outros métodos utilizados para diagnóstico micológico direto da esporotricose são os exames citopatológico, histopatológico e imuno-histoquímico, especialmente em animais<sup>106</sup>. O exame citopatológico é considerado um exame simples, rápido e de baixo custo, realizado através da impressão da lesão cutânea<sup>43</sup>. Os métodos de coloração utilizados rotineiramente são do tipo Romanowsky, como o método Panóptico Rápido e/ou Gram e Giemsa<sup>43</sup>. A lâmina deve ser feita com qualidade para então ser corada e analisada por microscopia de luz, utilizando objetiva de 40× e 100×, para a observação de estruturas leveduriformes *Sporothrix* spp.<sup>109</sup>.

As estruturas fúngicas do *Sporothrix* são de difícil observação em amostras humanas, devido à escassez de células fúngicas, já em amostras felinas, há uma elevada carga fúngica presente, fazendo com que as células leveduriformes sejam facilmente encontradas<sup>110</sup>. Em felinos, as estruturas observadas são células leveduriformes de formato redondo a oval, podendo apresentar também forma de “charuto” no interior dos macrófagos e neutrófilos<sup>106</sup>. O exame citopatológico é recomendado em áreas endêmicas e quando há dificuldade em realizar a cultura

fúngica, permitindo que haja um tratamento precoce da doença, mas é importante ressaltar que resultados negativos não devem ser descartados devido a possibilidade de falso negativo <sup>43</sup>.

O exame histopatológico possui as mesmas limitações do citopatológico em relação ao não aparecimento de células de *S. schenckii* devido a escassez de leveduras nas lesões de humanos <sup>111</sup>. Para este exame, são coletadas amostras de pele das bordas das lesões e então fixadas em blocos de parafina para posterior biópsia <sup>112</sup>. Recomenda-se no mínimo 20 cortes seriados ao bloco de parafina <sup>112</sup>. Esse método utiliza a coloração Hematoxilina e Eosina (HE), Grocott e Ácido Periódico Schiff (PAS) para o diagnóstico de esporotricose, na qual facilita a observação das células em forma de “charuto” <sup>109</sup>.

As características do exame histopatológico em geral, são constituídas por microabscessos de neutrófilos, mostrando processo inflamatório granulomatoso e piogênico, sendo possível observar “corpos asteroides” e leveduras globosas e em “forma de charuto”<sup>113,114</sup>. A presença de corpos asteroides é chamada de fenômeno de Splendore-Hoeppli, que consiste em um material eosinofílico circundando a célula fúngica, ressaltando que esse fenômeno não é específico da esporotricose podendo ser observado em outras doenças infecciosas e granulomatosas <sup>114</sup>.

Outra opção possível, mas quase em desuso, é o teste intradérmico, utilizado desde 1947, que consiste em detectar hipersensibilidade tardia a esporotriquina ou Peptídeo Rhamnomano (PRM) através da aplicação intradérmica de antígenos obtidos de culturas filtrada de *S. schenckii* <sup>115</sup>. A aplicação é feita por injeção intradérmica no antebraço ou dorço, se resultado positivo, em 48h após aplicação, a área da injeção se torna eritematosa, dolorosa e endurecida <sup>7</sup>. Os casos cutâneos fixos e linfocutâneos, o teste é altamente positivo, em pacientes com baixa imunidade celular (AIDS, diabetes), e, em casos de esporotricose disseminada, há a possibilidade de diagnósticos falso negativo <sup>116,117</sup>.

Diferentes técnicas sorológicas podem ser empregadas no diagnóstico da esporotricose, como a imunoeletroforese, imonodifusão e aglutinação em látex, que atualmente estão sendo substituídas por testes imunoenzimáticos por apresentarem maior sensibilidade e rapidez <sup>76,112</sup>. Os testes imunoenzimáticos, em especial o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), é um teste que detecta anticorpos IgG utilizando antígenos purificados de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme, ou extrato bruto na forma filamentosa de *S. schenckii*, ambos com especificidade e sensibilidade satisfatórios, sendo utilizado tanto para diagnósticos humanos quanto para animais <sup>118-120</sup>.

Este teste possui papel fundamental na prevalência e transmissão do fungo, podendo ser aplicado no monitoramento do tratamento ou recidivas da esporotricose <sup>81</sup>. Sobretudo, mesmo com seu alto desempenho, o teste ELISA e as outras técnicas sorológicas citadas, fornecem um diagnóstico presuntivo da esporotricose, fazendo-se necessário o uso da correlação clínica e epidemiológica para diagnóstico final <sup>121</sup>.

Há ainda os testes de diagnósticos moleculares, na qual possuem papel importante na determinação de espécies, reduzindo cerca de 12h o tempo de identificação do agente e ajudando a minimizar surtos devido a espécies distintas de *Sporothrix* <sup>12</sup>. Por ser de difícil acesso em laboratórios convencionais, pesquisadores levaram ao desenvolvimento de diferentes métodos diagnósticos a nível molecular, a fim de identificar as diferentes espécies de *Sporothrix* através do sequenciamento de seus genes <sup>18</sup>. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada no diagnóstico da esporotricose, e principalmente na identificação ao nível de espécie, sendo uma técnica altamente sensível, e as amostras a serem analisadas podem ser desde culturas fúngicas, à fragmentos de tecidos congelados ou parafinizados <sup>19,122</sup>.

A PCR é baseada em sequências de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), que codificam proteínas, como beta-tubulina e calmodulina, sendo o gene CAL, o padrão ouro capaz de separar claramente as diferentes espécies na árvore filogenética <sup>107</sup>. Há também técnicas moleculares capazes de diferenciar *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. luriei*, através do DNA extraído de cultura pura, sendo o PCR espécie-específica, *Rolling Circle Amplification* (RCA) e T3B RAPD, porém, algumas dessas técnicas podem apresentar limitações devido a suas complexidades <sup>123-125</sup>.

Os métodos moleculares podem vir a se tornar sistemas de detecção e identificação rotineiros em laboratórios de micologia, por utilizar pequenas quantidades de amostras, quando comparado a métodos tradicionais, e outro método comumente utilizado é a *Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF), através da espectrometria de massa de tempo de voo (TOF-MS), onde possuem apenas o banco de dados de *S. schenckii*, não sendo capazes de diferenciar as diferentes espécies <sup>105,126,127</sup>. Possui a vantagem de identificar rapidamente as colônias com economia de material e mão de obra, porém, possui a desvantagem de ser um equipamento caro <sup>128</sup>.

### 2.1.10 Tratamento

A escolha do tratamento da esporotricose é baseada nas condições clínicas que o indivíduo apresenta, junto com a avaliação das interações medicamentosas e análises das lesões cutâneas, tudo para prevenir a disseminação de casos graves <sup>2</sup>. As medicações utilizadas ainda são bastante estudadas, e o baixo custo, a forma de administração, o local da infecção (se localizada ou disseminada), ou se há infecções sistêmicas e graves, influenciam na escolha da terapia <sup>13</sup>. Em geral, os medicamentos utilizados para humanos e animais são os mesmos, entretanto, casos de esporotricose felina representam um desafio no tratamento devido a dificuldades de administração dos fármacos e ao isolamento do animal em local próprio, contribuindo para o abandono do tratamento por parte do tutor <sup>129,130</sup>.

O uso de iodetos no tratamento da esporotricose foi descrito em 1903 por Sabouraud, e desde 1907, e através de De Bermann, sua solução saturada vem sendo utilizada para esporotricose cutânea e linfocutânea por apresentar resposta terapêutica satisfatória, fácil administração e baixo custo <sup>2,13</sup>. A solução saturada de iodeto de potássio (SSKI), não é efetiva para formas extracutâneas de esporotricose e no geral apresenta uma demanda grande de efeitos colaterais, incluindo iodismo, icterícia, tremores, intolerância gastrointestinal, hipertireoidismo, hipotireoidismo, problemas cardíacos, cefaleia, insônia e depressão, podendo ser suspensa a medicação por alguns dias e reinstituída com doses menores <sup>13,14</sup>.

A duração do tratamento é dependente do quadro clínico do paciente e de culturas negativas após a completa terapia, que varia de 3 a 4 meses. A administração é feita por via oral em solução saturada de iodeto de potássio 2 a 4 g/dia 3x/dia <sup>131</sup>. O uso do SSKI tem sido efetivo em casos de resistência a outros antifúngicos, podendo também ser utilizado por pacientes pediátricos, com dose máxima de 1 a 2g/dia 3x/dia <sup>131,132</sup>. Em gestantes e lactantes o uso de iodeto de potássio é contraindicado, devido ao alto risco de hipertireoidismo neonatal <sup>14</sup>.

Como alternativa ao iodeto, na década de 1980 o itraconazol (ITZ) entrou em cena, e apesar o alto custo, tornou-se o fármaco de primeira escolha para casos de esporotricose <sup>113,133</sup>. Pertencente à classe dos azóis, o ITZ nas doses de 100 a 200 mg/dia com duração de 3 a 6 meses costuma ser eficiente e tolerável, com menos efeitos adversos quando comparado ao SSKI <sup>134</sup>. Em pacientes pediátricos seu uso é recomendado com doses de 5 mg/kg/dia, e apesar de ser considerado o medicamento de escolha, está cada vez mais frequente espécies de *Sporothrix* resistentes ao ITZ <sup>81,135,136</sup>. Além da monoterapia, a associação do iodeto de potássio com o itraconazol mostrou ser efetivo com alta taxa de cura clínica no tratamento da esporotricose em

casos humanos e animais <sup>137,138</sup>. O fluconazol (FLU), também da classe dos azóis, na dosagem de 400 mg/dia, é utilizado como terapia de segunda linha contra a esporotricose, quando o paciente não consegue tolerar o itraconazol ou por apresentar interações medicamentosas <sup>13</sup>.

Em relação aos outros derivados azólicos, o cetoconazol (KET) não é recomendado por apresentar baixa eficácia clínica e hepatotoxicidade nos casos de esporotricose <sup>13</sup>. O posaconazol (PSZ) e o voriconazol (VRZ) mostraram ser efetivos em murinos, mas ainda não há relatos de sua efetividade em humanos infectados com *Sporothrix* <sup>139,140</sup>.

A terbinafina (TRB) é um antifúngico utilizado no tratamento de diferentes infecções, incluindo a esporotricose, por ser bem tolerado quando o Itraconazol não é uma opção a ser utilizada, seja por interações medicamentosas, resistência fúngica ou pelo custo do mesmo <sup>141,142</sup>. A dose recomendada é de 250 mg/dia em um período de 4 a 6 meses, e diferente dos triazólicos, a TRB apresenta menos efeitos colaterais e interações medicamentosas, sendo comumente relatados vômitos, desconforto abdominal e náuseas <sup>143</sup>. Seu uso associado ao ITZ tem se mostrado eficaz em casos de esporotricose cutânea <sup>143-145</sup>.

A anfotericina B (AMB), apesar da alta toxicidade na forma convencional, sua forma lipossomal é o medicamento de escolha em casos de esporotricose disseminada, pulmonar, em pacientes imunocomprometidos, gestantes e em casos de recidivas <sup>13,81</sup>. Seu uso é recomendado na fase inicial da doença, através da administração intravenosa na dose de 3-5mg/kg/dia, e após resposta positiva ao tratamento, a AMB pode ser substituída pelo Itraconazol <sup>96</sup>. A duração do tratamento varia de acordo com a resposta do paciente e aos efeitos colaterais presentes <sup>96</sup>. O uso de ITZ combinada com AMB lipossomal é descrita em casos de esporotricose <sup>29,146,147</sup>.

Além dos tratamentos com antifúngicos, há métodos alternativos que também podem ser usados, como a termoterapia e crioterapia <sup>148-150</sup>. A termoterapia consiste em submeter o local afetado a temperaturas acima de 42°C por 30 minutos 2x/dia, como banhos quentes e bolsas térmicas, devido ao fato de que *S. schenckii* é incapaz de crescer em temperaturas elevadas <sup>151</sup>. Esta técnica é normalmente combinada com outros fármacos, como o ITZ ou SSKI, não sendo recomendada como monoterapia <sup>149</sup>.

A crioterapia é mais invasiva e dolorosa que a termoterapia, ela consiste no congelamento do tecido biológico, levando à sua destruição, principalmente em doenças degenerativas ou neoplásicas <sup>149,152</sup>. Sua utilização ocorre quando o tratamento com itraconazol ou iodeto de potássio, no período superior a seis meses, não são suficientes para a melhora do paciente com lesões cutâneas <sup>153</sup>. Há relatos positivo do seu uso em humanos, em especial

mulheres gestantes e felinos, principalmente quando combinado há um fármaco antifúngico<sup>148,149,154</sup>.

## 2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

### 2.2.1 Identificação de micro-organismos por FTIR

A identificação das espécies de *Sporothrix* é realizada por meio da análise de DNA, porém, a técnica é considerada complexa, envolvendo vários passos e possuindo alto custo com os reagentes necessários para a análise, devido a estes aspectos, há uma crescente busca por novos métodos capazes de identificar micro-organismos através de ferramentas mais simples<sup>19,122,155</sup>. O método espectrométrico de massa MALDI-ToF e o método espectrométrico de infravermelho (IV) FTIR, estão sendo utilizados com maior frequência, em especial o FTIR, devido ao seu custo e sua rapidez<sup>127,156,157</sup>.

O uso da radiação IV iniciou-se por volta do ano de 1900, e na década de 60 surgiram os primeiros espectrômetros por transformada de Fourier, operando com o princípio do interferômetro de Michelson<sup>158</sup>. Somente uma década depois, em 1970, o uso do FTIR tornou-se popular, podendo hoje em dia, ser aplicada para qualquer tipo de composto<sup>159,160</sup>. A região IV é subdividida em três regiões, a região do IV próximo (*NIR*), do IV médio (*MIR*) e do IV distante (*FIR*), sendo o *MIR* a região mais utilizada para a identificação microbiana<sup>159</sup>.

FTIR é um método físico-químico baseado na vibração dos átomos e moléculas através da interação entre luz e matéria, capaz de identificar individualmente a frequência de cada espécie a ser analisada, gerando ao final, um espectro de IV contendo a “impressão digital” de cada amostra, ou seja, quais grupos funcionais estão presentes em cada uma delas<sup>161,162</sup>. Esta técnica possui aplicações muito amplas, sendo utilizada em diferentes áreas, considerada não destrutiva e relativamente fácil, capaz de utilizar pouca amostra, gerando uma quantidade mínima ou nula de resíduos, além de possuir alta sensibilidade e seletividade, com custos consideravelmente menores quando comparado às demais técnicas de identificação<sup>160,163</sup>.

Esta técnica é capaz de medir os comprimentos de ondas simultaneamente, tornando possível a coleta de vários espectros sem que haja aumento na relação sinal-ruído. Desta forma, seu uso tem sido largamente empregado na pesquisa científica, com uma ampla faixa de estudos biológicos<sup>164,165</sup>. Neste trabalho, o FTIR será empregado na identificação das espécies de *Sporothrix*, visto que, diversos estudos foram publicados com o uso do FTIR na identificação

de micro-organismos <sup>22,166-169</sup>. Mas além desta capacidade, os espectros de IV são úteis na detecção, quantificação e caracterização de diferentes compostos <sup>170-174</sup>. Na **Tabela 2** estão presente as bandas, com suas respectivas interpretações, que normalmente são encontradas em espectros de IV microbiano <sup>159</sup>.

As amostras microbianas para medições no IV devem ser aplicadas às técnicas de Absorbância/Refletância (*A/R*), Absorção/Transmissão (*A/T*), Reflexão Difusa (*DRIFTS*) ou Reflexão Total Atenuada (*ATR*) <sup>159</sup>. Tanto para a técnica *A/R* quanto para *A/T*, aplica-se o uso de uma suspensão microbiana desidratada em forma de uma película transparente, já na *DRIFTS* as amostras utilizadas são liofilizadas, nas amostras por *ATR* é utilizada uma análise direta de amostras de fungos para assegurar que haja contato direto com o cristal de diamante do *ATR* <sup>159,175</sup>. Por utilizar amostras na forma úmida ou liofilizadas, as técnicas *A/R*, *A/T* e *DRIFTS* são consideravelmente menos interessantes em amostras de fungos filamentosos/patogênicos, devido a facilidade dos esporos em serem dispersos no ambiente, tornando a técnica *ATR* a mais escolhida para esse tipo de amostra <sup>176</sup>.

Para análise dos conjuntos de dados espectrais da FTIR desenvolveram-se métodos estatísticos sofisticados, capazes de analisar os dados de absorbância espectral relacionados a várias frequências simultaneamente, tornando possível modelar as propriedades físico-químicas das amostras analisadas <sup>177,178</sup>. Esses métodos estatísticos são chamados de métodos de análise multivariada, dividindo-se em métodos supervisionados e não supervisionados, fazendo parte do campo da quimiometria, uma área consideravelmente rica para aquisição de dados, interpretação e concepção <sup>179,180</sup>. Os métodos não supervisionados incluem a Análise por Componentes Principais (*PCA*) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (*HCA*), ambos capazes de diferenciar espectros ainda não identificados, obtendo uma impressão da heterogeneidade e similaridade dos conjuntos de dados desconhecido, mostrando uma separação geral dos grupos presentes, além de detectar amostras anômalas, essas, excluídas para então submissão a uma análise por técnicas supervisionadas <sup>174,181</sup>.

Nas técnicas de análise supervisionada são incluídas a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*PLSDA*), a regressão por mínimos quadrados parciais (*PLS*) e a de redes neurais artificiais (*ANN*) <sup>181</sup>. Por possuírem conhecimento prévio das amostras a serem analisadas, as técnicas supervisionadas tornaram-se as mais recomendadas para identificação microbiana, com a capacidade de definir classes e otimizar modelos <sup>182</sup>. Dentre as diferentes técnicas, o *PLSDA* é a análise multivariada mais utilizada para classificação e discriminação, sendo uma ferramenta confiável, rápida e consideravelmente de baixo custo <sup>183,184</sup>.

**Tabela 2** - Interpretação de bandas normalmente encontradas em espectros no infravermelho microbiano.

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Interpretação
~3500	O-H: estiramento ou grupo hidroxila
~3200	N-H: estiramento (amida A) de proteína
2959	C-H: estiramento assimétrico de -CH <sub>3</sub>
2934	C-H: estiramento assimétrico de >CH <sub>2</sub>
2921	C-H: estiramento assimétrico de >CH <sub>2</sub> em ácidos graxos
2898	C-H estiramento de metina-CH
2872	C-H: estiramento simétrico de -CH <sub>3</sub>
2852	C-H: estiramento simétrico de >CH <sub>2</sub> em ácidos graxos
1741	>C=O estiramento de ésteres
1715	>C=O estiramento de ésteres, RNA/DNA, -COOH
~1695, 1685, 1675	amida I: folha pregueada antiparalela ou voltas β das proteínas
~1655	amida I de estrutura α-hélice
~1637	amida I de folha β pregueada
1548	amida II
1515	banda de tirosina
1468	C-H: deformação de >CH <sub>2</sub>
~1400	C=O: estiramento simétrico de COO <sup>-</sup>
1310–1240	amida III de proteínas
1250–1220	P=O: estiramento assimétrico de >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> de fosfodiésteres
1200-900	C-O-C, C-O: vibrações do anel de carboidratos C-O-P, P-O-P
1085	P=O: estiramento simétrico de >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
720	C-H <i>rocking</i> de >CH <sub>2</sub>
900-600	Região <i>Fingerprint</i>

Fonte: adaptado de Neumann.

### 2.2.1.1 Identificação de fungos patogênicos humanos por FTIR

Infecções fúngicas causadas por micro-organismos patogênicos têm aumentado concomitantemente durante os anos, e a identificação errônea de tais, pode levar a um tratamento antifúngico inadequado, causando complicações <sup>176</sup>. Embora os métodos de sequenciamento de genes sejam eficazes, o FTIR tornou-se um método promissor para a identificação rápida e precisa, especificamente na área microbiológica quando aliada a análises estatísticas multivariadas, permitindo monitorar alterações bioquímicas e moleculares das amostras microbianas analisadas <sup>176,185</sup>.

Estudos analisando fungos patogênicos humanos pela técnica de FTIR são recentes, sendo o primeiro deles publicado por Schmalreck e colaboradores no ano de 1998, com a diferenciação e caracterização de *Candida albicans* e *Exophiala dermatitidis*, comparadas com métodos convencionais de identificação <sup>186</sup>.

O artigo citado acima foi utilizado para compor a revisão da literatura sobre o tema, ademais, seguindo uma linha do tempo baseada na busca de dados dos últimos cinco anos de fungos identificados por FTIR, citada na **Tabela 1**, dez artigos tiveram como objetivo o uso de FTIR como possível método de identificação fúngica. Os estudos publicados estão apresentados na **Tabela 3**, onde alguns aspectos gerais dela podem ser discutidos, entre eles, estão:

- Das leveduras patogênicas apresentadas, o gênero *Candida* possuiu maior destaque, correspondendo a 50% de todos os estudos com o objetivo de identificar fungos patogênicos pela técnica de FTIR, sendo utilizadas tanto a técnica exploratória PCA e HCA como também SIMCA, CPCA, OPLS-DA, LDA e EMSC, para encontrar semelhanças e também diferenças entre as espécies;
- Alguns fungos filamentosos considerados patogênicos não oportunistas também estão presentes, como os dermatófitos do gênero *Microsporum* e *Trichophyton* e suas diferentes espécies, e também agentes da CBM como o gênero *Exophiala sp.*.
- Dentre os meios de cultura utilizados para análise das leveduras patogênicas, o Ágar Sabouroud correspondeu a 80% dos ensaios, enquanto o ágar YEPD correspondeu apenas 20% dos ensaios para leveduras. Os meios utilizados para análise dos fungos filamentosos patogênicos foram ASD, PDA e MEA, não havendo uma padronização específica. A padronização do cultivo é um pré-requisito indispensável para se obter espectros bons, visto que, os constituintes presentes nos meios de cultura são refletidos na fisiologia das células

**Tabela 3** - Estudos de avaliação de fungos patogênicos humanos a partir de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Morfologia	Gêneros/Espécies analisadas	Preparo da Cultura (Líquido ou sólido)	Preparo da amostra	Métodos de análises	Referência
Levedura	<i>Candida albicans</i>			HCA nas regiões: 3197-3600/ 698-902/ 900-1 200 / 1199-1500/ 1498-1801/ 2797-3003 / 3001-3300	186
Filamentoso	<i>Exophiala dermatitidis</i>				
Levedura	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida krusei</i>	ASD á 32°C por 24h	CHROMagar™ a 32 °C por 24h a 48 h para formar a biomassa	PCA SIMCA na região espectral de: 1792–1561 cm <sup>-1</sup>	187
Levedura	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	YEPDA á 37°C  Para gerar biomassa: Caldo YEPD a 37°C com agitação de 150 rpm	Suspensão de leveduras em água e seco	PCA/CPCA Nas regiões 3050-2800 cm <sup>-1</sup> e 1800-700 cm <sup>-1</sup>	185
Levedura	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i>	ASD á 25°C e 37°C por 7 dias	4 µL de suspensões de células de <i>Candida</i> a 10 <sup>8</sup> células/mL	PCA/HCA	188
Levedura	<i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. krusei</i>				
Filamentoso	<i>Trichophyton erinacei</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. tonsurans</i> e <i>T. violaceum</i> ,  <i>Microsporum canis</i> e <i>M. persicolor</i> ,  <i>Fusarium sp.</i>  <i>Penicillium sp.</i>	ASD á 28°C por 7 dias	Suspensão de colônia	HCA/PCA/SIMCA	189

ASD: ágar Sabouraud dextrose; YEPDA: Agar Extrato Levedura Peptona Dextrose; YEPD: Extrato Levedura Peptona Dextrose.

Continua

Morfologia	Gêneros/Espécies analisadas	Preparo da Cultura (Líquido ou sólido)	Preparo da amostra	Métodos de análises	Referência
Levedura	<i>Candida dubliniensis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. neoformans</i> <i>Trichosporon spp.</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Rhodotorula</i>	ASD á 30°C por 48h	Colônia isolada usando uma alça descartável estéril depositada diretamente na superfície de amostragem ATR	HCA/PCA	175
Filamentoso	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus acidus</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Aspergillus eucalypticola</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	PDA a 28°C por 7 dias	Suspensão adicionadas em cristal de ZnSe e seco	Infravermelho nas regiões 600 cm <sup>-1</sup> –3700 cm <sup>-1</sup>	190
Filamentoso	<i>Alternaria sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Paecilomyces spp.</i> <i>Peyronellaea spp.</i> <i>Phoma sp.</i>	MEA e MEB a 25°C por 5-6 dias	Suspensão e secas	EMSC	23

ASD: ágar Sabouraud dextrose; PDA: ágar Batata dextrose; MEA: ágar Extrato de Malte; MEB: Caldo Extrato de Malte.

Continua

Morfologia	Gêneros/Espécies analisadas	Preparo da Cultura (Líquido ou sólido)	Preparo da amostra	Métodos de análises	Referência
Filamentoso	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus tubingensis</i> e <i>Aspergillus niger</i>	MEA a 25°C por 7 dias	Suspensão dos micélios e liofilizados por 24h		22
Filamentoso	<i>Fonsecaea</i> <i>Cladophialophora</i> <i>Phialophora</i> <i>Exophiala</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	PDA a 30°C por 10 dias	Suspensão de conídios em ASD, fatias de cultura de ágar em papel filtro Whatman® secas em estufa de secagem.	HCA, PCA e OPLS-DA	174
Filamentoso	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Verticillium</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	PDA a 24°C por alguns dias	Suspensão adicionadas em cristal de ZnSe e seco	PCA e LDA	177

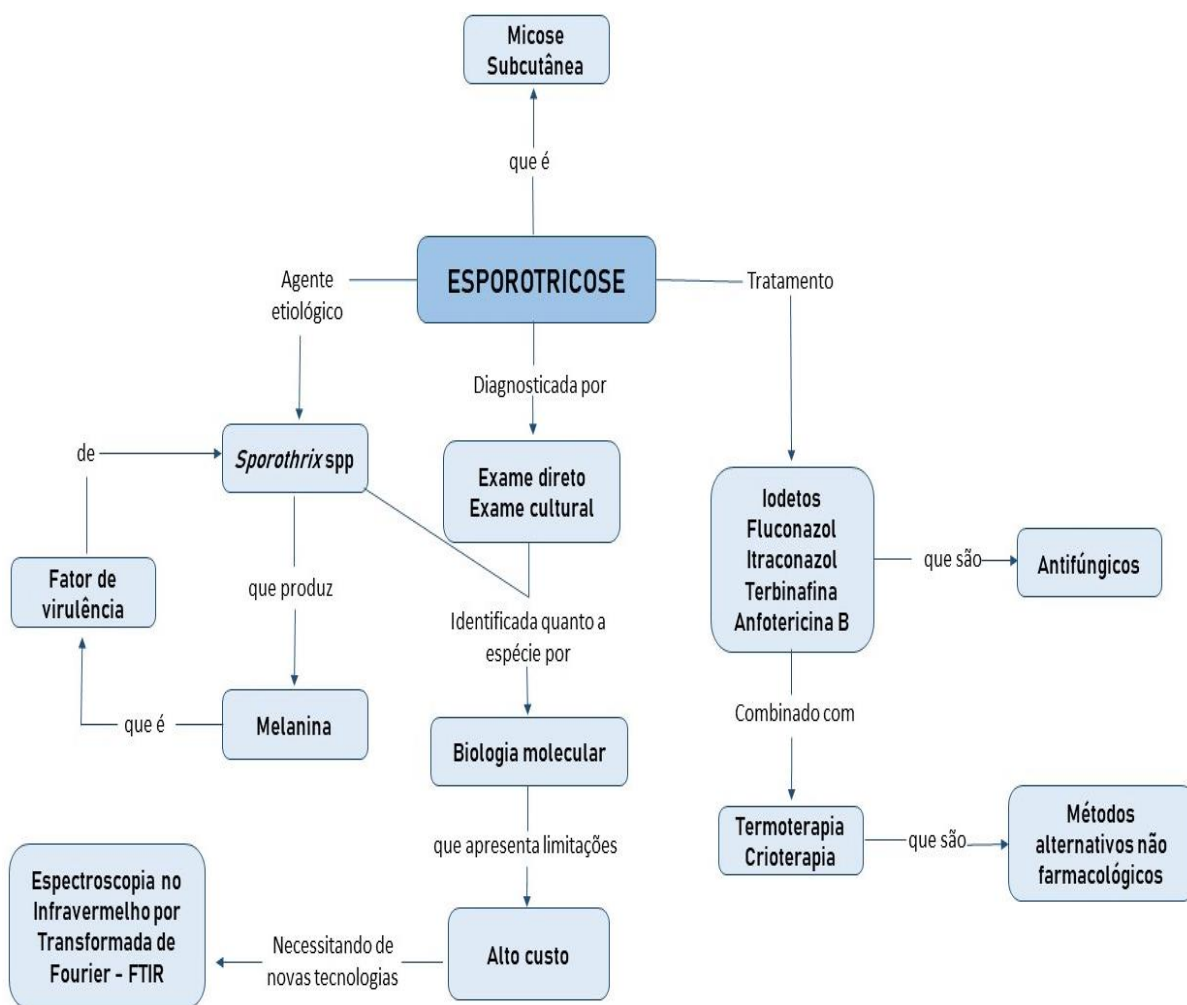
ASD: ágar Sabouraud dextrose; PDA: ágar Batata dextrose MEA: ágar Extrato de Malte.

Fonte: Autoria própria.

fúngicas, e os espectros no infravermelho englobam informações importantes sobre a composição das células <sup>191,192</sup>.

Os estudos presentes na **Tabela 3** confirmam o fato que a utilização de FTIR em combinação com técnicas quimiométricas para a identificação de fungos patogênicos possui um grande potencial para ser utilizado em laboratórios clínicos para devido às vantagens que apresenta em relação ao método de sequenciamento de DNA, e também pelo seu menor custo e rapidez na obtenção de resultados.

### 3 MARCO CONCEITUAL



**Figura** – Marco conceitual da pesquisa realizada.

Fonte: Autoria própria.

A figura acima representa o marco conceitual da pesquisa realizada, organizado na forma de um mapa conceitual, evidenciando os principais elementos da pesquisa e como se relacionam entre si. Abaixo serão descritos brevemente cada conceito e suas relações.

A esporotricose é uma micose subcutânea cujo principal agente etiológico é a espécie *Sporothrix schenckii*. Este fungo está presente principalmente na América Latina, sendo considerado Rio de Janeiro o estado brasileiro com maior incidência de casos. O *Sporothrix* é considerado um fungo dimorfo (presente tanto na forma miceliar quanto leveduriforme) capaz de produzir melanina, um dos fatores de virulência do fungo.

Outro fator em relação à esporotricose é o seu tratamento, que por vezes depende das condições clínicas que o indivíduo apresenta. Podem ser utilizados antifúngicos da classe dos azóis como o fluconazol e o itraconazol, como também Iodetos, a terbinafina e a anfotericina B. Além dos tratamentos com antifúngicos, há métodos alternativos que também podem ser usados, como a termoterapia e crioterapia que normalmente são combinadas com outros fármacos, não sendo recomendada como monoterapia.

A identificação de fungos do gênero *Sporothrix* é realizada através de exame micológico direto, com o intuito de observar as células parasitárias leveduriformes, a cultura fúngica é o padrão-ouro para o diagnóstico, que é obtido através de sementeiras em placas de ágar Sabouraud. Estas características estabelecem a identificação a nível gênero. Todavia, para identificação em nível de espécie são utilizadas metodologias convencionais como a biologia molecular, porém, estes métodos apresentam limitações por serem mais trabalhosos, terem um elevado custo e possuírem um tempo relativamente longo para obtenção dos resultados. Nesse sentido surgem novas metodologias, entre as quais se destaca a Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) associada com análises quimiométricas, que permitem ser aplicável a vários campos da biologia, sendo pouco laboriosos, de baixo custo e com rapidez nos resultados.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Para considerarmos uma técnica de diagnóstico boa, é preciso a combinação de diferentes características, como a facilidade de aplicação, uma alta sensibilidade e rapidez, além de possuir baixo custo e o mínimo de resíduos, e na esporotricose, a demanda é consideravelmente grande por novos métodos de diagnóstico para identificar corretamente as espécies patogênicas, e a espectroscopia no infravermelho representa uma metodologia simples e de baixo custo, podendo ser utilizada em diversos estudos da área médica e biológica. A FTIR é capaz de gerar uma quantidade mínima de resíduos, preservando a amostra, devido à necessidade de miligramas ou até mesmo microgramas para cada ensaio.

Assim, sua utilização para identificar e caracterizar micro-organismos é uma inovação tecnológica que garante o máximo de impacto, em relação à geração de dados significativos, com o mínimo de gastos financeiros. Apesar de ser uma metodologia promissora, há uma escassez na literatura de trabalhos que utilizaram FTIR como método de identificação de fungos patogênicos, assim, inseri-lo na identificação de micro-organismos gerará maior robustez na metodologia, impulsionando a tecnologia para utilização em laboratório clínico de identificação microbiológica. É fundamental o desenvolvimento de metodologias acessíveis, possibilitando novas descobertas que tragam benefícios para a sociedade.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo primário**

Avaliar o potencial da técnica de FTIR em associação com algoritmos de análise multivariada para a discriminação e identificação de agentes do complexo *Sporothrix* spp.

### **5.2 Objetivos secundários**

- Avaliar o perfil de impressão digital metabólica por FTIR micelial das amostras selecionadas;
- Avaliar a presença de padrões metabólicos associados às amostras de *Sporothrix* spp. através de algoritmos de análise exploratória (Análise por Componentes Principais-PCA);
- Avaliar a aplicabilidade da FTIR micelial em associação com algoritmos de classificação multivariada (OPLS-DA), supervisionada pelo método e identificação molecular para identificar e diferenciar *Sporothrix* spp.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sizar O, Talati R. *Sporotrichosis.*; 2022.
2. Rippon J. *Sporotrichosis. In: Rippon J, Editor. Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3rd Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company;; 1988.*
3. Barros MB de L, Schubach TMP, Gutierrez Galhardo MC, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(6):777-779. doi:10.1590/S0074-02762001000600006
4. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(6):e2281. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
5. Boechat JS, Oliveira MME, Almeida-Paes R, et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(3):185-196. doi:10.1590/0074-02760170407
6. Macêdo-Sales PA, Souto SRLS, Destefani CA, et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: A comparison between infected and non-infected populations. *BMC Vet Res.* 2018;14(1). doi:10.1186/s12917-018-1340-4

7. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. Published online 2017. doi:10.3390/jof3010006
8. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog.* 2017;13(1). doi:10.1371/journal.ppat.1006077
9. Silva FS, Cunha SCS, Moraes VA, Leite JS, Ferreira AMR. Refractory feline sporotrichosis: a comparative analysis on the clinical, histopathological, and cytopathological aspects. *Pesqui vet bras.* 2022;42:e06923-e06923. doi:10.1590/1678-5150-pvb-6923
10. Téllez-Martínez D, Batista-Duharte A, Portuondo DL, Carlos IZ. Prophylactic and therapeutic vaccines against sporotrichosis. Feasibility and prospects. *Microbes Infect.* 2019;21(10):432-440. doi:10.1016/j.micinf.2019.05.003
11. Rodrigues AM, della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia.* 2020;185(5):813-842. doi:10.1007/s11046-020-00425-0
12. Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Med Mycol.* 2018;56:S126-S143. doi:10.1093/mmy/myx103
13. Mahajan VK. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. *Dermatol Res Pract.* 2014;2014:1-13. doi:10.1155/2014/272376

14. Schechtman RC, Falcão EMM, Carard M, García MSC, Mercado DS, Hay RJ. Sporotrichosis: hyperendemic by zoonotic transmission, with atypical presentations, hypersensitivity reactions and greater severity. *An Bras Dermatol.* 2022;97(1):1-13. doi:10.1016/J.ABD.2021.07.003
15. Shimizu T, Akita S, Harada Y, et al. Sporotrichal tenosynovitis diagnosed helpfully by musculoskeletal ultrasonography. *Internal Medicine.* 2017;56(10):1243-1246. doi:10.2169/internalmedicine.56.7912
16. Suzuki R, Yikelamu A, Tanaka R, Igawa K, Yokozeki H, Yaguchi T. Studies in Phylogeny, Development of Rapid Identification Methods, Antifungal Susceptibility, and Growth Rates of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Japan. *Med Mycol J.* 2016;57(3):E47-E57. doi:10.3314/mmj.16-00005
17. KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE. Medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34(6):504-504. doi:10.1590/S0036-46651992000600018
18. Estrada-Bárceñas DA, Vite-Garín T, Navarro-Barranco H, et al. Genetic diversity of *Histoplasma* and *Sporothrix* complexes based on sequences of their ITS1-5.8S-ITS2 regions from the BOLD System. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):90-94. doi:10.1016/j.riam.2013.10.003
19. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun.* 2018;9(1):5135. doi:10.1038/s41467-018-07556-5
20. Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, et al. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials (Basel).* 2019;12(18). doi:10.3390/ma12182884

21. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res.* 2012;2(1):1-21.
22. Kogkaki EA, Sofoulis M, Natskoulis P, Tarantilis PA, Pappas CS, Panagou EZ. Differentiation and identification of grape-associated black aspergilli using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol.* 2017;259:22-28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.020
23. Shapaval V, Møretrø T, Wold Åsli A, et al. A novel library-independent approach based on high-throughput cultivation in Bioscreen and fingerprinting by FTIR spectroscopy for microbial source tracking in food industry. *Lett Appl Microbiol.* 2017;64(5):335-342. doi:10.1111/lam.12691
24. Nenoff P., Reinel D., Krüger C., et al. Tropen- und Reise-assoziierte Dermatomykosen. *Hautarzt.* Published online 2015:522-532. doi:10.1007/s00105-015-3635-8
25. Queiroz-Telles F, Buccheri R, Benard G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. *J Fungi (Basel).* 2019;5(1). doi:10.3390/jof5010008
26. Pluss JL, Opal SM. Pulmonary sporotrichosis: review of treatment and outcome. . *Medicine (Baltimore).* Published online 1986:143-153.
27. VASQUEZ-DEL-MERCADO E, ARENAS R, PADILLA-DESGARENES C. Sporotrichosis. *Clin Dermatol.* 2012;4:437-433.
28. Silva MBT da, Costa MM de M, Torres CC da S, et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2012;28(10):1867-1880. doi:10.1590/S0102-311X2012001000006

29. Gremião IDF, Gremião G, Menezes RC, et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol.* 2015;53:15-21. doi:10.1093/mmy/myu061
30. Schenck BR. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. *Bulletin of Johns Hopkins Hospital.* Published online 1898:286-290. doi:10.1139/b62-104
31. Hektoen L, Perkins CF. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. . *J Exp Med.* Published online 1900::5(1):77– 89.
32. de Beurmann L R. Abscesses sous-cutanés multiples d'origine mycosique. *Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie* . Published online 1903:4(4):678-685.
33. Matruchot L. Lês champignons pathogènes, agents des sporotrichoses. *Comptes Rendus de L Académie des Sciences* . Published online 1910:534-545.
34. CHARMICHAEL JW. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic Hyphomycetes. *Can J Bot, n 40.* Published online 1962:1137-1173. doi:10.1139/b62-104
35. Lutz A, Splendore A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Rev Med São Paulo* 1907;21:433–450.
36. Donadel K, Reinoso Y, Oliveira J, Azulay R. Esporotricose. *revisão An Bras Dermatol* 1993;68(1):45-52.
37. Baroni FA, Campos SG, Direito GM. Esporotricose em gatos (Descrição de um caso). . *Rev Bras Med Veterin, 20(1), 25-27, 1998.*
38. Londero AT, de Castro RM, Fischman O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. *Med Mycol.* 1964;3(4):273-274. doi:10.1080/00362176485190481

39. Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(3):454-500. doi:10.1128/CMR.12.3.454
40. Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc.* 2006;78(2):293-308. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
41. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(4):383-387. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004
42. Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic Transmission of Sporotrichosis: Case Report and Review. *Clinical Infectious Diseases.* 1993;16(3):384-387. doi:10.1093/clind/16.3.384
43. Silva GM, Howes JCF, Leal CAS, et al. Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife TT - Outbreak of feline sporotrichosis in the metropolitan area of Recife. *Pesqui vet bras.* 2018;38(9):1767-1771. doi:10.1590/1678-5150-pvb-5027
44. Rios ME, Suarez JMD, Moreno J, Vallee J, Moreno JP. Zoonotic Sporotrichosis Related to Cat Contact: First Case Report from Panama in Central America. *Cureus.* 2018;10(7):e2906. doi:10.7759/cureus.2906
45. de Carolis E, Posteraro B, Sanguinetti M. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. *Pathogens.* 2022;11(3). doi:10.3390/pathogens11030297

46. Helm M, Berman C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of sporotrichosis infection of the mines. Proceeding of the transvaal mine Medical Officers Association sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand, Johannesburg, the transvaal Chamber of Mines. Published online 1947.
47. Schwartz IS, Kenyon CR, Claasens S, et al. AIDS-related systemic mycoses endemic to Western Cape, South Africa and clinical mimics: A cross-sectional study of adults with advanced HIV and recent-onset, widespread skin lesions. *Tropical Medicine and International Health*. 2017;22:31. doi:10.1111/(ISSN)1365-3156
48. Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR, et al. A Multistate Outbreak of Sporotrichosis associated with Sphagnum Moss. *Am J Epidemiol*. 1992;136(4):475-487. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116521
49. Dooley DP, Bostic PS., Beckius ML. Spook House Sporotrichosis. *Arch Intern Med*. 1997;157(16):1885. doi:10.1001/archinte.1997.00440370135014
50. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod C, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. *BMC Infect Dis*. 2015;16(1):16. doi:10.1186/s12879-016-1338-0
51. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015;53(1):3-14. doi:10.1093/mmy/myu062
52. Ramírez Soto MC. Sporotrichosis: The Story of an Endemic Region in Peru over 28 Years (1985 to 2012). *PLoS One*. 2015;10(6):e0127924. doi:10.1371/journal.pone.0127924

53. Beurmann L, Gougerot H. Les Sporotrichose. Paris: Librairie Felix Alcan. Published online 1912.
54. Falcão EMM, de Lima Filho JB, Campos DP, et al. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015) TT. *Cad Saúde Pública (Online)*. 2019;35(4):e00109218-e00109218. doi:10.1590/0102-311x00109218
55. Pupo J. A. Esporotricose no Brasil. *An Paulist Med e Cir.* . Published online 1920:200-207.
56. Almeida F, Sampaio SAP, Lacaz CS, Fernandes JC. Dados estatísticos sobre análise de esporotricose de 344 casos. *Um Bras Dermatol*. 1955;30(1):9–12.
57. Larsson CE, Gonçalves M de A, Araujo VC, Dagli MLZ, Correa B, Fava Neto C. Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonóticos. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989;31(5):351-358. doi:10.1590/S0036-46651989000500010
58. Marques SA, Franco SRVS, Camargo RMP de, Dias LDF, Haddad Júnior V, Fabris VE. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993;35(4):327-330. doi:10.1590/S0036-46651993000400004
59. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2014;10(1):269. doi:10.1186/s12917-014-0269-5
60. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the state of São Paulo - Brazil, 2003 - 2013. *An Bras Dermatol*. 2015;90(2):273-275. doi:10.1590/abd1806-4841.20153447

61. Bittencourt AA, Oyafuso LKM, Cavalin RF, et al. A neglected disease. Human sporotrichosis in a densely populated urban area in São Paulo, Brazil: clinical-epidemiological and therapeutic aspects. *Braz J Microbiol*. Published online 2022. doi:10.1007/s42770-022-00713-5
62. Gremião IDF, Martins da Silva da Rocha E, Montenegro H, et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Braz J Microbiol*. 2021;52(1):107-124. doi:10.1007/s42770-020-00365-3
63. Londero AT, Ramos CD. Esporotricose no Rio Grande do Sul: Três décadas de observação. *An Bras Dermatol* 1989; 64(6):307-310.
64. Lopes JO, Alves SH, Mari CR, et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(5):541-545. doi:10.1590/S0037-86821999000500012
65. da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3):451-459. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
66. Sanchotene KO, Madrid IM, Klafke GB, et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*. 2015;58(11):652-658. doi:10.1111/myc.12414
67. Schubach A, Barros MB de L, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(2):129-133. doi:10.1097/QCO.0b013e3282f44c52
68. *BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPOROTRICOSE Nº 001/2021 - Cenário Epidemiológico Da Esporotricose No Estado Do Rio de Janeiro – Anos de 2019 e 2020.*

69. Gordon MA, Lapa EW, Fitter MS, Lindsay M. Susceptibility of zoopathogenic fungi to phytoalexins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;17(2):120-123. doi:10.1128/AAC.17.2.120
70. SINGER JI, MUNCIE JE. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. *N Y State J Med.* 1952;52(17:1):2147-2153.
71. Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch Dermatol.* 1982;118(6):429-431.
72. de Miranda LHM, Silva JN, Gremião IDF, et al. Monitoring Fungal Burden and Viability of *Sporothrix* spp. in Skin Lesions of Cats for Predicting Antifungal Treatment Response. *J Fungi (Basel).* 2018;4(3). doi:10.3390/jof4030092
73. Etchecopaz AN, Lanza N, Toscanini MA, et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. *J Mycol Med.* 2020;30(1). doi:10.1016/j.mycmed.2019.100908
74. St-GERMAIN G, SUMMERBELL R. Identifying filamentous fungi: a clinical laboratory handbook. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(3):152-152. doi:10.1590/S0036-46652003000300017
75. Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. *A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases.* Wolfe Medical Publications Ltd 1980; Pp. 112-115.
76. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3198-3206. doi:10.1128/JCM.00808-07

77. Song Y, Yao L, Zhen Y, et al. Sporothrix globosa melanin inhibits antigen presentation by macrophages and enhances deep organ dissemination. *Braz J Microbiol.* 2021;52(1):19-31. doi:10.1007/s42770-020-00345-7
78. Tamez-Castrellón AK, Romeo O, García-Carnero LC, Lozoya-Pérez NE, Mora-Montes HM. Virulence factors in sporothrix schenckii, one of the causative agents of sporotrichosis. *Curr Protein Pept Sci.* 2020;21(3):295-312. doi:10.2174/1389203720666191007103004
79. Guan MQ, Yao L, Zhen Y, Song Y, Cui Y, Li SS. Melanin of Sporothrix globosa affects the function of THP-1 macrophages and modulates the expression of TLR2 and TLR4. *Microb Pathog.* 2021;159. doi:10.1016/j.micpath.2021.105158
80. Almeida-Paes R, Borba-Santos LP, Rozental S, Marco S, Zancopé-Oliveira RM, da Cunha MML. Melanin biosynthesis in pathogenic species of Sporothrix. *Fungal Biol Rev.* 2017;31(1):50-59. doi:10.1016/j.fbr.2016.09.001
81. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, et al. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. 2017;92(5):606-620. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
82. Yagnik KJ, Skelton WP, Olson A, Trillo CA, Lascano J. A rare case of disseminated Sporothrix schenckii with bone marrow involvement in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *IDCases.* 2017;9:70-72. doi:10.1016/j.idcr.2017.06.012
83. Paiva A de CM, Biancardi AL, Curi ALL. Different clinical manifestations of ocular sporotrichosis in the same patient: an alert to ophthalmologists in nonendemic areas. *Arq bras oftalmol.* 2020;83(5):457-458. doi:10.5935/0004-2749.20200107

84. Schwalb A, Carcamo PM, Seas C. Lymphocutaneous Sporotrichosis. *Am J Trop Med Hyg*. Published online January 24, 2022. doi:10.4269/ajtmh.21-1212
85. Belda W, Domingues Passero LF, Stradioto Casolato AT. Lymphocutaneous Sporotrichosis Refractory to First-Line Treatment. *Case Rep Dermatol Med*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/9453701
86. Azulay RD, Azulay DR. Sporotrichosis. In: Azulay RD, Azulay DR. *Dermatology*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p.213-214.
87. Taninratapat N, Srisuttiyakorn C. Localized Cutaneous Sporotrichosis on Face in Healthy Thai Female. *Mycopathologia*. 2019;184(4):539-542. doi:10.1007/s11046-019-00354-7
88. Ferreira TA, Trope BM, Barreiros G, Quintela DC, Ramos-E-Silva M. Atypical manifestation of disseminated sporotrichosis in an AIDS patient. *Case Rep Dermatol*. 2018;10(3):231-237. doi:10.1159/000493181
89. Aronowitz PB, Gilroy M, Christiansen KN. Disseminated Sporotrichosis with Osteolytic Bone Involvement. *J Gen Intern Med*. 2017;32(9):1063. doi:10.1007/s11606-017-4048-4
90. Fernandes B, Caligorne RB, Coutinho DM, et al. A case of disseminated sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol Case Rep*. 2018;21:34-36. doi:10.1016/j.mmcr.2018.03.006
91. Alvarez-Rivero V, Hernandez-Castro R, Moreno-Coutiño G, Lozano-Platonoff A. Disseminated Sporotrichosis: An Important Differential Diagnosis for Venous Ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2020;33(9):1-3. doi:10.1097/01.ASW.0000666908.88965.35

92. Panduro NT, Alvarez MIR. Unusual presentation of disseminated cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient. *J Am Acad Dermatol.* 2018;79(3):AB307. doi:10.1016/j.jaad.2018.05.1210
93. Friedman SJ, Doyle JA. Extracutaneous Sporotrichosis. *Int J Dermatol.* 1983;22(3):171-176. doi:10.1111/j.1365-4362.1983.tb03358.x
94. Furtado L de O, Biancardi AL, Cravo LM de S, Anjo RPP, Moraes Junior HV de. Ocular sporotrichosis: atypical manifestations. *Rev bras oftalmol.* 2019;78(1):59-61. doi:10.5935/0034-7280.20190014
95. Yamagata JPM, Rudolph FB, Nobre MCL, et al. Ocular sporotrichosis: A frequently misdiagnosed cause of granulomatous conjunctivitis in epidemic areas. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2017;8:35-38. doi:10.1016/j.ajoc.2017.09.005
96. Lederer HT, Sullivan E, Crum-Cianflone NF. Sporotrichosis as an unusual case of osteomyelitis: A case report and review of the literature. *Med Mycol Case Rep.* 2016;11:31-35. doi:10.1016/j.mmcr.2016.04.001
97. Aung AK, Teh BM, McGrath C, Thompson PJ. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. *Med Mycol.* 2013;51(5):534-544. doi:10.3109/13693786.2012.751643
98. Sharon VR, Kim J, Sudhakar S, Fung MA, Maniar A. Disseminated cutaneous sporotrichosis. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(1):95. doi:10.1016/S1473-3099(12)70140-8
99. Hillmann F, Novohradská S, Mattern DJ, et al. Virulence determinants of the human pathogenic fungus *A spergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. *Environ Microbiol.* 2015;17(8):2858-2869. doi:10.1111/1462-2920.12808

100. Almeida-Paes R, Brito-Santos F, Oliveira MME, et al. Interaction with *Pantoea agglomerans* Modulates Growth and Melanization of *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 2019;184(3):367-381. doi:10.1007/s11046-019-00350-x
101. Waller SB, Dalla Lana DF, Quatrin PM, Ferreira MRA, Fuentefria AM, Mezzari A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Braz J Microbiol*. 2021;52(1):73-80. doi:10.1007/s42770-020-00307-z
102. da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*. 2006;8(1):197-205. doi:10.1016/j.micinf.2005.06.018
103. Li XQ, Guo BL, Cai WY, et al. The role of melanin pathways in extremotolerance and virulence of *Fonsecaea* revealed by de novo assembly transcriptomics using illumina paired-end sequencing. *Stud Mycol*. 2016;83(1):1-18. doi:10.1016/j.simyco.2016.02.001
104. Heidrich D, Corbellini VA, Mendes SDC, et al. Melanin: Quantification and protection against oxidative stress in chromoblastomycosis agents. *Med Mycol*. 2019;57(2):260-263. doi:10.1093/mmy/myy013
105. Zhang M, Li F, Li R, Gong J, Zhao F. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(2). doi:10.1371/journal.pntd.0007219
106. Silva JN, Miranda LHM, Menezes RC, et al. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. *J Comp Pathol*. 2018;160:72-78. doi:10.1016/j.jcpa.2018.03.002

107. Rudramurthy SM, Chakrabarti A. Sporotrichosis: Update on Diagnostic Techniques. *Curr Fungal Infect Rep.* 2017;11(3):134-140. doi:10.1007/s12281-017-0283-8
108. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis. In: Seyedmousavi S, de Hoog GS, Guillot J, Verweij PE, editors. *Emerging and epizootic fungal infections in animals.* Cham: Springer; 2018. p. 199–231.
109. Pereira SA, Menezes RC, Gremião IDF, et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg.* 2011;13(4):220-223. doi:10.1016/j.jfms.2010.10.007
110. Jessica N, Sonia RL, Rodrigo C, et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. *Med Mycol.* 2015;53(8):880-884. doi:10.1093/mmy/myv038
111. Maria R, de R, de Oliveira MME, Saraiva Freitas DF, Gutierrez Galhardo MC. New Diagnostic Applications in Sporotrichosis. In: *Skin Biopsy - Perspectives.* InTech; 2011. doi:10.5772/23590
112. Arenas R, Sánchez-Cardenas CD, Ramirez-Hobak L, et al. Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. Published online 2018. doi:10.3390/jof4020062
113. de Souza EW, Borba CM, Pereira SA, et al. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Sci Rep.* 2018;8(1):9074. doi:10.1038/s41598-018-27447-5



120. Baptista VS, Mothé GB, Santos GMP, et al. Promising application of the SsCBF ELISA test to monitor the therapeutic response of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* from Brazilian epidemics. *Braz J Microbiol.* 2021;52(1):145-153. doi:10.1007/s42770-020-00362-6
121. Parreiras de Jesus AC, Grossi de Oliveira AL, Sernizon Guimarães N, et al. Serological tests using *Sporothrix* species antigens for the accurate diagnosis of sporotrichosis: a meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;98(3). doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115131
122. Hayashi S, Kaminaga T, Baba A, et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin-embedded skin tissue. *Mycoses.* 2019;62(12):1148-1153. doi:10.1111/myc.13004
123. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(12):e0004190. doi:10.1371/journal.pntd.0004190
124. Rodrigues AM, Najafzadeh MJ, de Hoog GS, de Camargo ZP. Rapid Identification of Emerging Human-Pathogenic *Sporothrix* Species with Rolling Circle Amplification. *Front Microbiol.* 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.01385
125. de Oliveira MME, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Rapid Identification of *Sporothrix* Species by T3B Fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2159-2162. doi:10.1128/JCM.00450-12
126. Peng Y, Zhang Q, Xu C, Shi W. MALDI-TOF MS for the rapid identification and drug susceptibility testing of filamentous fungi. *Exp Ther Med.* 2019;18(6):4865-4873. doi:10.3892/etm.2019.8118

127. M F Matos A, M Moreira L, F Barczewski B, et al. Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix brasiliensis* Isolated from a Subconjunctival Infiltrative Lesion in an Immunocompetent Patient. *Microorganisms*. 2019;8(1). doi:10.3390/microorganisms8010022
128. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;52:37-42. doi:10.1016/j.ijid.2016.09.014
129. NASCIMENTO, J. M. Estudo de intervenção em educação em saúde: uma estratégia para a redução do abandono de tratamento na esporotricose felina. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.
130. Sivén M, Savolainen S, Rântilä S, et al. Difficulties in administration of oral medication formulations to pet cats: an e-survey of cat owners. *Veterinary Record*. 2017;180(10):250-250. doi:10.1136/vr.103991
131. Macedo PM, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Orofino-Costa R. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2015;29(4):719-724. doi:10.1111/jdv.12667
132. Bologna JL, Schaffer JV, Lorenzo C. *Dermatologia*. 4ª edição. Amsterdã: Elsevier; 2018. 2880 p.
133. Restrepo A, Robledo J, Gómez I, Tabares AM, Gutiérrez R. Itraconazole therapy in lymphangitic and cutaneous sporotrichosis. *Arch Dermatol*. 1986;122(4):413-417.

134. Rezende HD, Madia ACT, de Deus Mateus A, et al. Itraconazole versus potassium iodide for cutaneous sporotrichosis: weighing up the pros and cons. *Rev Assoc Med Bras.* 2021;67(11):1529-1530. doi:10.1590/1806-9282.20210694
135. Nakasu CCT, Waller SB, Ripoll MK, et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Braz J Microbiol.* 2021;52(1):163-171. doi:10.1007/s42770-020-00290-5
136. Sanchotene KO, Brandolt TM, Klafke GB, Poester VR, Xavier MO. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. *Med Mycol.* 2017;55(8):869-876. doi:10.1093/mmy/myw143
137. Khaitan B, Gupta V, Asati D, Seshadri D, Ramam M. Successful treatment outcome with itraconazole and potassium iodide in disseminated sporotrichosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2018;84(1):101-104. doi:10.4103/ijdv.IJDVL\_958\_16
138. da Rocha RFDB, Schubach TMP, Pereira SA, dos Reis ÉG, Carvalho BW, Gremião IDF. Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. *Journal of Small Animal Practice.* 2018;59(11):720-721. doi:10.1111/jsap.12852
139. Fernández-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Guarro J. Modest efficacy of voriconazole against murine infections by *Sporothrix schenckii* and lack of efficacy against *Sporothrix brasiliensis*. *Mycoses.* 2014;57(2):121-124. doi:10.1111/myc.12112
140. Fernández-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of Posaconazole in Murine Experimental Sporotrichosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2273-2277. doi:10.1128/AAC.05376-11

141. Viana PG, Figueiredo ABF, Gremião IDF, et al. Successful Treatment of Canine Sporotrichosis with Terbinafine: Case Reports and Literature Review. *Mycopathologia*. 2018;183(2):471-478. doi:10.1007/s11046-017-0225-6
142. Vettorato R, Heidrich D, Fraga F, et al. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed in vitro and in vivo: Case report. *Med Mycol Case Rep*. 2018;19:18-20. doi:10.1016/j.mmcr.2017.10.001
143. Francesconi G, Francesconi do Valle AC, Passos SL, et al. Comparative Study of 250 mg/day Terbinafine and 100 mg/day Itraconazole for the Treatment of Cutaneous Sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2011;171(5):349-354. doi:10.1007/s11046-010-9380-8
144. Guo K, Wang S, Wang Z, Zhang L. Effective treatment using itraconazole combined with terbinafine in the treatment of nasal sporotrichosis: A case report. *Medicine (United States)*. 2019;98(37). doi:10.1097/MD.00000000000017155
145. Zhang X, Huang H, Feng P, et al. In vitro activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. *European Journal of Dermatology*. 2011;21(4):573-576. doi:10.1684/ejd.2011.1400
146. Ishida K, de Castro RA, Borba dos Santos LP, Quintella LP, Lopes-Bezerra LM, Rozental S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol*. 2015;53(1):34-41. doi:10.1093/mmy/myu050

147. Gremião I, Schubach T, Pereira S, Rodrigues A, Honse C, Barros M. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J.* 2011;89(9):346-351. doi:10.1111/j.1751-0813.2011.00804.x
148. de Souza CP, Lucas R, Ramadinha RH, Pires TB. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg.* 2016;18(2):137-143. doi:10.1177/1098612X15575777
149. Fichman V, Valle ACF do, de Macedo PM, et al. Cryosurgery for the treatment of cutaneous sporotrichosis in four pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006434. doi:10.1371/journal.pntd.0006434
150. Honse CO, Rodrigues AM, Gremião IDF, Pereira SA, Schubach TMP. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. *Veterinary Record.* 2010;166(7):208-209. doi:10.1136/vr.b4768
151. Takahashi S, Masahashi T, Maie O. [Local thermotherapy in sporotrichosis]. *Hautarzt.* 1981;32(10):525-528.
152. Trindade A, Benias P, Cerulli M. Salvage nitrous oxide cryotherapy of refractory colon neoplasia embedded within an endoclip. *Endosc Int Open.* 2018;06(12):E1410-E1412. doi:10.1055/a-0777-2240
153. Secchin P, Seabra GRP, Ishida CE, Azulay DR, Fernandes NC. Criocirurgia como tratamento adjuvante na esporotricose: relato de três casos TT - Cryosurgery as an adjuvant treatment in sporotrichosis: a three-case report. *Surg cosmet dermatol (Impr).* 2017;9(3):255-258. doi:http://www.dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201793966

154. de Jesús Valdez-Velasco J, de Lourdes Pérez-Olivos M, Valdez-Bernal JF, Mayorga-Rodríguez J. Lymphangitic cutaneous sporotrichosis in treatment with cryosurgery and potassium iodide. *Med Cutan Ibero Lat Am.* 2019;47(3):219-222. doi:10.35366/91763
155. Quintelas C, Ferreira EC, Lopes JA, Sousa C. An Overview of the Evolution of Infrared Spectroscopy Applied to Bacterial Typing. *Biotechnol J.* 2018;13(1):1700449. doi:10.1002/biot.201700449
156. Xu YJ, Wang C, Ho WE, Ong CN. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2014;56:37-48. doi:10.1016/j.trac.2013.12.009
157. Han Y, Han L, Yao Y, Li Y, Liu X. Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: the sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration. *Analytical Methods.* 2018;10(21):2436-2443. doi:10.1039/C8AY00386F
158. COBLENTZ, W. W. "investigations of infra-red spectra: pt. I. infra-red absorption spectra. Carnegie Institution of Washington. 1908.
159. Naumann, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd. Chichester, United Kingdom 2000; 102-31.
160. Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, et al. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials.* 2019;12(18):2884. doi:10.3390/ma12182884

161. Morgano MA, Faria CG, Ferrão MF, Bragagnolo N, Ferreira MMC. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2005;25(1):25-31. doi:10.1590/S0101-20612005000100005
162. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, et al. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol*. 2014;168-169:32-41. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.011
163. Salman A, Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, et al. Detection of antibiotic resistant Escherichia Coli bacteria using infrared microscopy and advanced multivariate analysis. *Analyst*. 2017;142(12):2136-2144. doi:10.1039/C7AN00192D
164. Pebotuwa S, Kochan K, Peleg A, Wood BR, Heraud P. Influence of the Sample Preparation Method in Discriminating Candida spp. Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Molecules*. 2020;25(7):1551. doi:10.3390/molecules25071551
165. Batistuti MR. *Classificação de Fungos Através Da Espectroscopia No Infravermelho Por Transformada de Fourier*. Universidade de São Paulo; 2012. doi:10.11606/D.59.2012.tde-31012013-094052
166. Pakbin B, Zolghadr L, Rafiei S, Brück WM, Brück TB. FTIR differentiation based on genomic DNA for species identification of Shigella isolates from stool samples. *Sci Rep*. 2022;12(1):2780. doi:10.1038/s41598-022-06746-y
167. Pascale MR, Bisognin F, Mazzotta M, et al. Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy With IR Biotyper® System for Legionella pneumophila Serogroups Identification. *Front Microbiol*. 2022;13:866426. doi:10.3389/fmicb.2022.866426

168. Gupta BS, Jelle BP, Gao T. In vitro cell composition identification of wood decay fungi by Fourier transform infrared spectroscopy. *R Soc Open Sci.* 2022;9(2):201935. doi:10.1098/rsos.201935
169. Sabatini L, Palma F, Giorgi L, Andreazzo L, Campana R. Isolation and molecular identification of a strain belonging to the new species *Zalaria obscura* from a deteriorated wooden artwork. *Braz J Microbiol.* 2020;51(3):1241-1246. doi:10.1007/s42770-020-00255-8
170. Steenbeke M, de Bruyne S, Boelens J, et al. Exploring the possibilities of infrared spectroscopy for urine sediment examination and detection of pathogenic bacteria in urinary tract infections. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(10):1759-1767. doi:10.1515/cclm-2020-0524
171. Bağcıoğlu M, Fricker M, Johler S, Ehling-Schulz M. Detection and Identification of *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus weihenstephanensis* via Machine Learning Based FTIR Spectroscopy. *Front Microbiol.* 2019;10:902. doi:10.3389/fmicb.2019.00902
172. Taradolsirithitikul P, Sirisomboon P, Dachoupan Sirisomboon C. Qualitative and quantitative analysis of ochratoxin A contamination in green coffee beans using Fourier transform near infrared spectroscopy. *J Sci Food Agric.* 2017;97(4):1260-1266. doi:10.1002/jsfa.7859
173. Cordovana M, Mauder N, Kostrzewa M, et al. Classification of *Salmonella enterica* of the (Para-)Typhoid Fever Group by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Microorganisms.* 2021;9(4). doi:10.3390/microorganisms9040853

174. Heidrich D, Koehler A, Ramírez-Castrillón M, et al. Rapid classification of chromoblastomycosis agents genera by infrared spectroscopy and chemometrics supervised by sequencing of rDNA regions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021;254:119647. doi:10.1016/j.saa.2021.119647
175. Lam LMT, Dufresne PJ, Longtin J, Sedman J, Ismail AA. Reagent-free identification of clinical yeasts by use of attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5). doi:10.1128/JCM.01739-18
176. Lam LMT, Ismail AA, Lévesque S, et al. Multicenter Evaluation of Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy-Based Method for Rapid Identification of Clinically Relevant Yeasts. *J Clin Microbiol.* 2022;60(1):e0139821. doi:10.1128/JCM.01398-21
177. Huleihel M, Shufan E, Tsrer L, et al. Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J Photochem Photobiol B.* 2018;180:155-165. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.02.007
178. WILLIAMS, P. C. Commercial NearInfrared Reflectance Analyzers. In: WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. H. (Ed) Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1987. p.1074-142.
179. Gomes Rios T, Larios G, Marangoni B, Oliveira SL, Cena C, Alberto do Nascimento Ramos C. FTIR spectroscopy with machine learning: A new approach to animal DNA polymorphism screening. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021;261:120036. doi:10.1016/j.saa.2021.120036

180. BIGGS, D. A., JOHNSON, G., SJAUNJA, L. O., 1987: Analysis of fat, protein, lactose, total solids by infra-red absorption. *Bulletin of International Dairy Federation*, Doc. 208, 21–29.
181. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(16):7111-7120. doi:10.1007/s00253-013-5087-3
182. Yao S, Li T, Li J, Liu H, Wang Y. Geographic identification of Boletus mushrooms by data fusion of FT-IR and UV spectroscopies combined with multivariate statistical analysis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;198:257-263. doi:10.1016/j.saa.2018.03.018
183. Gaydou V, Lecellier A, Toubas D, et al. Assessing the discrimination potential of linear and non-linear supervised chemometric methods on a filamentous fungi FTIR spectral database. *Analytical Methods*. 2015;7(2):766-778. doi:10.1039/C4AY01712A
184. Hirri A, Bassbasi M, Platikanov S, Tauler R, Oussama A. FTIR Spectroscopy and PLS-DA Classification and Prediction of Four Commercial Grade Virgin Olive Oils from Morocco. *Food Anal Methods*. 2016;9(4):974-981. doi:10.1007/s12161-015-0255-y
185. Colabella C, Corte L, Roscini L, et al. Merging FT-IR and NGS for simultaneous phenotypic and genotypic identification of pathogenic Candida species. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188104. doi:10.1371/journal.pone.0188104

186. Schmalreck AF, Tränkle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R. Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca* spp.) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. *Mycoses*. 1998;41:71-77. doi:10.1111/j.1439-0507.1998.tb00587.x
187. Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, et al. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ *Candida*. *J Microbiol Methods*. 2017;141:121-125. doi:10.1016/j.mimet.2017.08.013
188. Potocki L, Depciuch J, Kuna E, Worek M, Lewinska A, Wnuk M. FTIR and Raman Spectroscopy-Based Biochemical Profiling Reflects Genomic Diversity of Clinical *Candida* Isolates That May Be Useful for Diagnosis and Targeted Therapy of Candidiasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4). doi:10.3390/ijms20040988
189. de Bruyne S, Speeckaert R, Boelens J, Hayette MP, Speeckaert M, Delanghe J. Infrared spectroscopy as a novel tool to diagnose onychomycosis. *Br J Dermatol*. 2019;180(3):637-646. doi:10.1111/bjd.17199
190. Saif FA, Yaseen SA, Alameen AS, Mane SB, Undre PB. Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV-Vis spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021;246:119010. doi:10.1016/j.saa.2020.119010
191. Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Microbiology (N Y)*. 1991;137(1):69-79. doi:10.1099/00221287-137-1-69

192. van der Mei HC, Naumann D, Busscher HJ. Grouping of streptococcus mitis strains grown on different growth media by FT-IR. *Infrared Phys Technol.* 1996;37(4):561-564. doi:10.1016/S1350-4495(95)00080-1

## 7 ARTIGO

Artigo formatado para submissão na revista *Mycoses*.

**Article title: Fourier transform infrared spectroscopy of molecular absorption in the identification of *Sporothrix* spp species**

**Running title: Sporotrichosis: new identification methods**

Micaela Federizzi<sup>1</sup>; Alessandra Koehler<sup>1</sup>; Valeriano Antonio Corbellini<sup>2</sup>;

Maria Lúcia Scroferneker<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program of Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Sciences, Humanities and Education, Postgraduate Program in Health Promotion, Postgraduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:** Valeriano Antonio Corbellini. Department of Sciences, Humanities and Education, Postgraduate Program in Health Promotion, Postgraduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. valer@unisc.br

Maria Lúcia Scoferneker, e-mail: scofern@ufrgs.br

### **Funding sources**

The authors would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support and scholarships and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

### **Declaration of competing interest**

None.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Micaela Federizzi:** Methodology, Software, Writing - original draft.

**Alessandra Koehler:** Software, Visualization.

**Valeriano Antonio Corbellini:** Methodology, Project administration.

**Maria Lúcia Scoferneker:** Methodology, Writing - original draft.

## ABSTRACT

**Background:** Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the traumatic implantation of the dimorphic fungus *Sporothrix* spp in the skin, having its highest incidence in Latin America, becoming a serious public health problem. Its diagnosis is carried out through direct and cultural examination at the gender level, and molecular for species-level identification, being a high cost technique. Therefore, new tools are being searched for the identification of microorganisms, easy to access and low cost. An innovative technology for identification is Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) associated with chemometrics.

**Objectives:** Identify and differentiate species of *Sporothrix* spp. using FTIR and chemometric analyses.

**Methods:** A total of 54 genotyped *Sporothrix* isolates were studied. The isolates were cultivated on plates with Sabouraud agar, then prepared for a Attenuated Total Reflectance Analysis (FTIR-ATR) using a Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spectrometer (Perkin Elmer). Five spectrums were obtained in the range 4000 to 650  $\text{cm}^{-1}$  for each isolate. The chemometrics analyses were performed in Pirouette 4.5 software (Infometrix), including exploratory analysis using Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA).

**Results:** The spectrums were similar, with the main bands up to approximately 1700  $\text{cm}^{-1}$  and 1495  $\text{cm}^{-1}$  (amide I and amide II bands). This same region was responsible for the separation of the samples in PCA. The OPLS-DA model was able to correctly classify all samples with only one latent variable, showing 100% specificity, sensitivity and accuracy for *S. schenkii* and *S. brasiliensis* in relation to the other samples.

**Conclusions:** FTIR can be a fast and low-cost alternative for identification of fungus of the *Sporothrix* gender, especially when associated with OPLS-DA modeling.

**Key-words:** Infrared spectroscopy; chemometrics; *Sporothrix* spp

## 1 INTRODUCTION

Sporotrichosis is a mycosis caused by the traumatic implantation of the fungus *Sporothrix schenckii* in the skin <sup>1</sup>. Being the most common subcutaneous mycosis in Latin America, it has become a serious public health problem <sup>2</sup>. Considered a dimorph fungus, the *Sporothrix* complex is composed by different species, *Sporothrix brasiliensis* being the most virulent of the gender *Sporothrix*, and most common among humans and animals, isolated exclusively in the Brazilian territory <sup>3-5</sup>. The transmission of sporotrichosis occurs from scratches and bites from infected animals, and from small injuries during leisure activities such as gardening and horticulture <sup>6</sup>. This mycosis can affect several types of animals, but cats play an important epidemiological role in the transmission and spread of the disease, because of the high amount of infective fungal cells, characterizing them as the main source of infection <sup>7,8</sup>. Since it is a polymorphic disease, sporotrichosis presents different clinical manifestations, which are: the lymphocutaneous, fixed cutaneous, disseminated cutaneous and extracutaneous form <sup>9</sup>.

Clinical suspicion is the initial step for the early diagnosis of sporotrichosis, since, in hyperendemic situations, clinical and epidemiological diagnosis is acceptable to start treatment, that is why a confirmed diagnosis is fundamental for a correct treatment <sup>10,11</sup>. Its diagnosis occurs through classical techniques, such as microbiological cultivation <sup>12</sup>. However, there are other diagnostic methods, such as molecular techniques, such as those based on polymerase chain reaction (PCR), which are also a diagnostic option, but these methods have limitations, such as high cost, relatively long time to obtain the results, and high generation of waste products <sup>13,14</sup>. Therefore, there is a need to develop new diagnostic methods for fungal identification.

In this context, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is a method that has great potential. In the FTIR technique, infrared radiation interacts with chemical bonds,

generating a spectrum that contains the fingerprint of the sample <sup>15</sup>. FTIR has many applications in the medical and biological fields, due to its advantages of small sample size and minimal preparation, resulting in little or no waste, precision and speed of analysis, and direct computerized data storage <sup>16,17</sup>. FTIR has already been proposed as an alternative tool for fungal identification with promising results <sup>18-22</sup>. For fungus of the gender *Sporothrix*, FTIR has not yet been proposed, and considering that Sporotrichosis is a mycosis caused by a pathogenic fungus, it is fundamental to carry out studies that expand the knowledge and bring improvements in the diagnosis for this mycosis. To apply spectroscopic data in the development of diagnostic methods, it is important to use different multivariate analyses, such as chemometric classification algorithms, which include, for example, Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS).<sup>19,23</sup>

The objective of the present study was to develop a methodology for the identification of species of the gender *Sporothrix*, through the use of FTIR and supervised chemometric analyses, specifically orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA).

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Microorganisms**

A total of 54 isolates of different *Sporothrix* spp species have been evaluated from a repository at the Laboratory of Pathogenic Fungi of the Microbiology Department of the ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The lineages were identified to the gender level by means of both macro and microscopic analysis, and were composed of *Sporothrix schenckii* (n=23), *Sporothrix brasiliensis* (n=21), *Sporothrix mexicana* (n=2), *Sporothrix pallida* (n=2), *Sporothrix globosa* (n=4) e *Sporothrix chilensis* (n=2); "n" represents the number of strains included in the study.

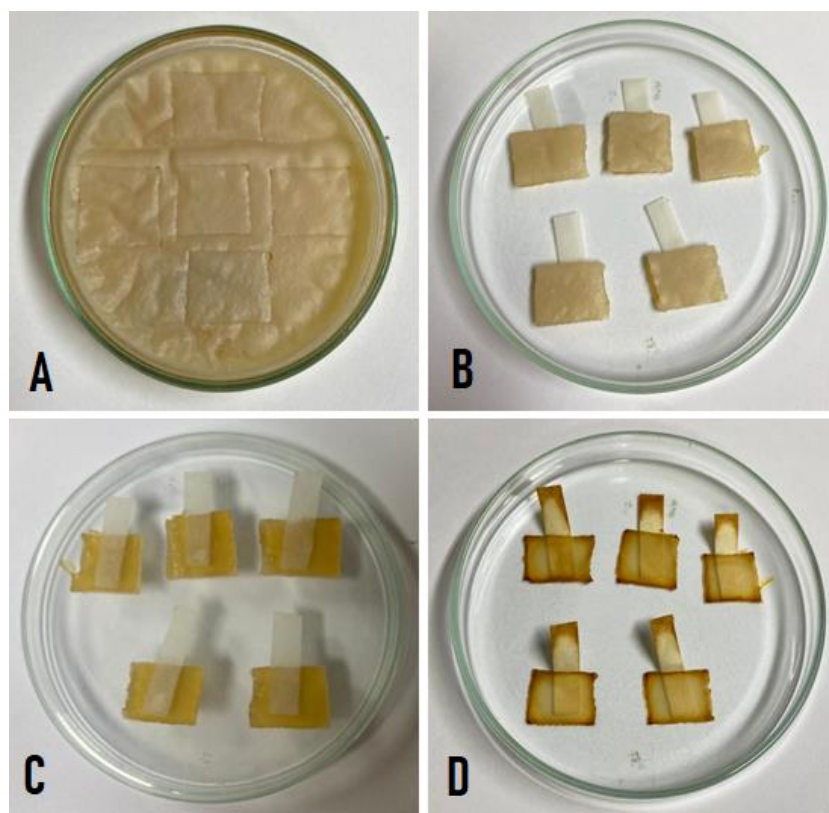
## 2.2 Strain preparation for FTIR identification

The strains were inoculated on Sabouraud dextrose agar (Acumedia, São Paulo, Brazil) at 32°C for 14 days, after growth they were inoculated on Potato dextrose agar (Himedia, Mumbai, India) at 32°C for 7 days. Then, conidia suspensions were made by scraping the entire surface of the fungal colonies with sterile plastic loops and sterile saline solution (0.85%) and filtered with filter paper for separation of hyphae and conidia. 1000 uL of the filtrate from each strain was spread over the total surface of a 100x20 mm diameter Petri dish containing 10 mL of Sabouraud dextrose agar (Acumedia, São Paulo, Brazil), which was incubated for 14 days at 32 °C.

For the identification of *Sporothrix* spp. species by FTIR, quintuplicates of approximately 1 cm × 1 cm agar culture fragments of each strain were deposited on a piece of Whatman® filter paper, number 1 (Sigma-Aldrich, USA), measuring approximately 0.8 × 0.8 cm, so that all sides of the fungus are in contact with the glass for fixation of the fungus during drying, and one side of the paper is uncovered to assist in the removal of the fungus after drying (Fig. 1). The slices deposited on the Petri dishes were dried in a drying oven at 60°C for one hour, or until complete drying was achieved (Fig. 1).

## 2.3 FTIR/ATR analysis

The quintuplicate spectral acquisition of each sample by Attenuated Total Reflection (ATR) FTIR spectroscopy was performed on the Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (PerkinElmer Inc.) linked to the standard Universal ATR Sampling Accessory (UATR, PerkinElmer Inc.; Registration Number L1250050) with a single reflection diamond crystal and zinc selenide (ZnSe) as focusing element. For each strain, five cuts of 2 mm long were made, totaling five spectrums of each strain, where they were pushed against the crystal and pressed with a 70 N



**Figure 1.** *Sporothrix* culture (A) on reverse (B) and reverse (C) agar slices adhered to filter paper and oven dried (D) in a Petri dish.

dynamometer by the arm of the UATR accessory. Each spectrum was obtained from 8 scans, and the acquisition range was  $4000$  to  $650\text{ cm}^{-1}$  using the spectral resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$ .

## 2.4 Chemometrics

The average spectrum of each *Sporothrix* sample was obtained after correcting and normalizing each replicate. Chemometric analyses were done in Pirouette 4.5 software (Infometrix), and the figures were done in OriginPro70 software.

Initially, an exploratory analysis using principal component analysis (PCA) was performed to evaluate the possible separation of the *Sporothrix schencki* from the other samples of *Sporothrix* (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis*), and also the separation of the *S. brasiliensis* samples of the other samples included in the study. The dataset

was preprocessed with vector normalization followed by second derivative (Savitzky-Golay, 11 points) and centering of the data on the mean. To describe the results, the principal components (PCs) that best separated the samples were chosen (via t-test of the scores,  $p < 0.05$ ), with their respective loadings.

Supervised analysis with orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was used to classify and differentiate *S. brasiliensis* and *S. schenckii* from all the other species included in the study; For each of the two species, an OPLS-DA model was developed. Initially, models were developed with the full set of samples, to test different types of normalization (amplitude, area, vector), different preprocessing techniques (raw data, mean centering, or autoscaling), and different variable transformation algorithms (1st or 2nd derivative), to determine the best models.

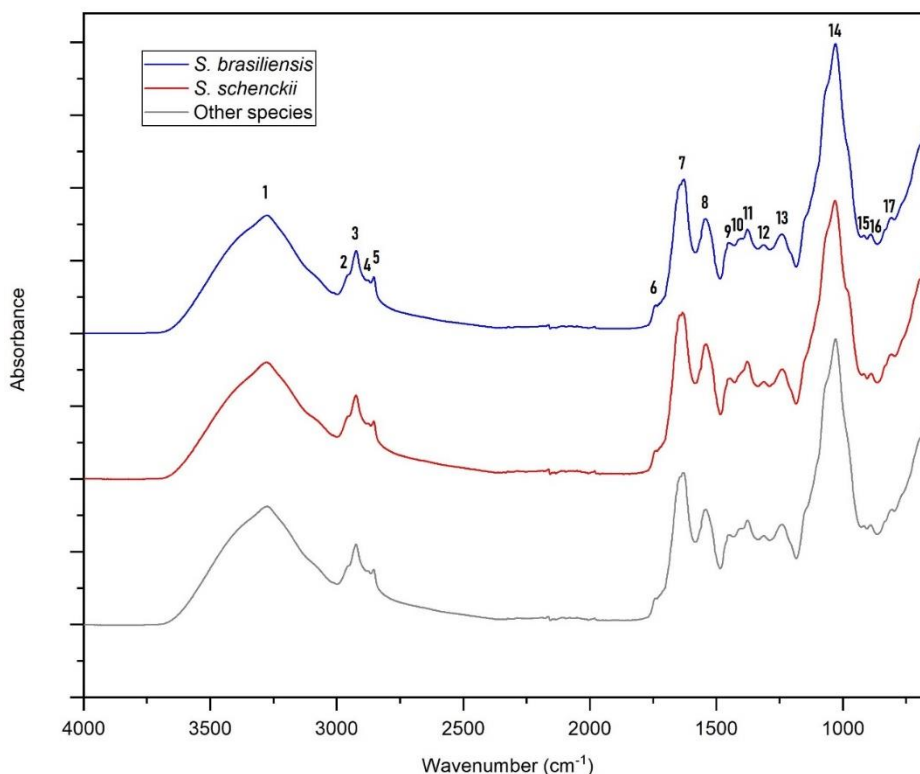
After defining the best conditions, the data set was systematically split in a 1:1 ratio into a calibration set (CS) and a prediction set (PS). The maximum number of latent variables (LV) allowed in the OPLS-DA model was defined according to the recommendation of ASTM E1655-05 guidelines using the equation  $N = 6(A+1)$ , where  $N$  is the number of CS samples and  $A$  is the maximum number of LVs allowed in the model. Considering  $N = 27$  samples, the maximum number of LVs is 3<sup>24</sup>. To develop the two identification models for *S. brasiliensis* and *S. schenckii* at the species level, the species that was in evidence corresponded to a class with a score of 1, while the other grouped species received a score of zero.

The CS was submitted to leave-one-out cross-validation with one to three latent variables. External validation was performed including each sample from PS in the OPLS-DA model obtained with CS (training set), and the respective class was predicted. The performance of the OPLS-DA models for species classification was evaluated by the root mean square error of cross-validation (RMSECV), root mean square error of prediction (RMSEP), coefficient of determination ( $R^2$ ),  $t_{\text{bias}}$ , class threshold, sensitivity, specificity, and accuracy.

### 3 RESULTS

#### 3.1 FTIR/ATR spectra of *Sporothrix* samples

The average spectrums of the *Sporothrix schenckii* group and *Sporothrix brasiliensis* group and the group of the other isolates analyzed are shown in [Figure 2](#). A similar pattern is observed among the species of the genus, with the main bands at approximately 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$  showing intense carbohydrate absorption, due to glycosidic bonds of  $\beta$ -glucanas ( $1023 \text{ cm}^{-1}$ ) from the cell wall of the fungus <sup>25</sup>. The vibrational modes of the bands marked in [Figure 2](#), are shown in [Table 1](#), comprising the main bands present in microbial FTIR/ATR spectra.



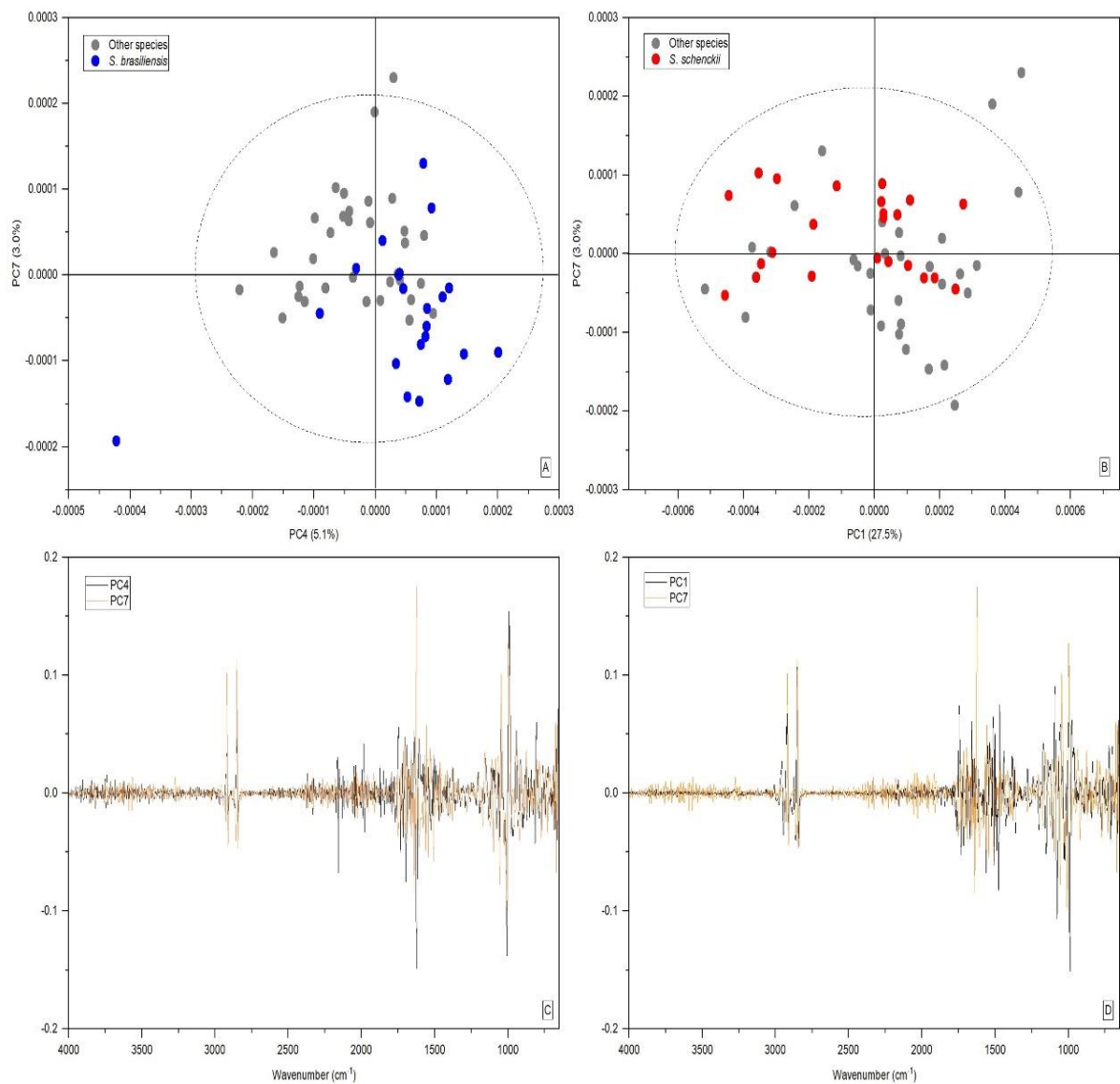
**Figure 2.** Average FTIR/ATR spectrums of *Sporothrix* from each group analyzed: *Sporothrix brasiliensis* (21), *Sporothrix Schenckii* (23), other species (10). The numbers present indicate the main bands found in the *Sporothrix* spectrums in the region of 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ .

**Table 1.** Main bands found in the spectra of *Sporothrix* samples with their respective spectral assignments.

Band number	Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Spectral Assignment
1	~3250	N-H: protein (amide A) stretching
2	~2959	C-H: asymmetric stretching of -CH <sub>3</sub>
3	~2934	C-H: asymmetric stretching of >CH <sub>2</sub>
4	~2921	C-H: asymmetric stretching of >CH <sub>2</sub> in fatty acids
5	~2852	C-H: asymmetric stretching of >CH <sub>2</sub> in fatty acids
6	~1741	>C=O ester stretching
7	~1675	amide I: antiparallel pleated sheet or β protein turns
8	~1548	amide II
9	~1468	C-H: deformation of >CH <sub>2</sub>
10	~1400	C=O: symmetric stretching of COO <sup>-</sup>
11	~1310	amide III of proteins
12	~1240	amide III of proteins
13	~1250	P=O: asymmetric stretching of >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> phosphodiester
14	~1050	C-O-C, C-O: carbohydrate ring vibrations C-O-P, P-O-P
15	~950	C-O-C, C-O: carbohydrate ring vibrations C-O-P, P-O-P
16	~985	C-O-C, C-O: carbohydrate ring vibrations C-O-P, P-O-P
17	~720	C-H <i>rocking</i> of >CH <sub>2</sub>

### 3.2 Exploratory analysis of *Sporothrix* samples

PCA of the mean-centered data, in the first five principal components, compacted 69.8% of the original spectral information, with PC1 = 27.5%; PC2 = 18.6%; PC3 = 14.3%; PC4 = 5.1%; and PC5 = 4.3%. The principal components (PCs) that best separated the *Sporothrix schenckii* samples from the others were PC4 (with 5.1% of the information) and PC7 (with 3.0% of the information) (Fig. 3A), while the PCs of the *Sporothrix brasiliensis* samples from the others that best showed a separation were PC1 (27.5% of the information) and PC7 (3.0% of the information) (Fig. 3B), according to the t-test of the PCA scores (p<0.05).

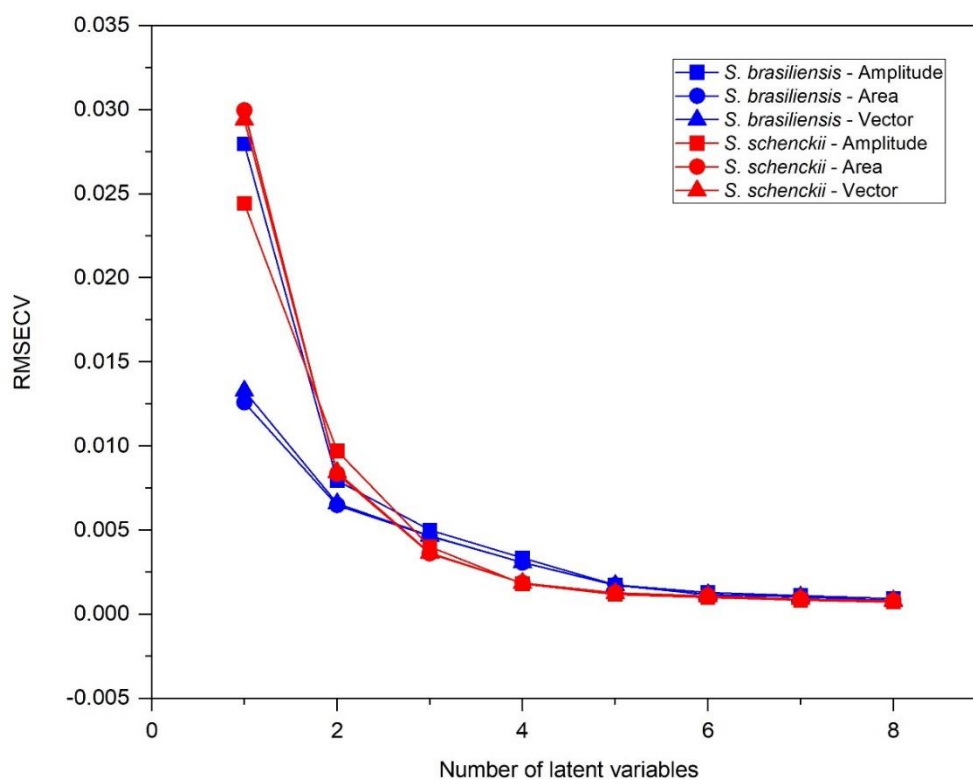


**Figure 3.** Two-dimensional PCA scores plot: (A) PC4 vs. PC7 from the FTIR spectral data set relating to 21 samples of *Sporothrix brasiliensis* (*S. brasiliensis*) and 33 samples of the remaining species (Other Species) and (B) PC1 vs. PC7 from the FTIR spectral data set relating to 23 samples of *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) and 31 samples of the remaining species (Other Species). Ellipses represent the 95% confidence level; (C) Full spectrums of the PC4 and PC7 loading; (D) Full spectrums of the PC1 and PC7 loading.

From both spectrums, the main region that contributed to the separation of the groups was between 1700 and 1490  $\text{cm}^{-1}$ , where the amide I, amide II and tyrosine bands are found. Also in Figure 3, it is possible to verify the main bands responsible for the separation of the samples of *Sporothrix brasiliensis* from the others, present in the region 1675  $\text{cm}^{-1}$  (positive) and 1680  $\text{cm}^{-1}$  (negative) in PC7; and 1665  $\text{cm}^{-1}$  (negative) and 1695  $\text{cm}^{-1}$  (positive) in PC4 (Fig. 3C), while the main bands for the *Sporothrix schenckii* samples were 1675  $\text{cm}^{-1}$  (positive) and 1680  $\text{cm}^{-1}$  (negative) in PC7; and 1495  $\text{cm}^{-1}$  (positive) and 1505  $\text{cm}^{-1}$  (negative) in PC1 (Fig 3D). It is possible to speculate that the separation of the samples from the different groups was mainly due to the Amide I and Amide II bands.

### 3.3 ATR/OPLS-DA model for *Sporothrix* diagnostics

The best ATR/OPLS-DA models for classification of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* were obtained using amplitude normalization (0–1, min-max normalization), first derivative of the spectra (Savitzky-Golay, 5 points), without any pre-processing, and with the use of one orthogonal signal correction (OSC) component. The performance of the three types of normalization tested was excellent and very similar, according to the analysis of the RMSECV values (Fig 4). The ATR/OPLS-DA models showed figures of merit ( $R^2$  and RMSECV/RMSEP) compatible with high performance even with one latent variable (Table 2).



**Figure 4.** Performance of RMSECV of the OPLS-DA models, from one to eight latent variables, for classification of *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, considering three types of spectrum normalization: amplitude, area and vector. All test models were developed using the total set of samples (N=54), first derivative (Savitzky-Golay, 5 points), and one orthogonal signal correction (OSC) component. The performance of the models was evaluated by analyzing the root mean square error of cross-validation (RMSECV) values.

**Table 2.** Figures of merit of ATR/OPLS-DA models for classification of *Sporothrix brasiliensis* and *S. schenckii*, with one latent variable, after min–max normalization, first derivative by Savitzky-Golay (5 points) and one component of orthogonal signal correction (OSC).

Set/Figures of merit	<i>S. brasiliensis</i>		<i>S. schenckii</i>	
	CS n = 27 samples	PS n = 27 samples	CS n = 27 samples	PS n = 27 samples
<b>RMSECV/RMSEP</b>	0.0115	0.0277	0.0278	0.0251
<b>R<sup>2</sup></b>	0.8499	0.9968	0.8521	0.9984
<b>Class limiar</b>	0.4059	0.6759	0.3463	0.4200
<b>t<sub>bias</sub></b>	0.6340	0.4878	1.2336	3.1470
<b>Sensitivity (%)</b>	100	100	100	100
<b>Specificity (%)</b>	100	100	100	100
<b>Accuracy (%)</b>	100	100	100	100

Abbreviations: RMSECV = root mean square error of cross-validation; RMSEP = root mean square error of prediction; R<sup>2</sup> = determination coefficient; CS = calibration set; PS = prediction set.

#### 4 DISCUSSION

For the identification of pathogenic fungus, such as the gender *Sporothrix*, at the species level, molecular techniques are used; however, due to their difficult application and high cost, the demand for new methods has grown, making the Fourier Transform Infrared Spectroscopy a methodology capable of generating data with high sensitivity and speed, in addition to low cost and minimal waste generation<sup>14,26</sup>.

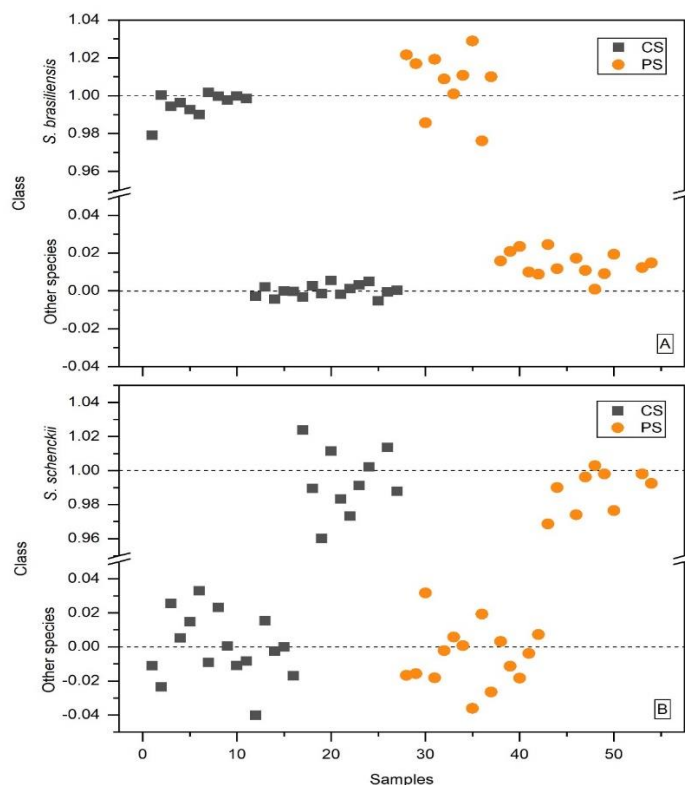
However, in studies found in the literature, 50% of the pathogenic fungus identified by FTIR are on *Candida* species, with no reports of *Sporothrix*, which highlights the need for further studies on this gender<sup>18,27–30</sup>.

It is important to highlight that the preparation of suspensions of these pathogenic fungus should be done in a vertical laminar flow cabin, so that there is no contamination of samples and no risk to the laboratorian. In the present study, the use of dried agar slices

containing the sample, fixed on glass, is the least risky protocol, ensuring that the ATR technique is used with greater safety, without the release of spores into the environment.

The absorption spectra of fungus have compounds such as: polysaccharides, P=O bonds of phosphodiesteres, amides, tallow, CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> bonds of lipids, and H<sub>2</sub>O<sup>31</sup>. Based on the bands found in the FTIR spectrums of this study, the broad peak around ~3250 cm<sup>-1</sup> represents the presence of hydrogen bonded OH or NH bonded stretching vibrations<sup>32</sup>. Shown in the region ~2921-2982 cm<sup>-1</sup> are absorbance characteristic of alkyl chain fatty acids, while in the regions ~1700 to 1490 cm<sup>-1</sup> there are two absorption bands, amide I and amide II, respectively, that are in evidence due to vibrational coupling between the stretching frequencies of the C=O<sup>25</sup> deformation. The bands between 950 and 1200 cm<sup>-1</sup> refer to the polysaccharide bands, while the ~1250 cm<sup>-1</sup> band is linked to phospholipids<sup>33</sup>.

More optimal models were obtained when ATR/OPLS-DA modeling was applied, where amplitude normalization was chosen, as it showed low and similar RMSECV for both *S. brasiliensis* and *S. schenckii*. One latent variable was sufficient to correctly classify all *S. brasiliensis* and *S. schenckii* samples, with achieving 100% specificity, sensitivity, and accuracy (Table 2; Fig 5).



**Figure 5.** Predict class (in calibration set – CS, and in prediction set - PS) for the ATR-FTIR/OPLS-DA models of classification of *S. brasiliensis* and *S. schenckii* (class = 1, em cada um de seus respectivos modelos) and the other species of *Sporothrix* (class = 0). Models elaborated with average spectra after min max normalization, non-processing, one component of orthogonal signal correction, and one latent variable.

The use of ATR-FTIR spectroscopy was essential to detect the bond vibration signal of these groups, along with principal component analysis (PCA), showing an initial separation of the groups, mainly in the regions 1700 to 1490  $\text{cm}^{-1}$ . The association of OPLS-DA modeling with ATR-FTIR showed to be a promising tool in the identification of pathogenic fungi, emphasizing the need for complementary mathematical implementation for multivariate regression algorithms such as PLS-DA.

This study is the first to propose the use of FTIR as a method for identifying species of the genus *Sporothrix*, making it a fast and low-cost alternative compared to traditional methods.

## REFERENCES

1. Rippon J. *Sporotrichosis*. In: Rippon J, Editor. *Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3rd Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company;; 1988.
2. Barros MB de L, Schubach TMP, Gutierrez Galhardo MC, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):777-779. doi:10.1590/S0074-02762001000600006
3. Sizar O, Talati R. *Sporotrichosis*; 2022.
4. Boechat JS, Oliveira MME, Almeida-Paes R, et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(3):185-196. doi:10.1590/0074-02760170407
5. Macêdo-Sales PA, Souto SRLS, Destefani CA, et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: A comparison between infected and non-infected populations. *BMC Vet Res*. 2018;14(1). doi:10.1186/s12917-018-1340-4
6. Bonifaz A, Araiza J, Treviño-Rangel RJ, González GM. Cutaneous disseminated sporotrichosis: Clinical experience of 24 cases. *Med Mycol*. 2018;56:S20. doi:10.1093/mmy/myy036
7. Silva FS, Cunha SCS, Moraes VA, Leite JS, Ferreira AMR. Refractory feline sporotrichosis: a comparative analysis on the clinical, histopathological, and cytopathological aspects. *Pesqui vet bras*. 2022;42:e06923-e06923. doi:10.1590/1678-5150-pvb-6923

8. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog.* 2017;13(1). doi:10.1371/journal.ppat.1006077
9. Téllez-Martínez D, Batista-Duharte A, Portuondo DL, Carlos IZ. Prophylactic and therapeutic vaccines against sporotrichosis. Feasibility and prospects. *Microbes Infect.* 2019;21(10):432-440. doi:10.1016/j.micinf.2019.05.003
10. Mahajan VK. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. *Dermatol Res Pract.* 2014;2014:1-13. doi:10.1155/2014/272376
11. Schechtman RC, Falcão EMM, Carard M, García MSC, Mercado DS, Hay RJ. Sporotrichosis: hyperendemic by zoonotic transmission, with atypical presentations, hypersensitivity reactions and greater severity. *An Bras Dermatol.* 2022;97(1):1-13. doi:10.1016/j.abd.2021.07.003
12. Shimizu T, Akita S, Harada Y, et al. Sporotrichal tenosynovitis diagnosed helpfully by musculoskeletal ultrasonography. *Internal Medicine.* 2017;56(10):1243-1246. doi:10.2169/internalmedicine.56.7912
13. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun.* 2018;9(1):5135. doi:10.1038/s41467-018-07556-5
14. Hayashi S, Kaminaga T, Baba A, et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin-embedded skin tissue. *Mycoses.* 2019;62(12):1148-1153. doi:10.1111/myc.13004

15. Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, et al. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials (Basel)*. 2019;12(18). doi:10.3390/ma12182884
16. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res*. 2012;2(1):1-21.
17. Salman A, Sharaha U, Rodriguez-Diaz E, et al. Detection of antibiotic resistant Escherichia Coli bacteria using infrared microscopy and advanced multivariate analysis. *Analyst*. 2017;142(12):2136-2144. doi:10.1039/C7AN00192D
18. Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, et al. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ *Candida*. *J Microbiol Methods*. 2017;141:121-125. doi:10.1016/j.mimet.2017.08.013
19. Heidrich D, Koehler A, Ramírez-Castrillón M, et al. Rapid classification of chromoblastomycosis agents genera by infrared spectroscopy and chemometrics supervised by sequencing of rDNA regions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021;254:119647. doi:10.1016/j.saa.2021.119647
20. Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, et al. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol*. 2015;45:126-134. doi:10.1016/j.fm.2014.01.002

21. Fischer G, Braun S, Thissen R, Dott W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J Microbiol Methods*. 2006;64(1):63-77. doi:10.1016/j.mimet.2005.04.005
22. Ferreira I, Ferreira-Strixino J, Castilho ML, Campos CBL, Tellez C, Raniero L. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2016;152:397-403. doi:10.1016/j.saa.2015.07.061
23. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(16):7111-7120. doi:10.1007/s00253-013-5087-3
24. ASTM – American Society for Testing and Materials. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, ASTM International E1655-17. West Conshohocken, Pennsylvania; . Published online 2017.
25. Gupta BS, Jelle BP, Gao T. Application of ATR-FTIR Spectroscopy to Compare the Cell Materials of Wood Decay Fungi with Wood Mould Fungi. *Int J Spectrosc*. 2015;2015:1-7. doi:10.1155/2015/521938
26. Han Y, Han L, Yao Y, Li Y, Liu X. Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: the sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration. *Analytical Methods*. 2018;10(21):2436-2443. doi:10.1039/C8AY00386F
27. Colabella C, Corte L, Roscini L, et al. Merging FT-IR and NGS for simultaneous phenotypic and genotypic identification of pathogenic *Candida* species. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188104. doi:10.1371/journal.pone.0188104

28. Potocki L, Depciuch J, Kuna E, Worek M, Lewinska A, Wnuk M. FTIR and Raman Spectroscopy-Based Biochemical Profiling Reflects Genomic Diversity of Clinical Candida Isolates That May Be Useful for Diagnosis and Targeted Therapy of Candidiasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4). doi:10.3390/ijms20040988
29. de Bruyne S, Speeckaert R, Boelens J, Hayette MP, Speeckaert M, Delanghe J. Infrared spectroscopy as a novel tool to diagnose onychomycosis. *Br J Dermatol*. 2019;180(3):637-646. doi:10.1111/bjd.17199
30. Lam LMT, Dufresne PJ, Longtin J, Sedman J, Ismail AA. Reagent-free identification of clinical yeasts by use of attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol*. 2019;57(5). doi:10.1128/JCM.01739-18
31. Surewicz WK, Mantsch HH, Chapman D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry*. 1993;32(2):389-394. doi:10.1021/bi00053a001
32. Ferreira I, Ferreira-Strixino J, Castilho ML, Campos CBL, Tellez C, Raniero L. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2016;152:397-403. doi:10.1016/j.saa.2015.07.061
33. Wang HP, Wang HC, Huang YJ. Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid. *Science of The Total Environment*. 1997;204(3):283-287. doi:10.1016/S0048-9697(97)00180-0

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi o primeiro estudo a propor a utilização de FTIR-ATR associada à quimiometria para determinação da identificação de espécies patogênicas de fungos do gênero *Sporothrix*. Esta plataforma analítica já tem se mostrado promissora, devido à sua alta sensibilidade e especificidade para identificar as espécies, sendo uma alternativa rápida e de baixo custo para implementação em rotinas microbiológicas em substituição a métodos convencionais, gerando mais oportunidade para destacar a compreensão das espécies de fungos patogênicos.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

São elencadas as seguintes perspectivas futuras para ampliar os resultados obtidos neste trabalho, utilizando FTIR-ATR:

- Propor o modelo FTIR-ATR/PLS para identificação de fungos filamentosos, como o do gênero *Sporothrix*.
- Propor o modelo FTIR-ATR/PLS para identificação de outras espécies de *Sporothrix*, para para maior agilidade no tratamento da esporotricose;

## 10 ANEXOS

### 10.1 Comprovante de submissão à Revista Mycoses

Mycoses Original Article	
Using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the identification of <i>Sporothrix</i> species	
<b>Submission Status</b>	Submitted
<b>Submitted On</b>	24 November 2022 by Valeriano Corbellini
<b>Submission Started</b>	24 November 2022 by Valeriano Corbellini
This submission has been sent to the editorial office and cannot be edited. Further instructions will be emailed to you from Manuscript Central.	
<a href="#">View Submission Overview</a>	

## 10.2 STROBE Statement - checklist

	ItemNo.	Recommendation	PageNo.
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	01
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	07
<b>Introduction</b>			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	47
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	48
<b>Methods</b>			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	45
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	81
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	-
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	-
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	-
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	19
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	19

Continued on next page

Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	83
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	84
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	-
		(c) Explain how missing data were addressed	-
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	-
		(e) Describe any sensitivity analyses	-
<b>Results</b>			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	-
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	-
		(c) Consider use of a flow diagram	-
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	-
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	-
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	-
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time	-
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	-
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures	-
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	-
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	-
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	-

Continued on next page

Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	85
<b>Discussion</b>			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	90
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	88
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	92
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	-
<b>Other information</b>			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	78

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).