

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

RAUL LEAL FARIA LUIZ

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE FELINA E CANINA
EM PELES EMBLOCADAS EM PARAFINA**

Orientador: Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira
Coorientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro
2021

RAUL LEAL FARIA LUIZ

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE FELINA E CANINA
EM PELES EMBLOCADAS EM PARAFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientador: Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira
Coorientador: Dr. Rodrigo Caldas Menezes

Rio de Janeiro
2021

Luiz, Raul Leal Faria.

Avaliação da sensibilidade da técnica de PCR para diagnóstico da esporotricose felina e canina em peles embocadas em parafina / Raul Leal Faria Luiz. - Rio de Janeiro, 2021.
vii, 66f f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2021.

Orientador: Manoel Marques Evangelista de Oliveira.
Co-orientador: Rodrigo Caldas Menezes.

Bibliografia: f. 58-66

1. Esporotricose. 2. *Sporothrix* . 3. PCR. 4. Diagnóstico. 5. FFEP. I. Título.

RAUL LEAL FARIA LUIZ

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE FELINA E CANINA
EM PELES EMBLOCADAS EM PARAFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado (Revisora e Presidente)

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Doutor em Biologia de Fungos
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Isabella Dib Ferreira Gremião

Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a. Gisela Lara da Costa (Suplente)

Doutora em Ciências Veterinárias
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o suporte necessário para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Regina e João Carlos, ao meu irmão, Arthur, e à minha avó, Edir, por todo o carinho, amizade, incentivo e amor incondicional e ao meu namorado Erick, e à sua família, pelo amor, convivência, cuidado, preocupação e apoio emocional.

Ao meu orientador Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira, e ao meu coorientador, Dr. Rodrigo Caldas Menezes, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, paciência, pela boa vontade e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

A todos os membros do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Dr^a Gisela, Dr^a Danielly, Thaís, Roberta, Débora, Cindy e Letícia, pela boa convivência, amizade e pelos debates micológicos.

A todos os amigos da Plataforma de Laboratório Multiusuário, Hildebrando, Alessandra, Thaís, Sabrina, Diego, Natália, Fabrícia, Yasmine e Simone, pela amizade, parceria, incentivo e colaboração diária, e também aos amigos da Agência Transfusional, Fernando e Flávia, e especialmente ao Dr. Alexandre Vizzoni, por ter acreditado no meu potencial e me dado a primeira oportunidade profissional.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos e disponibilidade, em especial à Dra Raquel Carvalhaes, por toda orientação e auxílio nas análises estatísticas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa e pela bolsa de estudo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica.

Luiz, R. L. F. **Avaliação da sensibilidade da técnica de PCR para diagnóstico da esporotricose felina e canina em peles emblocadas em parafina.** Rio de Janeiro, 2021. 66f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A esporotricose é uma micose granulomatosa crônica, cosmopolita, que acomete humanos e animais. A infecção é causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii*. No Brasil, o Rio de Janeiro é considerado área hiperendêmica de esporotricose causada por *S. brasiliensis* associada à transmissão zoonótica felina. O método padrão de referência para o diagnóstico de esporotricose é a caracterização microscópica do patógeno isolado em cultura, porém essa metodologia é demorada. Caso a cultura micológica não seja possível, as amostras clínicas podem ser previamente fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina (FFEP). Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção das sequências de DNA fúngico, também podem ser utilizados para o diagnóstico por serem rápidos, sensíveis e espécie-específicos e, além disso, podem ser aplicados em amostras frescas e FFEP. Não existe até o momento um protocolo estabelecido para a extração de DNA do fungo *Sporothrix* spp. em amostras FFEP de esporotricose felina e canina, assim como não existe ainda uma metodologia padronizada e reprodutível para realização da PCR para o diagnóstico definitivo da esporotricose felina e canina a partir de tecidos FFEP. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a sensibilidade de duas técnicas de PCR para o diagnóstico de esporotricose felina e canina, em nível de gênero, em tecidos FFEP. Foram utilizadas seis espécies diferentes de *Sporothrix* (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*) de *pellets* obtidos por centrifugação de cultura micológica e FFEP para padronização da metodologia de extração e identificação molecular. Foram também utilizadas 14 amostras de peles de gatos e 20 amostras de peles de cães atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, no período de 2009 a 2019, cujo diagnóstico de esporotricose foi confirmado por cultura micológica para validação das metodologias. Neste estudo, as amostras FFEP foram submetidas a dois protocolos de cortes histológicos: (1) 8 cortes de 5 µm de espessura; e (2) um corte de 16 µm de espessura, e à extração de DNA de *Sporothrix* spp. utilizando dois kits comerciais para tecidos FFEP (extração química e térmica), sendo os mesmos validados no presente estudo. O DNA extraído foi utilizado para identificação molecular pela técnica da *nested* PCR, em nível de gênero de *Sporothrix* spp., para o diagnóstico da esporotricose felina e canina em tecidos FFEP baseada na amplificação para a região 18S do RNA ribossomal (*ITS*). O protocolo de extração química utilizando o protocolo de 8 cortes histológicos de 5 µm de espessura apresentou melhor desempenho. O ensaio da *nested* PCR, utilizando *primers* específicos para o gênero *Sporothrix*, apresentou alta sensibilidade e especificidade para identificar esse fungo em amostras FFEP de *pellets* de cultura micológicas. As metodologias de extração de DNA e da *nested* PCR utilizadas apresentam grande potencial para serem aplicadas no diagnóstico da esporotricose felina e canina em amostras FFEP na rotina clínica.

Palavras-chave: Esporotricose. *Sporothrix* spp.. PCR. Diagnóstico. FFEP.

Luiz, R. L. F. **Sensitivity evaluation of the PCR technique for diagnosing feline and canine sporotrichosis in paraffin-embedded tissues.** Rio de Janeiro, 2021. 66p. Thesis [Master Thesis in Clinical Research on Infectious Diseases] – Nacional Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a cosmopolitan, chronic granulomatous mycosis that affects humans and animals. The infection is caused by dimorphic fungi of the *Sporothrix schenckii* complex. In Brazil, Rio de Janeiro is considered a hyperendemic area of sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* associated with feline zoonotic transmission. The standard reference method for the diagnosis of sporotrichosis is the microscopic characterization of the pathogen isolated in culture, but this methodology is time-consuming. If mycological culture is not possible, clinical samples can be previously fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin (FFPE). Molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR) for detection of fungal DNA sequences, can also be used for diagnosis because they are fast, sensitive and species-specific and, in addition, can be applied to fresh samples and FFPE samples. There is no established protocol for extracting DNA from the fungus *Sporothrix* spp. in feline and canine sporotrichosis FFPE samples, as well as there is still no standardized and reproducible methodology for performing PCR for the definitive diagnosis of feline and canine sporotrichosis from FFPE tissues. The present work aims to evaluate the sensitivity of two PCR techniques for the diagnosis of feline and canine sporotrichosis, at the level of genus, in FFPE tissues. Six different species of *Sporothrix* (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*) from pellets obtained by mycological culture centrifugation and FFPE were used to standardize the extraction and molecular identification methodology. Fourteen cat skin samples and 20 dog skin samples treated at the Laboratory of Clinical Research in Dermatозoonosis in Domestic Animals (LAPCLIN-DERMZOO), Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, from 2009 to 2019, were also used for validation of methodologies, whose diagnosis of sporotrichosis was confirmed by mycological culture. In this study, the FFPE samples were submitted to two protocols of histological sections: (1) 8 sections of 5 μm thick; and (2) one sections of 16 μm thick. DNA extraction from *Sporothrix* spp. using two commercial kits for FFPE tissues (chemical and thermal extraction) were used and validated in this study. The extracted DNA was used for molecular identification by the nested PCR technique, at the genus level of *Sporothrix* spp., for the diagnosis of feline and canine sporotrichosis in FFPE tissues based on amplification for the 18S region of ribosomal RNA (ITS). The chemical extraction kit using the protocol of 8 histological sections of 5 μm thick presented better performance. The nested PCR assay, using specific primers for the *Sporothrix* genus, showed high sensitivity and specificity to identify this fungus in FFPE samples of mycological culture pellets. The DNA extraction and nested PCR methodologies used here have great potential to be applied in the diagnosis of feline and canine sporotrichosis in FFPE samples in clinical routine.

Keywords: Sporotrichosis. *Sporothrix* spp.. PCR. Diagnosis. FFPE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esporotricose felina: lesões localizadas na face (GREMIÃO et al., 2014).....	5
Figura 2: Esporotricose felina: úlcera no nariz (GREMIÃO et al., 2014).....	5
Figura 3: Esporotricose canina: lesões cutâneas múltiplas (SCHUBACH et al., 2006).....	7
Figura 4: Esporotricose canina: linfangite nodular (SCHUBACH et al., 2006).....	7

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

EUA – Estados Unidos da América

FFEP – Fixado em formalina tamponada a 10% e emblocado em parafina

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ITS – *Internal transcriber spacer* (Região de transcrição interna)

LAPCLIN-DERMZOO – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

RAPD – *Random amplified polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente)

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA)

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Histórico da esporotricose.....	1
1.2	Complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	1
1.3	Esporotricose.....	2
1.4	Esporotricose felina.....	3
1.5	Esporotricose canina.....	6
1.6	Diagnóstico da esporotricose felina e canina.....	8
1.7	Diagnóstico molecular de <i>Sporothrix</i> spp.	10
1.8	Diagnóstico molecular de <i>Sporothrix</i> spp. em felinos e caninos.....	11
1.9	Diagnóstico molecular em amostras FFEP.....	133
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS.....	17
3.1.	Objetivo geral.....	17
3.2.	Objetivos específicos.....	17
4	CAPÍTULO 1.....	18
	<i>Avaliação e padronização de dois kits de extração de DNA em pellets FFEP de cultura micológica de diferentes espécies de Sporothrix.</i>	
5	CAPÍTULO 2.....	38
	<i>Avaliação e validação da extração de DNA de Sporothrix spp. em tecidos FFEP de felinos e caninos.</i>	
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÕES.....	56
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da esporotricose

O primeiro caso de esporotricose humana foi descrito em 1898, onde o estudante de medicina Benjamin Robinson Schenck, no Hospital Johns Hopkins, em Baltimore, Estados Unidos, realizou o isolamento de um fungo em um paciente com lesões cutâneas. A amostra foi identificada como uma espécie do gênero *Sporotrichum* pelo micologista Erwin F. Smith (SCHENCK, 1898).

Em 1900, Hektoen e Perkins descreveram em Chicago, também nos Estados Unidos, o segundo caso da doença em uma lesão cutânea de uma criança. Após o isolamento do fungo, foi proposto um novo nome para o agente, *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900). Mais de 200 casos da doença foram relatados por De Beurmann e Gougerot (1912) entre 1903 e 1912.

No Brasil, Lutz e Splendore em 1907 descreveram infecções humanas e em ratos no estado de São Paulo (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Terra e Rabelo descreveram em 1912 no Rio de Janeiro o primeiro caso de esporotricose humana (DONADEL et al., 1993) e o primeiro relato de esporotricose animal foi descrito por Leão e colaboradores (1934).

O primeiro relato da esporotricose naturalmente adquirida em gatos foi feito por Singer e Muncie (1952) em Nova York, nos Estados Unidos. No Brasil, a esporotricose felina foi relatada pela primeira vez em 1956, em São Paulo (FREITAS; M; ZANI, 1956), e em 1998 no Rio de Janeiro (BARONI; CAMPOS; DIREITO, 1998). Em 1915 na França, Meyer descreveu o primeiro caso de esporotricose canina, e os primeiros casos caninos no Brasil foram relatados em 1957 e 1964, originários de Recife, Rio Grande do Sul e São Paulo (SOUZA, 1957; MIGLIANO et al., 1963; LONDERO et al., 1964).

1.2 Complexo *Sporothrix schenckii*

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix* que são encontrados em plantas e matéria orgânica em decomposição e apresentam predileção por climas temperados e tropicais apesar de serem distribuídos universalmente na natureza (RIPPON, 1988). Por serem termodimórficos, apresentam-se na

forma filamentosa na natureza ou em meio de cultura à 25 ° C, e na forma leveduriforme quando em parasitismo ou em meio de cultura à 37 ° C (KWON-CHUNG E BENNET, 1992).

Estudos moleculares utilizando metodologias como o RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (ARENAS; MILLER; CAMPOS-MACIAS, 2007), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), (MESA-ARANGO et al., 2002), sequenciamento do DNA da região de transcrição interna do RNA ribossomal (*ITS*) (ZHANG et al., 2011), PCR com alvo no gene da topoisomerase II (KANBE et al., 2005), entre outros, demonstraram a presença de polimorfismos nos diferentes isolados de *S. schenckii*, indicando que a esporotricose poderia ser causada por outras espécies.

Com base nas análises da sequência parcial dos genes de quitina sintase, β -tubulina e calmodulina, análises moleculares demonstraram que a esporotricose é na verdade causada por fungos patogênicos do complexo *S. schenckii*, composto de sete espécies, discriminadas filogeneticamente, *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto* (*s. str.*), *S. globosa*, *S. luriei*, *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis* (DIAS et al., 2011; MADRID et al., 2009; MARIMON et al., 2006a, 2007, 2008; OLIVEIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013, 2016)

Entretanto, *S. schenckii* e *S. globosa* são as espécies geralmente associadas à via de transmissão clássica (não zoonótica), enquanto que a espécie *S. brasiliensis* está associada à esporotricose zoonótica (KANO et al., 2015; MARIMON et al., 2007; MONTENEGRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016; SONG et al., 2013). Além disso, *S. brasiliensis* demonstra possuir um perfil de virulência mais acentuado quando comparado às demais espécies do complexo, o que pode estar relacionado à secreção de fatores de virulência específicos (DELLA TERRA et al., 2017).

1.3 Esporotricose

A esporotricose é uma micose granulomatosa crônica, cosmopolita, causada pelo fungo termodimórfico do gênero *Sporothrix*, que acomete humanos e uma grande variedade de animais, principalmente gatos e cães (ARENAS, 2014; DÍAZ, 1989; GREMIÃO et al., 2017; OROFINO-COSTA et al., 2017).

A transmissão clássica da esporotricose ocorre na pele por meio da implantação traumática do fungo, que encontra-se presente na matéria vegetal ou orgânica de solo contaminado por conídios de *Sporothrix* (RIPPON, 1988). Além disso, pode ocorrer a

transmissão zoonótica por meio de animais infectados (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011) e raramente a doença pode ser adquirida através da inalação do esporo (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011).

A esporotricose apresenta diversas manifestações clínicas, desde infecções localizadas até infecções disseminadas, incluindo linfocutâneas e extracutâneas (GARCÍA CARNERO et al., 2018). A forma clínica predominante em casos humanos é a linfocutânea clássica, frequentemente relacionada à infecção pelo contato com gatos doentes (arranhaduras, mordidas e secreção) (SCHUBACH; BARROS; WANKE, 2008).

É a micose subcutânea com maior distribuição pelo mundo, com casos relatados em praticamente todos os continentes, especialmente em áreas tropicais e subtropicais (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2013), com áreas de alta incidência no Brasil, China e África (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016; GREMIÃO et al., 2017, 2020a; SCHUBACH; BARROS; WANKE, 2008; SONG et al., 2013).

Desde 1998, ocorre no Rio de Janeiro um grande número de casos da doença, e no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), principal centro de referência para o tratamento da doença, foi registrado entre 1998 e 2015 em torno de 5.000 casos de esporotricose humana, 5.113 casos de felinos e 247 caninos (1998 a 2014) (GREMIÃO et al., 2017; GREMIÃO et al., 2020; PEREIRA et al., 2014).

Na maioria dos países a esporotricose não é uma doença de notificação compulsória, sendo assim, as publicações científicas representam as principais fontes dessa informação (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; GREMIÃO et al., 2020). No Brasil, os casos de esporotricose humana se tornaram de notificação compulsória no ano de 2013, através da resolução SES nº 674 de 12 de junho de 2013 (SES-RJ, 2013) e em 2014 os casos de esporotricose felina e canina, através da portaria GM/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014, no artigo 2º, parágrafo IV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.4 Esporotricose felina

No município do Rio de Janeiro a esporotricose é considerada uma epidemia urbana, por apresentar uma distribuição geográfica da doença com alta incidência de casos no entorno da capital carioca, e em seus municípios vizinhos, afetando principalmente áreas com baixo nível socioeconômico, dificuldades ambientais e presença de felinos (BARROS et al., 2010)

(SILVA et al., 2012). Nos últimos 20 anos, outros estados brasileiros também relataram casos de esporotricose felina, especialmente no Rio Grande do Sul e São Paulo (MADRID et al., 2012b; MONTENEGRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011a; RODRIGUES et al., 2013).

Na maioria dos felinos, a infecção é adquirida através das arranhaduras e/ou mordeduras durante as brigas com outros gatos infectados, quando o fungo é inoculado na pele. Os gatos também podem ser infectados pelo contato físico com outros gatos doentes e do contato com ambientes contaminados (GREMIÃO et al., 2017; PEREIRA et al., 2014; SCHUBACH et al., 2004a). Os gatos desempenham um papel epidemiológico importante na disseminação da esporotricose, especialmente os gatos machos jovens, não castrados e com livre acesso à rua, que inclusive são aqueles mais gravemente afetados pela infecção (MADRID et al., 2012a; SCHUBACH et al., 2004b).

Diferentemente dos casos humanos, os gatos com esporotricose podem apresentar simultaneamente mais de uma forma da doença, o que dificulta a classificação. A doença apresenta desde uma infecção subclínica, passando por lesões cutâneas únicas até formas múltiplas e sistêmicas, acompanhadas ou não de sinais extracutâneos, como as manifestações respiratórias. Nesses animais, as lesões cutâneas assumem as formas nodular, ulcerada e de gomas (SCHUBACH et al., 2004a). As manifestações clínicas mais frequentes observadas em gatos são as lesões cutâneas múltiplas com envolvimento da mucosa, especialmente das membranas mucosas do trato respiratório (GREMIÃO et al., 2014; SCHUBACH et al., 2004a), como demonstrado nas figuras 1 e 2. Por conta do acometimento da mucosa nasal, sinais respiratórios como espirros são frequentes em gatos com esporotricose (SCHUBACH et al., 2004a).



Figura 1: Esporotricose felina: lesões localizadas na face (GREMIÃO et al., 2014).



Figura 2: Esporotricose felina: úlcera no nariz (GREMIÃO et al., 2014).

A esporotricose felina envolvida na hiperendemia do Rio de Janeiro apresenta características, como a diversidade de manifestações clínicas, a gravidade e extensão das lesões da doença, baixo índice de cura clínica e alta carga fúngica. Esses fatores podem estar relacionados à virulência das espécies dos fungos circulantes nessa região envolvidos nessas infecções (GREMIÃO et al., 2014; SCHUBACH et al., 2003).

Diferentemente da esporotricose humana, o tratamento da esporotricose felina é de longa duração e requer cuidados especiais, pois a administração dos fármacos por via oral é dificultada nos gatos e normalmente a adesão dos tutores ao tratamento do animal é baixa (CHAVES et al., 2013; PEREIRA et al., 2010). Entre os principais antifúngicos recomendados para o tratamento da esporotricose felina estão o itraconazol e cetoconazol, sendo o primeiro a droga de escolha (PEREIRA et al., 2010). Além desses, a anfotericina B, os iodetos de potássio e sódio, terbinafina, a termoterapia local, a remoção cirúrgica das lesões cutâneas (PEREIRA et al., 2018) e a criocirurgia (PEREIRA et al., 2014) são outras opções de tratamento.

1.5 Esporotricose canina

Existem poucos estudos envolvendo a esporotricose canina (SCHUBACH et al., 2006). Os primeiros casos de esporotricose canina foram relatados na França e no Brasil, na cidade do Recife e nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo (MEYER, 1915; SOUZA, 1957; LONDERO et al., 1964; MIGLIANO et al., 1963).

Em cães, a infecção ocorre pela introdução do fungo quando esses animais entram em contato com lascas de madeira ou espinhos contaminados, sendo por isso comum em cães de caça (RAMSEY, 2008). Entretanto, no Brasil, principalmente no Rio de Janeiro, observa-se que a infecção do cão ocorre na maioria dos casos após contato prévio com gatos com esporotricose (SCHUBACH et al., 2006). Entre 1998 e 2001, não houve relatos de casos de esporotricose humana associados à transmissão por cães nesta epidemia no Rio de Janeiro, apenas por felinos (BARROS et al., 2004).

As lesões frequentemente nodulares e ulceradas acometem, de modo geral, a cabeça, orelhas e tórax, raramente são descritas formas disseminadas nos cães (SCHUBACH et al., 2006; SYKES et al., 2001). Nos cães, a esporotricose pode se manifestar em três formas clínicas: cutânea localizada, cutânea linfática e cutânea disseminada (SCOTT et al., 1996; CROTHERS et al., 2009; PEREIRA et al., 2015). Foi demonstrado que cerca de 40% dos cães com esporotricose apresentaram lesões cutâneas únicas, encontradas com maior frequência no focinho e membros anteriores, 20,5% com acometimento da mucosa nasal, 6,8% com linfangite e 43,2% dos animais avaliados com linfadenomegalia regional (Figuras 3 e 4) (SCHUBACH et al., 2006).



Figura 3: Esporotricose canina: lesões cutâneas múltiplas (SCHUBACH et al., 2006).



Figura 4: Esporotricose canina: linfangite nodular (SCHUBACH et al., 2006).

Os fármacos mais utilizados para o tratamento da esporotricose canina são itraconazol oral, cetoconazol, seguido pelos iodetos de sódio e potássio (SCHUBACH et al., 2006; SCHUBACH et al., 2012). O potencial terapêutico da terbinafina foi confirmado para uso em humanos (FRANCESCONI et al., 2011). Recentemente, em dois casos de esporotricose canina

tratados com a terbinafina, a droga foi bem tolerada pelos animais, não gerando efeitos clínicos e ausência de sinais clínicos consistentes com a doença (VIANA et al., 2018).

1.6 Diagnóstico da esporotricose felina e canina

O método padrão de referência no diagnóstico da esporotricose humana e animal é a identificação morfológica do fungo através de seu isolamento em meio de cultura (RIPPON, 1988), a partir de amostras clínicas, como biópsias de lesões de pele ou exsudato das lesões, secreções da mucosa e aspirado de linfonodos (SCHUBACH et al., 2012). Para o diagnóstico micológico, o material clínico é semeado inicialmente no meio ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol ou no meio ágar Mycosel e incubado a 25 °C durante o período de cinco a sete dias ou mais. Após a incubação, é observado o crescimento de um fungo hialino na forma filamentosa, e que posteriormente observa-se a produção de melanina. Esse fungo é inoculado em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubado a 37 °C por mais cinco a sete dias, para a conversão do fungo da forma filamentosa para a forma leveduriforme, que apresenta um aspecto cremoso e coloração amarelada (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; RIPPON, 1988).

Apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, a cultura micológica apresenta algumas desvantagens, tais como a necessidade de um laboratório de biossegurança nível 2 para a manipulação do fungo *Sporothrix* spp., a possibilidade de contaminação bacteriana ou por ácaros devido aos *swabs* e biópsias contaminados. Além disso, é uma metodologia laboriosa e muitas vezes demorada, devido ao lento crescimento fúngico e por requerer a conversão para a fase de levedura pela subcultura a 37 °C, o que pode gerar atraso no início do tratamento antifúngico. Por fim, requer conhecimentos consideráveis para a correta identificação morfológica das espécies fúngicas (ALEXANDER; PFALLER, 2006; GREMIÃO et al., 2020b; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015). O isolamento do fungo nos caninos é mais difícil do que em felinos, provavelmente devido à baixa carga fúngica geralmente encontrada nas lesões cutâneas (SCHUBACH et al., 2004a, 2006).

Para o diagnóstico da esporotricose felina e canina, também podem ser utilizados exames microscópicos, como a citopatologia e histopatologia que são métodos presuntivos de diagnóstico, onde resultados negativos nesses métodos não descartam a presença de *Sporothrix* spp. (GREMIÃO et al., 2020b; MARIA et al., 2011).

O exame citopatológico baseado no *imprint* da lesão cutânea é utilizado rotineiramente como método de triagem devido a sua rapidez e facilidade de execução, baixo custo, necessidade de uma estrutura laboratorial simples, resultado rápido e alta sensibilidade, mas precisa de experiência para a correta identificação do agente (GREMIÃO et al., 2020b; PEREIRA et al., 2011). Em 2015 foi descrito o primeiro estudo de acurácia e confiabilidade da citopatologia para diagnóstico da esporotricose felina usando a cultura fúngica como padrão de referência. Nos 244 gatos com suspeita clínica de esporotricose avaliados no estudo foi demonstrado que esse método apresentou sensibilidade de 84,9%, porém com baixa especificidade (SILVA et al., 2015). O exame citopatológico tem sido amplamente utilizado no diagnóstico da esporotricose felina por conta da facilidade de observação das estruturas fúngicas devido à alta carga fúngica presente nas lesões cutâneas desses animais (SILVA et al., 2015).

A histopatologia é uma ferramenta auxiliar de diagnóstico que também é usada como uma alternativa rápida, barata e amplamente disponível para o diagnóstico da esporotricose felina (MIRANDA et al., 2013). O diagnóstico é mais difícil em casos onde a carga fúngica é baixa, como nas lesões de cães, então o uso de métodos mais precisos é necessário, como a imuno-histoquímica. Colorações histoquímicas, como a coloração de prata de Grocott, foram descritas para o diagnóstico de esporotricose humana e animal e são geralmente aplicadas para melhorar a visualização das células semelhantes a leveduras nos tecidos (MIRANDA et al., 2009).

A imuno-histoquímica permite a detecção do antígeno no tecido através da avaliação das interações antígeno-anticorpo (SILVA et al., 2018). Esse método já demonstrou melhorar a sensibilidade do diagnóstico histológico da esporotricose humana e canina (MIRANDA et al., 2011), mas ainda não foi aplicada à esporotricose felina (SILVA et al., 2018). Em cães, a detecção de antígenos intracelulares de *S. schenckii* por imuno-histoquímica aumentou a sensibilidade do diagnóstico histológico para 80,5%, o que sugere que essa técnica possa ser indicada para o diagnóstico de esporotricose devido à sua maior sensibilidade diagnóstica (MIRANDA et al., 2011).

As técnicas sorológicas podem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico ou para monitoramento da resposta ao tratamento ou recidivas da esporotricose humana (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2014; OROFINO-COSTA et al., 2017). Um estudo demonstrou o desempenho de um novo teste imunoenzimático (ELISA), desenvolvido com o antígeno SsCBF isolado e purificado da parede celular de *S. schenckii*, adaptado do teste ELISA

humano previamente desenvolvido, onde foi validado utilizando 62 soros de gatos infectados, com diagnóstico citopatológico e/ou cultura fúngica de esporotricose confirmado e já se encontra disponível em laboratórios privados (FERNANDES et al., 2011; MONTI, 2019).

Metodologias moleculares são bastante utilizadas para a identificação de *Sporothrix* spp. (GREMIÃO et al., 2020b). É crescente a busca por novos métodos de diagnóstico molecular para identificar espécies patogênicas em amostras de tecido, pois poucos ensaios de PCR foram descritos para a detecção de *Sporothrix* nessas amostras e ainda não são usados na rotina do diagnóstico da esporotricose humana e animal (KANO et al., 2005; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015).

1.7 Diagnóstico molecular de *Sporothrix* spp.

A identificação precoce, rápida e precisa de fungos patogênicos é importante para orientar a seleção da terapia antifúngica apropriada e, assim, melhorar os resultados dos pacientes, bem como para fins epidemiológicos (HINRIKSON et al., 2005). O desenvolvimento de métodos de identificação de *Sporothrix* que sejam rápidos, confiáveis e de baixo custo são necessários, principalmente, em áreas endêmicas e com recursos limitados (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015).

Poucos métodos moleculares têm sido aplicados na detecção de DNA de *S. schenckii* a partir de amostras clínicas e na identificação de *Sporothrix* em cultura (OLIVEIRA et al., 2014). O diagnóstico molecular usando a PCR, baseado na amplificação de sequências do gene do fungo, é uma importante ferramenta para identificar micoses invasivas (OLIVEIRA et al., 2014).

Para a identificação molecular de *Sporothrix* spp., têm sido desenvolvidas metodologias baseadas em PCR como o RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (ARENAS; MILLER; CAMPOS-MACIAS, 2007), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), (MESA-ARANGO et al., 2002), PCR M13 *fingerprinting* e PCR T3B *fingerprinting* (OLIVEIRA et al., 2012, 2014; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2014), sequenciamento parcial do DNA da região de transcrição interna do RNA ribossomal (*ITS*), sequenciamento parcial do DNA da região da calmodulina (*CAL*), β -tubulina (*β tub*) e quitina sintase (*CHS*), *nested* PCR (HU et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2020), PCR com alvo no gene da topoisomerase II (KANBE et al., 2005; KOURKOUMPETIS et al., 2012).

Nessas metodologias, para a diferenciação entre as espécies de *Sporothrix*, são utilizados como marcadores moleculares sequências de DNA em *loci* genômicos que codificam

proteínas, como *CAL* (MARIMON et al., 2006a, 2007; ZHANG et al., 2015), *βtub* (MARIMON et al., 2006b) e *CHS* (MARIMON et al., 2007), além de outro biomarcador como a região *ITS* (RASHMI; HAMSAVEENA, 2015a; RODRIGUES et al., 2014). Cabe ressaltar que os estudos para identificação das espécies têm o foco na caracterização do isolado fúngico obtido na cultura e não em amostras clínicas.

Em 2001, foi descrita a primeira PCR para identificação de *S. schenckii*, a partir de espécimes clínicos, onde *primers* específicos foram desenvolvidos com alvo no gene da quitina sintase 1 (KANO et al., 2001). Em seguida, amostras de biópsia de seis casos de esporotricose humana foram submetidas à análise molecular do estudo anterior, confirmando o uso da metodologia para o diagnóstico da esporotricose (KANO et al., 2003).

Hu et al. (2003) descreveram o primeiro uso da *nested* PCR com alvo no gene 18S do RNA ribossomal para detecção de DNA de *S. schenckii* em amostras de tecido de camundongos infectados experimentalmente e em amostras clínicas de pacientes com esporotricose, demonstrando alta sensibilidade e especificidade (HU et al., 2003). Em 2010 foi demonstrado que o ensaio de *nested* PCR identificou o DNA de *S. schenckii* de todos os tipos de mtDNAs (DNA mitocondrial), não demonstrado no estudo anterior, em isolados de diferentes áreas do mundo (XU et al., 2010). Entretanto, Mendoza et al. (2012) demonstraram um estudo de esporotricose experimental em camundongos, onde a *nested* PCR e estudos microscópicos apresentaram baixa eficácia, enquanto que a cultura e a detecção de anticorpos foram procedimentos diagnósticos eficazes (MENDOZA et al., 2012).

Recentemente, foi demonstrado um método inovador e altamente específico para detectar o *Sporothrix sensu lato* no líquido cefalorraquidiano, o que pode melhorar o diagnóstico e o tratamento precoce em pacientes com meningoencefalite causado por esse fungo (OLIVEIRA et al., 2020), o qual foi baseado em uma reação descrita por Hu et al. (2003) com pequenos ajustes e possibilitou a identificação de amostra clínica humana.

1.8 Diagnóstico molecular de *Sporothrix* spp. em felinos e caninos

Kano et al. (2005) descreveram um dos primeiros estudos para identificar o DNA de *S. schenckii* diretamente de amostras obtidas de biópsia de pele de um caso de esporotricose felina utilizando *primers* espécie-específicos para PCR baseados na sequência do gene CHS1 (KANO et al., 2005).

Poucos estudos realizaram a caracterização de isolados felinos e caninos em nível de espécie do complexo *Sporothrix*. A identificação molecular de *Sporothrix* spp. em isolados caninos é incomum. Em 2018, foi relatada a primeira descrição da espécie *S. brasiliensis* em cães do Rio de Janeiro por meio da PCR T3B *fingerprinting*, entretanto utilizando o isolado fúngico (VIANA et al., 2018).

Um estudo analisou 15 isolados fúngicos de gatos da endemia do Rio de Janeiro que foram classificados como pertencentes à espécie *S. brasiliensis* (RODRIGUES et al., 2013). Em outro estudo, através de análises fenotípicas e moleculares, foram caracterizados 8 isolados felinos obtidos do Rio Grande do Sul, sendo um caracterizado como *S. brasiliensis*, outro como *S. pallida* e seis como *S. schenckii* (OLIVEIRA et al., 2011a).

Por meio da técnica de PCR *fingerprinting* utilizando o primer universal T3B para distinguir entre as espécies do gênero *Sporothrix*, Boechat et al. (2018) identificaram 47 isolados obtidos de gatos, atendidos no INI/FIOCRUZ no Rio de Janeiro, como sendo da espécie *S. brasiliensis* (BOECHAT et al., 2018). Apesar dos resultados fenotípicos inconclusivos observados em 12 isolados do estudo, essa técnica molecular foi capaz de identificar com sucesso a espécie *S. brasiliensis* em todos os isolados testados (BOECHAT et al., 2018).

Recentemente, um estudo analisou isolados clínicos de 4 gatos com esporotricose de três regiões do estado do Rio de Janeiro e, pela a PCR, os mesmos foram identificados como da espécie *S. brasiliensis* (MACÊDO-SALES et al., 2020). Além disso, o estudo mostrou que os isolados de *S. brasiliensis* apresentavam características fenotípicas diversas, como pigmentação diferente na cultura micológica do mesmo isolado, indicando uma coinfeção entre isolados de *S. brasiliensis* distintos, o que pode representar uma ocorrência comum em áreas hiperendêmicas (MACÊDO-SALES et al., 2020).

O primeiro estudo que descreveu uma metodologia de PCR direto de lesões sugestivas de esporotricose em gatos, observou que 87,1% dos casos foram positivos pela PCR ou cultura fúngica para *Sporothrix*; 81,4% foram confirmados como sendo *S. brasiliensis* por PCR utilizando primers específicos, 71,4% por isolamento fúngico e 65,7% pelos dois métodos, indicando ser um bom método para identificar espécies de *Sporothrix* e permitir um diagnóstico rápido (GONSALES et al., 2020).

1.9 Diagnóstico molecular em amostras FFEP

Metodologias de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram recentemente desenvolvidas com o intuito de melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnósticos da esporotricose. Estas técnicas podem ser aplicadas em amostras frescas, bem como em amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFEP) (LAU et al., 2007). Assim, se a cultura não for possível por razões logísticas ou técnicas e, se não houver amostras alternativas disponíveis além do material fixado em formalina e emblocado em parafina, poderão ser utilizadas as abordagens moleculares de diagnóstico baseado em PCR (FRICKMANN et al., 2015).

Os tecidos FFEP apresentam diversas vantagens para fins diagnósticos, pois são fáceis de manusear e transportar, seu processamento é de baixo custo e mantêm a estabilidade mesmo quando armazenados por muito tempo em temperatura ambiente (DONCZO; GUTTMAN, 2018). A obtenção de produtos de PCR a partir do DNA extraído de tecido parafinado é uma tarefa difícil, porque, em geral, esse material é escasso, degradado e contém substâncias que inibem a reação de amplificação, como a formalina, ou inibem a proteinase K utilizada no procedimento de extração, como o xilol (CAO et al., 2003). A forma mais comum de dano ao DNA encontrada em tecidos fixados em formalina é a fragmentação dessa molécula (WONG et al., 2013). Foi demonstrado que a fragmentação do DNA em tecidos fixados em formalina aumenta com o longo tempo de armazenamento e com pH mais baixo da formalina usada na fixação dos tecidos (LUDYGA et al., 2012). Estudos comparando a amplificação do DNA fúngico de amostras frescas e FFEP descrevem consistentemente uma sensibilidade reduzida do tecido FFEP, indicando que o processo de fragmentação pode continuar acontecendo durante o armazenamento da amostra (LAU et al., 2007; LUDYGA et al., 2012; WILLINGER et al., 2003). Além disso, moléculas de DNA danificadas em tecidos FFEP podem criar artefatos que interferem na identificação dos fungos (DO; DOBROVIC, 2015).

Algumas sequências gênicas passaram a ser utilizadas como marcadores moleculares do fungo *Sporothrix* spp., sendo o sequenciamento pela PCR com alvo no gene da calmodulina (*CAL*) o mais utilizado. Todavia, o uso de *primers* desenvolvidos para outras regiões como *ITS*, β -tubulina, quitina sintase, e a PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B, também apresentam bons resultados para distinguir entre as espécies do complexo *Sporothrix* (OLIVEIRA et al., 2011b, 2014; RASHMI; HAMSAVEENA, 2015b; RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2014). Todos os marcadores citados acima

foram desenvolvidos para a utilização em amostras de DNA fúngico obtidas de cultura, havendo a carência de um marcador com sensibilidade e especificidade para utilização em amostras de DNA fúngico oriundos de amostras FFEP. Uma metodologia de *semi-nested* PCR foi desenvolvida para o diagnóstico de esporotricose humana em tecidos emblocados em parafina. Esse estudo apresentou 100% de sensibilidade e 98,7% de especificidade, apesar de apresentar diversas limitações (HAYASHI et al., 2019).

As infecções por *Sporothrix* spp. têm aumentado nos últimos anos e são difíceis de tratar, principalmente em gatos, devido à falta de diagnósticos e terapias antifúngicas eficazes. Na ocorrência de surtos, especialmente com envolvimento zoonótico, o diagnóstico rápido é essencial para minimizar a continuidade da transmissão e auxilia na escolha da terapia antifúngica mais adequada e na sua administração mais precoce nos pacientes, aumentando as chances de cura. A seleção de um tratamento efetivo depende, em parte, da correta identificação do agente etiológico envolvido na infecção. Com os métodos tradicionais, essa identificação pode demorar e os resultados podem ser inconclusivos. A identificação molecular e o diagnóstico podem ser realizados com microrganismos que não estão mais viáveis e o DNA pode ser detectado a partir de uma ampla variedade de amostras (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015), como por exemplo, em amostras FFEP. Portanto, são importantes estudos utilizando esse tipo de amostra clínica em casos de esporotricose animal.

2 JUSTIFICATIVA

A esporotricose é uma micose causada por fungos do gênero *Sporothrix*, com elevado número de casos no Rio de Janeiro e em outros estados do Brasil. O agente etiológico prevalente no Brasil é *S. brasiliensis*, espécie mais virulenta dentro do gênero. O crescente aumento desses casos demonstra a grande necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que sejam rápidas, eficientes e confiáveis, principalmente em áreas endêmicas.

O método padrão de referência no diagnóstico desta micose é o isolamento/identificação de *Sporothrix* spp. em meio de cultura a partir de espécimes clínicos. Geralmente, os gatos apresentam uma elevada carga fúngica em suas lesões cutâneas facilitando o diagnóstico laboratorial, ao contrário do que é observado nos cães, nos quais a regra é encontrar uma baixa carga fúngica. Entretanto, a cultura micológica pode apresentar falhas, tais como o crescimento fúngico pode não ser observado, pode haver contaminação microbiológica ou por ácaros e, em alguns casos, pode atrasar o início do tratamento antifúngico porque o isolamento do fungo é um processo prolongado. Assim, a doença pode se agravar, aumentando o risco de transmissão e reduzindo as chances de cura clínica.

A possibilidade de extrair o DNA fúngico em amostras emblocadas em parafina, e não a partir de amostras frescas ou congeladas, como é realizado rotineiramente, para diversos patógenos, e de identificar a presença do fungo *Sporothrix* spp. por PCR em nível de gênero e/ou espécie é um avanço para a obtenção do diagnóstico rápido, sensível e específico. Adicionalmente, a PCR em amostras FFEP e facilitará o acesso ao diagnóstico a animais atendidos em regiões onde não dispõem de um serviço de micologia clínica.

A técnica da PCR apresenta um bom potencial para elevar a sensibilidade do diagnóstico da esporotricose felina e canina em peles FFEP, principalmente por serem, por muitas vezes, a única amostra disponível. Isso porque, é uma metodologia mais rápida e sensível que as convencionais, de alta especificidade, confiável e capaz de detectar e identificar o DNA fúngico escasso nos tecidos FFEP, como em alguns casos de lesões felinas e em grande parte das lesões caninas, cujos métodos tradicionais são pouco sensíveis.

Formas acuradas e rápidas de diagnóstico são fundamentais para iniciar o tratamento precoce, aumentando a chance de sucesso terapêutico, bem como a redução de custos para o sistema público de saúde.

Não existe até o momento um protocolo estabelecido para a extração de DNA do fungo *Sporothrix* spp. em amostras FFEP de esporotricose felina e canina, assim como não existe ainda uma metodologia padronizada e reprodutível para realização da PCR para o diagnóstico definitivo da esporotricose felina e canina a partir de tecidos FFEP.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade do ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de esporotricose felina e canina, em nível de gênero, em amostras de pele fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina (FFEP), frente à cultura micológica como método padrão de referência.

3.2. Objetivos específicos

- Padronizar e validar dois kits para extração de DNA de *Sporothrix* spp. a partir de amostras de pele FFEP de gatos e cães com esporotricose: (1) kit de extração química; e (2) kit de extração térmica;
- Avaliar o desempenho dos kits de extração de DNA de *Sporothrix* spp. em amostras FFEP conforme a quantificação de DNA em relação à dois parâmetros: (1) concentração de DNA; e (2) grau de pureza do DNA, utilizando dois protocolos diferentes de cortes histológicos dos blocos parafinados;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica da *nested* PCR, em nível de gênero de *Sporothrix* spp., para o diagnóstico da esporotricose felina e canina em tecidos FFEP baseada na amplificação para a região 18S do RNA ribossomal (*ITS*).

4 CAPÍTULO 1

Avaliação e padronização de dois kits de extração de DNA em *pellets* FFEP de cultura micológica de diferentes espécies de *Sporothrix*.

Neste capítulo, apresentamos um estudo de padronização da extração de DNA e identificação molecular de amostras FFEP de *Sporothrix* spp..

Foram utilizadas seis espécies diferentes de *Sporothrix* (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*) de *pellets* obtidos por centrifugação de cultura micológica e FFEP, e três controles (*Cryptococcus* sp., *Leishmania infantum* e *Histoplasma* sp.) para avaliar a especificidade e a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas. As amostras deste estudo foram provenientes de projetos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ): L-041/06, LW-25/11, LW-32/12, LW-14/16, LW-12/17, e LW -17/17.

As amostras FFEP foram submetidas a dois protocolos de cortes histológicos (oito cortes de 5 µm de espessura e um corte de 16 µm de espessura) e à extração de DNA utilizando dois kits diferentes de extração de DNA (extração química e extração térmica). O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro para avaliação dos parâmetros de concentração e pureza do DNA (relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0). Para a identificação pela PCR em nível de gênero de *Sporothrix* spp. nas amostras FFEP, foi realizada uma metodologia de *nested* PCR similar à descrita baseada na amplificação para a região 18S do RNA ribossomal (*ITS*) (HU et al., 2003) com alguns ajustes para obtenção da padronização da reação possibilitando a amplificação do DNA oriundo de amostras parafinadas.

A comparação dos kits de extração de DNA em relação à concentração de DNA revelou que não houve diferença estatística na concentração de DNA entre os kits de extração e também entre os protocolos de cortes histológicos testados (corte – 5 µm e corte – 16 µm). A quantificação do grau de pureza do DNA indicou que o DNA extraído era mais puro, utilizando o critério da razão A_{260}/A_{280} no intervalo 1,8 – 2,0, no protocolo de extração térmica usando o protocolo de corte histológico de 16 µm em relação ao kit de extração química no mesmo protocolo de corte histológico.

A técnica de *nested* PCR foi capaz de identificar o gênero *Sporothrix* em todas as seis espécies FFEP testadas de *Sporothrix* utilizando o kit de extração química de DNA nos dois protocolos de cortes histológicos (100% de sensibilidade). A sensibilidade da técnica

molecular, utilizando o kit de extração térmica nos protocolos de cortes histológicos de 5 μm e 16 μm , foi de 83,3% e 50%, respectivamente. Ambos os kits de extração de DNA mostraram 100% de especificidade para *Sporothrix* spp e nenhuma reação cruzada foi observada.

O kit de extração química de DNA utilizando o protocolo de corte histológico de 5 μm de espessura apresentado neste estudo apresentou um desempenho superior ao kit de extração térmica, e ao outro protocolo de corte histológico, para a extração de DNA de *Sporothrix* spp. em amostras FFEP e, juntamente com o ensaio de *nested* PCR de alta sensibilidade, têm grande potencial para serem aplicados no diagnóstico de diferentes espécies de *Sporothrix* spp. em amostras FFEP.

O manuscrito foi submetido ao jornal *Frontiers in Veterinary Science*, conforme apresentado abaixo.

Nested PCR for the diagnosis of sporotrichosis in domestic animals from formalin-fixed and paraffin-embedded samples using different DNA extraction protocols

Raul L. Luiz^{1*}, Rodrigo C. Menezes², Sandro A. Pereira², Raquel d. Oliveira³, Manoel M. Oliveira^{1*}

¹Laboratory of Taxonomy, Biochemistry and Bioprospecting of Fungi, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil, ²Laboratory of Clinical Research on Dermatозoonoses in Domestic Animals, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil., Brazil, ³Clinical Epidemiology Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil., Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Veterinary Science

Specialty Section:
Comparative and Clinical Medicine

Article type:
Brief Research Report Article

Manuscript ID:
755897

Received on:
09 Aug 2021

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

RLFL, RCM, and MMEQ designed the study. RLFL carried out the experiments. RLFL, SAP and RCM organized the database. RCM and MMEQ designed the methodology. RCCM performed the statistical analysis. SAP, RVCO and RCM supervised the study. RCM and MMEQ raised funds. RLFL wrote the original draft. RLFL, RCCM, SAP, RVCO, and MMEQ reviewed and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Keywords

Cats and dogs, *Sporothrix* sp., FFPE samples, DNA extraction, Molecular diagnosis

Abstract

Word count: 148

Sporotrichosis is a chronic, cosmopolitan granulomatous mycosis that affects humans and animals. The infection is caused by the dimorphic fungi *Sporothrix* sp. The aim of the present study was to evaluate and standardize two DNA purification kits from formalin fixed and paraffin-embedded tissues (FFPE). FFPE mycological culture pellet samples of different *Sporothrix* species (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*) were sectioned into two distinct paraffin sections (5 and 16 μ m thick). The sections were subjected to two different DNA extraction kits (chemical and thermal extractions). A nested PCR was performed on the extracted DNA to identify the genus *Sporothrix*. The chemical extraction protocol with the 5 μ m thick paraffin section was more effective in extracting DNA from *Sporothrix* sp. from FFPE samples and the nested PCR technique showed a high sensitivity and specificity for the diagnosis of sporotrichosis in these samples.

Contribution to the field

In our study we evaluate and standardize two DNA purification kits from formalin fixed and paraffin-embedded tissues (FFPE). FFPE mycological culture pellet samples of different *Sporothrix* species (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*) were sectioned into two distinct paraffin sections (5 and 16 μ m thick). The sections were subjected to two different DNA extraction kits (chemical and thermal extractions). A nested PCR was performed on the extracted DNA to identify the genus *Sporothrix*. We observed that the chemical extraction protocol with the 5 μ m thick paraffin section was more effective in extracting DNA from *Sporothrix* sp. from FFPE samples and the nested PCR technique showed a high sensitivity and specificity. We believe that this manuscript represents a great contribution about for the diagnosis of sporotrichosis in FFPE samples.

Funding statement

This study was supported by the State Funding Agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - Grants: INST E-26/010.001784/2016; JCNE E-26/203.301/2017), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Grant Proc. 409227/2016-1) and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.



1
2 **Nested PCR for the diagnosis of sporotrichosis in domestic animals**
3 **from formalin-fixed and paraffin-embedded samples using different**
4 **DNA extraction protocols**
5

6 **Raul Leal Faria Luiz^{1*,†}, Rodrigo Caldas Menezes^{2,†}, Sandro Antonio Pereira², Raquel de**
7 **Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira³, Manoel Marques Evangelista Oliveira^{1*,†}**

8
9 ¹ Laboratory of Taxonomy, Biochemistry and Bioprospecting of Fungi, Oswaldo Cruz Institute,
10 Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

11 ² Laboratory of Clinical Research on Dermatозoonoses in Domestic Animals, Evandro Chagas
12 National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

13 ³ Clinical Epidemiology Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases,
14 Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

15 [†]These authors have contributed equally to this work and share first authorship

16 * Corresponding Author
17 R.L.F. Luiz, e-mail: raulealuz@gmail.com

18 M.M.E. Oliveira, e-mail: manael.marques@ioc.fiocruz.br

19 **ABSTRACT**

20 Sporotrichosis is a chronic, cosmopolitan granulomatous mycosis that affects humans and animals.
21 The infection is caused by the dimorphic fungi *Sporothrix* sp. The aim of the present study was to
22 evaluate and standardize two DNA purification kits from formalin fixed and paraffin-embedded tissues
23 (FFPE). FFPE mycological culture pellet samples of different *Sporothrix* species (*S. chilensis*, *S.*
24 *mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*) were sectioned into two distinct
25 paraffin sections (5 and 16 μ m thick). The sections were subjected to two different DNA extraction
26 kits (chemical and thermal extractions). A nested PCR was performed on the extracted DNA to identify
27 the genus *Sporothrix*. The chemical extraction protocol with the 5 μ m thick paraffin section was more
28 effective in extracting DNA from *Sporothrix* sp. from FFPE samples and the nested PCR technique
29 showed a high sensitivity and specificity for the diagnosis of sporotrichosis in these samples.

30 **Keywords: Cats and Dogs, *Sporothrix* sp., FFPE samples, DNA extraction, molecular diagnosis**

31 Number of words: 3991 ; number of figures: 1 and number of tables: 3

32 1 INTRODUCTION

33 Sporotrichosis is a chronic cosmopolitan granulomatous mycosis, caused by the thermodimorphic
34 fungus of the genus *Sporothrix*, which affects humans and a wide variety of animals, especially cats
35 and dogs (1–4). Since 1998, there have been a large number of cases of sporotrichosis in Rio de Janeiro.
36 At the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI) of the Oswaldo Cruz Foundation
37 (Fiocruz), one of the main reference center for the treatment of the disease in Brazil, it was registered
38 between 1998 and 2015 around 5,000 cases of human sporotrichosis, 5,113 felines cases during 1998
39 – 2018, and 244 canines (1998 to 2014) (3,5,6). The classical transmission of sporotrichosis occurs
40 through skin trauma by traumatic implantation of the fungus, which is present in the vegetal or organic
41 matter of soil contaminated by *Sporothrix* conidia (7). In addition, zoonotic transmission through
42 infected animals can occur (8). In most cats and canines, the infection is acquired after fights with other
43 infected cats and a contaminated environment (3,6). Sporotrichosis is caused by pathogenic species of
44 *Sporothrix*, including *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto (s. str.)*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. pallida*,
45 *S. mexicana*, and *S. chilensis* (9–15). *S. schenckii* and *S. globosa* are the species generally associated
46 with the classical (non-zoonotic) transmission route, while the species *S. brasiliensis* is associated with
47 zoonotic sporotrichosis (11,15–18).

48 The reference standard method for diagnosing animal sporotrichosis is mycological culture from
49 clinical samples, such as skin biopsies or exudate from animal lesions or swab of nasal mucosa, with a
50 presumptive diagnosis using microscopic examinations, such as cytopathology and histopathology
51 (19). However, in mycological culture, fungal growth may not be observed and there may be
52 microbiological contamination. It is a laborious and often time-consuming methodology, in addition
53 to requiring considerable knowledge for the correct morphological identification of fungal species
54 (20,21). Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens represent an extremely
55 valuable sample source for prospective and retrospective studies (22). If mycological culture is not
56 possible for logistical or technical reasons, and if there are no alternative samples available other than
57 FFPE material, polymerase chain reaction (PCR)-based molecular diagnostic approaches may be used
58 (23). PCR methodologies have recently been developed with the aim of improving the sensitivity and
59 specificity of diagnostic tests for sporotrichosis. These techniques can be applied to fresh samples as
60 well as to FFPE samples (24). Obtaining quality and pure PCR products from DNA extracted from
61 FFPE tissue is a difficult task, because, in general, this material is scarce, degraded and contains
62 substances that inhibit the amplification reaction, such as formalin, or inhibit proteinase K used in the
63 extraction procedure, such as xylene (25). There is still no standardized and reproducible PCR

64 methodology for the definitive diagnosis of animal sporotrichosis using FFPE tissues. The aim of the
65 present study was to analyze and standard two kits for DNA extraction from *Sporothrix* sp. (chemical
66 and thermal extractions) from FFPE mycological culture pellet samples of different *Sporothrix* species,
67 using two different protocols of paraffin sections and to identify at the genus-level the pathogenic
68 species of *Sporothrix* by nested PCR.

69

70 2 METHODS

71 **Samples:** Pellets of isolates of six different reference strains of *Sporothrix* species characterized in
72 previous studies of our group were used (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*
73 and *S. schenckii*) (26–29) obtained by centrifugation of mycological culture were fixed in 10% buffered
74 formalin and embedded in paraffin (FFPE) (30). These paraffin blocks were prepared in 2019. The
75 mycological culture technique for isolation of *Sporothrix* spp. was performed as described by Rippon,
76 1988 (7). FFPE tissue samples from mandibular lymph nodes from a *Cryptococcus* sp. positive cat,
77 and skin and spleen biopsies from *Leishmania infantum* and *Histoplasma* sp. positive dogs,
78 respectively, were used to evaluate the specificity and the occurrence of cross-reactions. These FFPE
79 tissues are from the year of 2013, 2016 and 2013, respectively. The DNA of type strain of *S. brasiliensis*
80 CBS120339 (formerly IPEC 16490) (11) was used as positive control in every PCR assay. To monitor
81 possible contamination, reaction mixtures without DNA were performed in the first and nested PCRs
82 as negative controls.

83 **Preparation of FFPE samples:** Each paraffin block was sectioned into two distinct protocols paraffin
84 sections: (a) eight 5 µm thick sections (5 µm section) and (b) one 16 µm thick section (16 µm section),
85 including the blocks of negative control samples, using a microtome. Weighting of the samples was
86 also performed in an analytical balance (Shimadzu). The sections were submitted to DNA extraction
87 from *Sporothrix* sp. as well as the other species of infectious agents (specificity and cross-reaction
88 controls). The extracted DNA was conditioned at -30° C until molecular identification by PCR.

89 **DNA extraction from FFPE samples:** DNA was extracted from the sectioned paraffin blocks using
90 two different commercial DNA extraction kits: (1) chemical extraction using the QIAamp® DSP DNA
91 FFPE Tissue Kit (Qiagen, California, USA) where the sections of FFPE samples were deparaffinized
92 with xylene; (2) thermal extraction using the ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System kit
93 (Promega Corporation, Madison, USA) where the sections of FFPE samples were deparaffinized with

94 mineral oil and incubated at 80° C. The extraction steps followed all the manufacturer's instructions.
95 After extraction, the DNA of the samples was frozen at -30° C.

96 **DNA quantification:** The DNA quantification in all FFPE samples was evaluated in DNA extract
97 using two parameters: (1) DNA concentration, using spectrophotometric measurement of absorbance
98 at 260 nm wavelength (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); (2) DNA
99 purity, using an absorbance ratio of 260 nm to 280 nm (A_{260}/A_{280}), considering the range of 1.8–2.0 to
100 be of good quality (31).

101 **Nested PCR assay:** For the genus-level PCR identification of *Sporothrix* sp. in FFPE specimens a
102 nested PCR was performed according to a previously described method that is based on amplification
103 for the 18S region of ribosomal RNA (ITS) (32) with slight modifications (33).

104 A ready-to-use PCR master mix 2X solution was used (Promega Corporation, Madison, USA). PCR
105 master mix contains 50 units/ml of Taq DNA polymerase supplied in a proprietary reaction buffer (pH
106 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP and 3mM MgCl₂. For a 50 µl total
107 reaction volume, reactions were standardized to obtain a final concentration of 100 to 120 ng of DNA.
108 The reaction mixture of the first-round PCR consisted of 1-15µl of DNA template, with final
109 concentrations of 1X PCR master mix and 0,2 µM of outer primers SS1 (5'-CTC GTT CGG CAC CTT
110 ACA CG-3') and SS2 (5'-CGC TGC CAA AGC AAC GCG GG-3') (34). The reaction mixture of the
111 nested PCR was identical, except that 3µl of the first reaction product and the inner primer pair SS3
112 (5'-ACT CAC CAG GTC CAG ACA CGA TG-3') and SS4 (5'-CGC GGG CTA TTT AGC AGG
113 TTA AG-3') (34) were used. The PCR reaction was performed in 0.5-ml thin-wall polypropylene tubes
114 in a thermal cycler Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) under the conditions:
115 initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 1 minute denaturation at 95°C,
116 hybridization for 1 minute at 68°C and extension for 1 minute at 72°C and then final extension for 10
117 minutes at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% w/v agarose gel (Agarose
118 Ultra-Pure – Invitrogen). DNA was stained with Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) and
119 the amplicons were visualized on a LED K33-333 transilluminator (KASVI). The first round amplified
120 a 305 bp fragment and the second one, a 152 bp fragment.

121 **Statistical analysis:** The exploratory analysis used mean, median, interquartile range, minimum and
122 maximum to summarize the quantitative variables and absolute and relative frequencies to describe the
123 qualitative variables. To compare the quantitative variables, Wilcoxon tests were used. The quantitative

124 DNA purity variable was categorized in pure and not pure, considering acceptable as pure for DNA
125 the value between 1.8 and 2.0, and is optimal around 1.8 (31). The sensitivity value of positive samples
126 by nested PCR was provided with the respective 95% confidence interval (CI). P-values <0.05 indicate
127 significant differences in the tests, however, due to the sample size, whenever possible, uncertainty
128 measures (variability and CI) were also provided. Free software R version 4.0 was used for statistical
129 analyses.

130 **3 RESULTS**

131 No statistical difference between the weights of the paraffin sections was observed ($p>0.05$). The mean
132 weight of the FFPE samples in the eight 5 μm thick paraffin sections and in the single 16 μm thick
133 section was 15.1 mg and 8.5 mg, respectively.

134 The comparison of the DNA extraction protocols based on the concentration and purity of the DNA
135 using both paraffin sections (5 μm and 16 μm) is shown in the Table 1. There was no statistical
136 difference in the DNA concentration between the extraction kits ($p=0.8203$ in 5 μm and $p=1.000$ in 16
137 μm). There was also no statistical difference in the DNA concentration between the tested paraffin
138 sections (Table 1). The degree of DNA purity indicated that the extracted DNA was purer (A_{260}/A_{280}
139 ratio within the range 1.8-2.0) in the thermal extraction protocol using the 16 μm paraffin section in
140 relation to the other kit in the same paraffin section ($p = 0.009$) (Table 2).

141 Using the chemical extraction methodology, nested PCR technique was able to detect the 152bp
142 fragment of all six FFPE *Sporothrix* species tested for both paraffin sections (100% sensitivity) (Figure
143 1). The sensitivity of the thermal extraction in the 5 μm and 16 μm paraffin sections was 83,3% and
144 50%, respectively (Table 3). Both DNA FFPE extraction protocols showed 100% specificity for
145 *Sporothrix* sp. and no cross-reactions were observed, demonstrated by the absence of amplified product
146 in nested PCR in FFPE samples of *Cryptococcus* sp., *Leishmania infantum* and *Histoplasma* sp. (Figure
147 1).

148

149

150 **DISCUSSION**

151 FFPE tissues have several advantages for diagnostic purposes, as they are easy to handle and transport,
152 their processing is low-cost and maintain stability even when stored for a long time at room temperature
153 (22). However, obtaining DNA in this type of sample with sufficient quantity and quality using
154 extraction techniques is a challenge (35). Several preanalytical factors can influence the analysis of
155 nucleic acids in FFPE samples, such as biospecimen fixation, specimen size, block storage, section

156 thickness, section storage, and others (36). The 5 µm thick sections are commonly used in the analysis
157 of different types of FFPE tissues, with different numbers of sections (37–43), and the 16 µm thick
158 sections were tested in this work as an alternative to produce samples with a smaller amount of paraffin,
159 which contains PCR inhibitors (44), also in an attempt to increase the sensitivity of the methods. In the
160 present study, the chemical DNA extraction methodology demonstrated the best performance
161 compared to the thermal protocol, mainly in 5 µm thick section.

162 Although the DNA concentration was similar in both protocols and paraffin section and the purest
163 DNA was observed in thermal extraction (16 µm section), the nested PCR assay demonstrated the
164 superiority of the chemical extraction methodology by the positivity observed in all samples tested.
165 The chemical extraction kit used in our study was used by Sarnecka et al. with FFPE tumor tissues,
166 where the amount of DNA was similar to the present study (median of 13.20ng/µl), including the result
167 of DNA purity with the same median ($A_{260}/A_{280} = 1.90$) in the 5 µm thick sections. However, molecular
168 analyzes were not performed and the performance of this kit in the study was inferior to the other tested
169 (automated extraction) (43). Higher DNA concentrations ranging from 12.3 to 618.9 ng were observed
170 in another study with FFPE fungal samples using the same chemical extraction kit with one 25 µm
171 thick sections and modifications such as longer incubation time with proteinase K and another cell lysis
172 protocol (23).

173 In this work, the nested PCR methodology performed was similar to that described by Hu et al. based
174 on amplification for the 18S region of ribosomal RNA (ITS), using specific primers for *Sporothrix* spp
175 (32). Despite the high sensitivity and specificity observed, a semi-nested PCR methodology was
176 developed for the diagnosis of human sporotrichosis in tissues embedded in paraffin, but few cases
177 were analyzed and there is a lack of details that make its reproducibility difficult (45). Also, they used
178 the same chemical DNA extraction kit but it was not reported how the paraffin blocks were sectioned
179 (45). Hu et al. described a nested PCR assay for the detection of *S. schenckii* for diagnosing cutaneous
180 sporotrichosis from frozen skin tissues (32). Based on them, Hayashi et al. designed new primers to
181 increase the sensitivity and specificity (100% and 98,7%, respectively) in their semi-nested PCR assay
182 (45). In the present study, we used the same primer sets, specific for *Sporothrix* DNA, described by Hu
183 et al. (32), and we were able to detect this fungus in FFPE samples.

184 Another important factor in this work was the standardization of the methodology using a master mix
185 solution to perform the PCR mixture, which facilitates and could expedite the performance of the
186 assays and the diagnosis of sporotrichosis in the clinical laboratory. The amount of DNA in these
187 samples was considered ideal, as a standardization of the DNA concentration was performed in our
188 study, but the highest degree of DNA purity was only 44.4%, within the purity criteria, observed in the

189 thermal extraction protocol using the 16 µm paraffin section. This result may have been influenced by
190 the low amount of material in the paraffin blocks. However, the nested PCR assay showed that even
191 with low DNA purity in FFPE samples, it was possible to obtain high sensitivity and specificity. This
192 indicates that in FFPE samples the degree of DNA purity can be more variable than in fresh or frozen
193 samples, with a range of purity larger than the one considered. Furthermore, the nested PCR was
194 capable to identify at the genus-level the pathogenic species of *Sporothrix* tested (*S. chilensis*, *S.*
195 *mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*). Oliveira et al. also used the same
196 sets of primers to detect the *Sporothrix sensu lato* in cerebrospinal fluid, therefore, the nested
197 amplification of the 18S rRNA gene fragment can detect all the *Sporothrix* species of the *Sporothrix*
198 complex (33). In order to ensure no cross-reaction with fungi and protozoan frequently found in feline
199 and canine skin cases, *Cryptococcus* sp., *Leishmania infantum* and *Histoplasma* sp. FFPE tissue
200 samples was included. As *Sporothrix* species have a large geographic distribution (46), this protocol
201 can be applied in different regions of the world regardless of the species associated with the cases.
202 Statistical tests may have been impaired due to sample size. So, our findings need to be validated in a
203 larger number of FFPE clinical samples of animals in next studies.
204 In conclusion, the DNA chemical extraction protocol with the 5 µm thick paraffin section presented
205 here was more effective in extracting DNA from *Sporothrix* sp. from FFPE samples and together with
206 the high sensitivity nested PCR assay have great potential to be applied in *Sporothrix* sp. diagnosis in
207 these samples.

208

209 4 REFERENCES

- 210 1. Díaz IAC. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia [Internet]. 1989
211 Nov [cited 2021 Jan 31];108(2):113–6. Available from:
212 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2687693/>
- 213 2. Arenas R. Micología Medica Ilustrada. 5th ed. Mexico city, Mexico: McGraw-Hill; 2014.
214 160–172 p.
- 215 3. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of
216 Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. PLoS Pathog. 2017;13(1).
- 217 4. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis:
218 An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. An Bras

- 219 Dermatol. 2017;92(5):606–20.
- 220 5. Gremião IDF, Oliveira MME, Monteiro de Miranda LH, Saraiva Freitas DF, Pereira SA.
221 Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(3):621–4.
- 222 6. Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. The
223 epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro,
224 Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):392–3.
- 225 7. Rippon JW. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. W
226 B Saunders Co. 1988;3rd ed. Ph:325–52.
- 227 8. Barros MB de L, Paes R de A, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Vol.
228 24, *Clinical microbiology reviews*. 2011. p. 633–54.
- 229 9. Dias NM, Oliveira MME, Portela MA, Santos C, Zancoppe-Oliveira RM, Lima N.
230 Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal [Internet]. Vol. 17, *Emerging*
231 *Infectious Diseases*. 2011 [cited 2018 Nov 8]. p. 1975–6. Available from:
232 http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0737_article.htm
- 233 10. Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic
234 fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2009 Sep 30
235 [cited 2018 Nov 8];26(3):218–22. Available from:
236 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635441>
- 237 11. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S.*
238 *globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*
239 [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Jan 13];45(10):3198–206. Available from:
240 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17687013/>
- 241 12. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin.
242 *Med Mycol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2018 Nov 8];46(6):621–5. Available from:
243 <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780801992837>
- 244 13. Oliveira MME de, de Almeida-Paes R, de Muniz MM, de Barros MBL, Galhardo MCG,
245 Zancoppe-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil:

- 246 Case report. *Mycopathologia* [Internet]. 2010 May 4 [cited 2018 Nov 8];169(5):359–63.
247 Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-010-9276-7>
- 248 14. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF,
249 et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline
250 Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6).
- 251 15. Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix*
252 *chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis
253 with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Nov
254 8];120(2):246–64. Available from:
255 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614615000884>
- 256 16. Kano R, Okubo M, Siew HH, Kamata H, Hasegawa A. Molecular typing of *Sporothrix*
257 *schenckii* isolates from cats in Malaysia. *Mycoses* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Nov
258 8];58(4):220–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12302>
- 259 17. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline
260 sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo,
261 Brazil. *BMC Vet Res* [Internet]. 2014 Dec 19 [cited 2018 Nov 8];10(1):269. Available from:
262 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407096>
- 263 18. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from
264 Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J Eur Acad Dermatology Venereol*
265 [Internet]. 2013 Mar [cited 2018 Nov 8];27(3):313–8. Available from:
266 <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x>
- 267 19. Zancoppe-Oliveira RM, Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, Gutierrez-Galhardo MC.
268 New diag- nostic applications in sporotrichosis. In: Khopkar U, editor. *Skin biopsy-*
269 *perspectives*. Rijeka: InTech Europe; 2011. p. 53–72.
- 270 20. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of
271 Invasive Mycoses. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2006;43(Supplement 1):S15–27. Available from:
272 <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/504491>
- 273 21. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix*

- 274 Species. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;9(12):1–22. Available from:
275 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190>
- 276 22. Donczo B, Guttman A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue
277 samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. J Pharm Biomed Anal [Internet].
278 2018;155:125–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065>
- 279 23. Frickmann H, Loderstaedt U, Racz P, Tenner-Racz K, Eggert P, Haeupler A, et al. Detection
280 of tropical fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: Still an indication for
281 microscopy in times of sequence-based diagnosis? Biomed Res Int. 2015;2015.
- 282 24. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. Development and clinical
283 application of a panfungal PCR assay to detect and identify Fungal DNA in tissue specimens. J
284 Clin Microbiol. 2007;45(2):380–5.
- 285 25. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA
286 extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. Cancer Detect Prev [Internet].
287 2003 [cited 2018 Oct 25];27(5):397–404. Available from:
288 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585327>
- 289 26. Valeriano CAT, de Lima-Neto RG, Inácio CP, Rabello VB de S, Oliveira EP, Zancopé-
290 Oliveira RM, et al. Is sporothrix chilensis circulating outside Chile? PLoS Negl Trop Dis
291 [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Aug 1];14(3). Available from:
292 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32226021/>
- 293 27. Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM.
294 Phenotypic and Molecular Identification of Sporothrix Isolates from an Epidemic Area of
295 Sporotrichosis in Brazil. Mycopathologia. 2011;172(4):257–67.
- 296 28. D’Alessandro E, Giosa D, Huang L, Zhang J, Gao W, Brankovics B, et al. Draft genome
297 sequence of the dimorphic fungus sporothrix pallida, a nonpathogenic species belonging to
298 sporothrix, a genus containing agents of human and feline sporotrichosis. Genome Announc
299 [Internet]. 2016 [cited 2021 Jul 29];4(2):184–200. Available from:
300 </pmc/articles/PMC4816622/>
- 301 29. Oliveira MME de, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-

- 302 Oliveira RM. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. *J Clin*
303 *Microbiol.* 2012;50(6):2159–62.
- 304 30. Carson F, Cappellano CH. *Histotechnology: A Self Instructional Text.* Vol. 4th Edition,
305 American Society for Clinical Pathology. 2015.
- 306 31. Thermo Fisher Scientific. *Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers.*
307 *Nucleic Acid* [Internet]. 2010 [cited 2021 Aug 1];11:1–30. Available from:
308 www.nanodrop.com
- 309 32. Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, et al. Detection of *Sporothrix*
310 *schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Apr
311 [cited 2018 Nov 13];41(4):1414–8. Available from:
312 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682123>
- 313 33. Oliveira MME, Muniz M de M, Almeida-Paes R, Zancoppe-Oliveira RM, Freitas AD, Lima
314 MA, et al. Cerebrospinal fluid PCR: A new approach for the diagnosis of CNS sporotrichosis.
315 *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Jan 20];14(7):1–4. Available from:
316 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7365394/>
- 317 34. Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, et al. Detection of *Sporothrix*
318 *schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1414–8.
- 319 35. Maraschin BJ, da Silva VP, Rock L, Sun H, Visioli F, Rados PV, et al. Optimizing fixation
320 protocols to improve molecular analysis from FFPE tissues. *Braz Dent J.* 2017;28(1):82–4.
- 321 36. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting
322 molecular, protein, and morphological analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE)
323 tissue: How well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med.*
324 2014;138(11):1520–30.
- 325 37. Barton Rogers B, Alpert LC, Hine EAS, Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed
326 tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1990;136(3):541–8.
- 327 38. Bernhardt A, Von Bomhard W, Antweiler E, Tintelnot K. Molecular identification of fungal
328 pathogens in nodular skin lesions of cats. *Med Mycol.* 2015;53(2):132–44.

- 329 39. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence
330 copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor
331 samples. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1301–8.
- 332 40. Janecka A, Adamczyk A, Gasińska A. Comparison of eight commercially available kits for
333 DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Anal Biochem* [Internet].
334 2015 May 1 [cited 2018 Nov 11];476:8–10. Available from:
335 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269715000329>
- 336 41. Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, et al. High-quality genomic
337 DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using
338 mineral oil. *Anal Biochem* [Internet]. 2009;395(2):265–7. Available from:
339 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.08.016>
- 340 42. Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, et al. Improving
341 molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Comparison
342 of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J Clin Microbiol.*
343 2010;48(6):2147–53.
- 344 43. Sarnecka AK, Nawrat D, Piwowar M, Ligeża J, Swadźba J, Wójcik P. DNA extraction from
345 FFPE tissue samples – a comparison of three procedures. *Wspolczesna Onkol.* 2019;23(1):52–
346 8.
- 347 44. Frank TS, Svoboda-Newman SM, Hsi ED. Comparison of methods for extracting DNA from
348 formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagnostic Mol Pathol* [Internet]. 1996
349 Sep [cited 2021 Jul 24];5(3):220–4. Available from:
350 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8866237/>
- 351 45. Hayashi S, Kaminaga T, Baba A, Koike S, Suzuki T, Hamasaki Y, et al. Diagnostic value of a
352 nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin -
353 embedded skin tissue. 2019;(March):1–6.
- 354 46. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP.
355 The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*
356 [Internet]. 2020 Oct 12;185(5):813–42. Available from:
357 <https://link.springer.com/10.1007/s11046-020-00425-0>

358

359 Table 1: Comparison of chemical and thermal DNA extraction protocols in 9 paraffin blocks of
 360 *Sporothrix* sp. and negative controls, using the two paraffin sections (5 μ m and 16 μ m), in relation to
 361 the DNA concentration (ng/ μ l) and the degree of DNA purity (A_{260}/A_{280} nm ratio).
 362

DNA FFPE protocol	Parameter	5 μ m - Paraffin section				16 μ m - Paraffin section				p-value*
		Median	Min.	Max.	IQR	Median	Min.	Max.	IQR	
Chemical extraction	DNA quantity (ng/ μ l)	8.2	4.5	122.8	13.5	8.9	0.6	152.8	13.7	0.4961
	DNA purity (A_{260}/A_{280})	1.90	1.59	7.23	0.4	1.93	0.91	6.66	0.51	1.000
Thermal extraction	DNA quantity (ng/ μ l)	10.3	7.2	89.5	6.0	11.6	5.7	72.5	14.3	0.5703
	DNA purity (A_{260}/A_{280})	1.71	1.49	1.92	0.09	1.63	1.33	1.99	0.42	1.000

363 Median, minimum (min), maximum (max) values, and interquartile ranges (IQR) of the DNA quantification
 364 results of the 9 paraffin blocks used are expressed. * Wilcoxon test between the two paraffin sections (5 μ m
 365 and 16 μ m).
 366

367 Table 2: Comparison of chemical and thermal DNA extraction protocols in 9 paraffin blocks of
 368 *Sporothrix* spp and negative controls, using the two paraffin sections (5 μ m and 16 μ m), in relation to
 369 the degree of DNA purity (A_{260}/A_{280} nm ratio).
 370

DNA FFPE protocol (n=9)	DNA purity			
	5 μ m		16 μ m	
	Pure (%)	Non-pure (%)	Pure (%)	Non-pure (%)
Chemical extraction	2 (22.2)	7 (77.8)	2 (22.2)	7 (77.8)
Thermal extraction	2 (22.2)	7 (77.8)	4 (44.4)	5 (55.6)

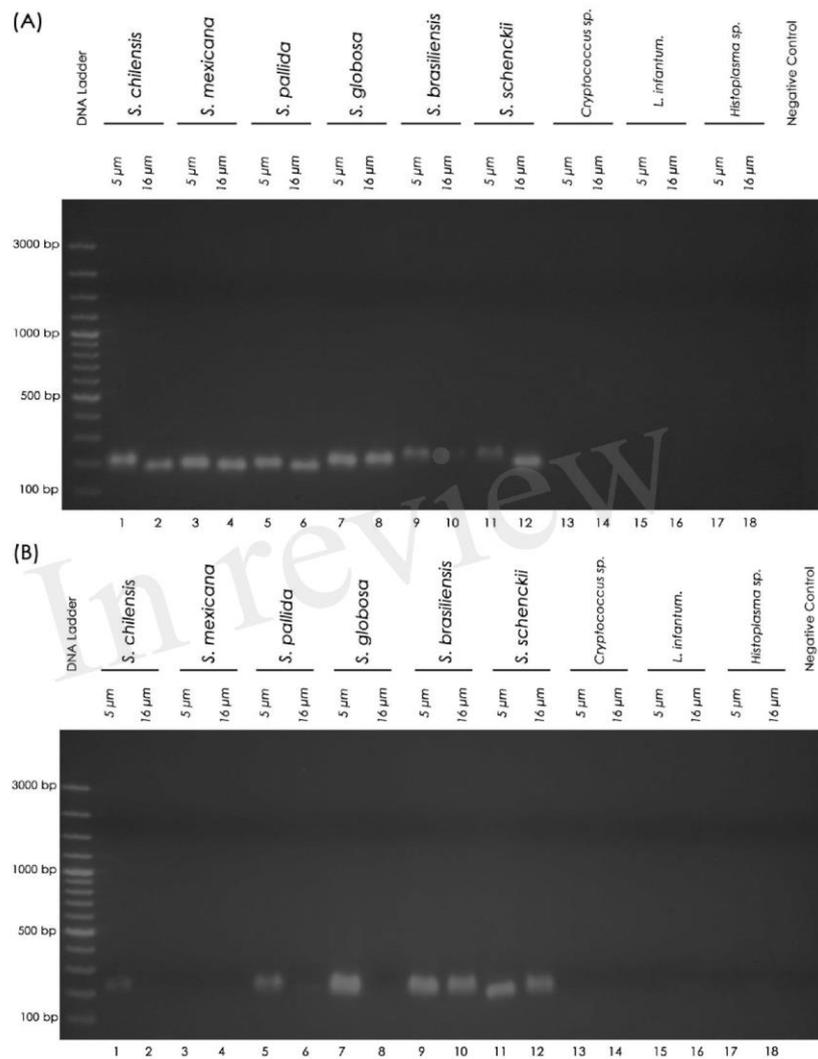
371 DNA results with the A_{260}/A_{280} ratio falling within the range of 1.8 – 2.0 were considered as pure.
 372

373

374

375

376



377

378 Figure 1: Nested PCR products on agarose gel. A) Chemical extraction. B) Thermal extraction. Left to
 379 right: Molecular marker DNA ladder, 100 bp (Fermentas). *S. chilensis*: 1 (5 μ m) and 2 (16 μ m); *S.*
 380 *chilensis*: 3 (5 μ m) and 4 (16 μ m); *S. pallida*: 5 (5 μ m) and 6 (16 μ m); *S. pallida*: 7 (5 μ m) and 8 (16
 381 μ m); *S. globosa*: 9 (5 μ m) and 10 (16 μ m); *S. brasiliensis*: 11 (5 μ m) and 12 (16 μ m); *S. schenckii*: 13
 382 (5 μ m) and 14 (16 μ m); *Cryptococcus sp.*: 15 (5 μ m) and (16 μ m); *L. infantum*: 17 (5 μ m) and 18 (16
 383 μ m); *Histoplasma sp.*; PCR negative control (sterile water). The nested PCR product is a 152 base pair
 384 (152 bp) amplicon.

385 Table 3: Comparison of chemical and thermal DNA extraction protocols in paraffin blocks of
 386 *Sporothrix* spp paraffin blocks (n = 6), using the two paraffin sections (5 μ m and 16 μ m), in relation
 387 to positivity, method sensitivity and confidence interval (95% CI).
 388

DNA FFPE protocol	Nested PCR - <i>Sporothrix</i> spp.				
	Positive	Negative	Sensitivity (%)	95%CI (%)	
Chemical extraction	5 μ m	6	0	100	54 - 100
	16 μ m	6	0	100	54 - 100
Thermal extraction	5 μ m	5	2	83.3	35.8 – 99.6
	16 μ m	3	3	50	11.8 - 88.2

389 5 Conflict of Interest

390 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
 391 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

392 6 Data availability statement

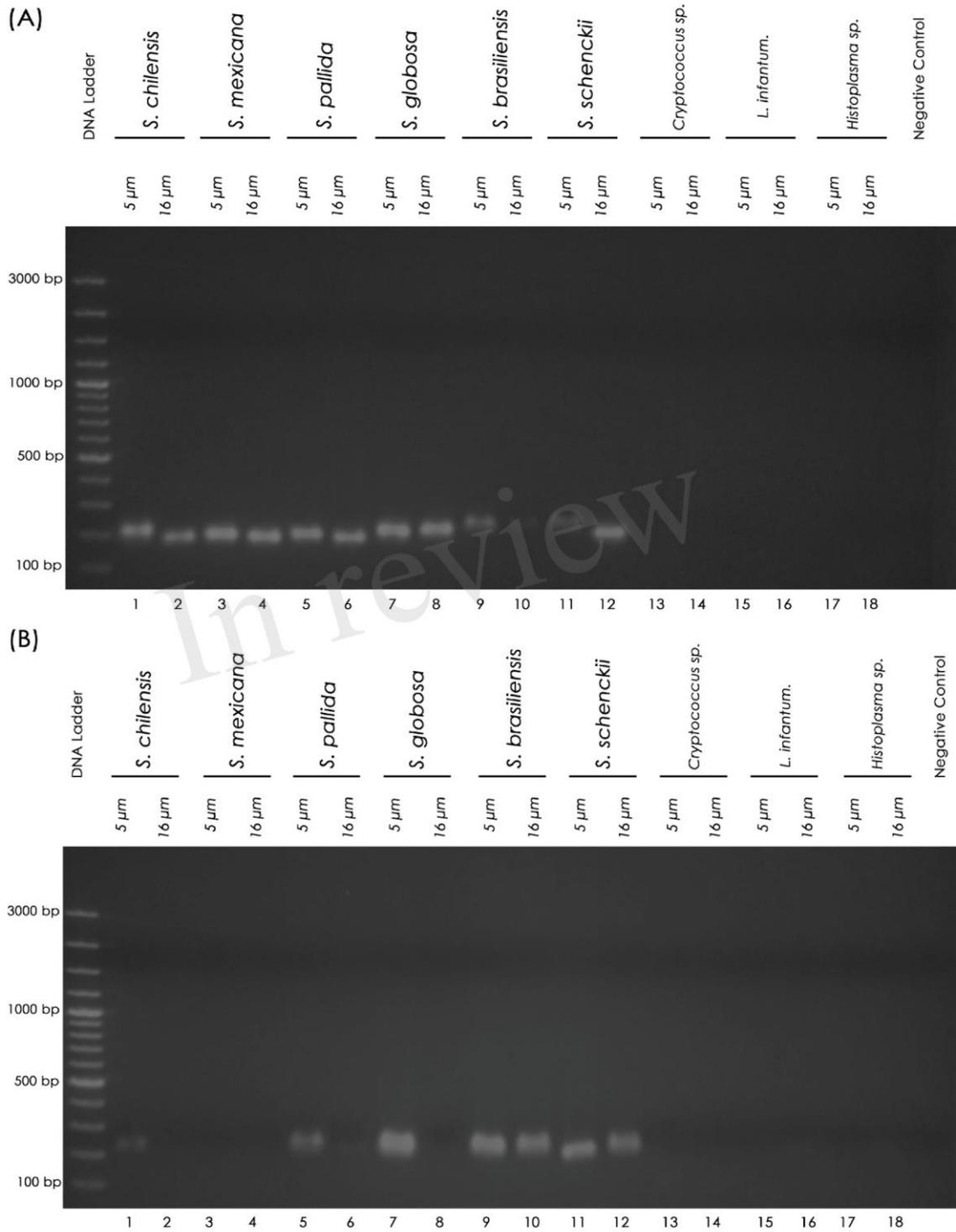
393 RLFL, RCM, and MMEO designed the study. RLFL carried out the experiments. RLFL, SAP and
 394 RCM organized the database. RCM and MMEO designed the methodology. RCCM performed the
 395 statistical analysis. SAP, RVCO and RCM supervised the study. RCM and MMEO raised funds. RLFL
 396 wrote the original draft. RLFL, RCCM, SAP, RVCO, and MMEO reviewed and edited the manuscript.
 397 All authors contributed to the article and approved the submitted version. This study was supported
 398 by the State Funding Agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio
 399 de Janeiro (FAPERJ - Grants: INST E-26/010.001784/2016; JCNE E-26/203.301/2017), Conselho
 400 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Grant Proc. 409227/2016-1) and in
 401 part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance
 402 Code 001.

403

404 8 Acknowledgments

405 We thank Danielly Corrêa Moreira for performing the mycological culture of the *Sporothrix* species
 406 and Luiz Claudio Ferreira for performing the histological sections of the paraffin blocks. We also thank
 407 *Stricto Sensu* Graduate Program in Clinical Research in Infectious Diseases, Evandro Chagas National
 408 Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation.

Figure 1.TIF



5 CAPÍTULO 2

Avaliação e validação da extração de DNA de *Sporothrix* spp. em tecidos FFEP de felinos e caninos.

Neste capítulo, apresentamos um estudo de validação da metodologia de extração de DNA e identificação molecular previamente descrito pelo nosso grupo (Luiz et al., dado não publicado - artigo do capítulo 1) em tecidos FFEP de felinos e caninos com diagnóstico de esporotricose.

O estudo representa o desenvolvimento de um método de diagnóstico laboratorial, onde foram utilizadas 14 amostras de peles FFEP de gatos e 20 amostras de peles FFEP de cães, com diagnóstico definitivo de esporotricose pelo isolamento de *Sporothrix* spp. por cultura micológica. As amostras de pele foram obtidas por meio de biópsia da borda de lesões ativas, com a utilização de *punch* de 3-4 mm. Os animais foram atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, no período de 2009 a 2019. As amostras deste estudo foram provenientes de projetos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ): L-041/06, LW-25/11, LW-32/12, LW-14/16, LW-12/17 e LW -17/17.

A preparação das amostras FFEP foi realizada como descrito no capítulo anterior por Luiz et al. (dado não publicado - artigo do capítulo 1). Cada bloco parafinado foi submetido a dois protocolos de cortes histológicos (oito cortes de 5 μ m de espessura e um corte de 16 μ m de espessura). Em seguida, os cortes foram submetidos à extração de DNA de *Sporothrix* spp utilizando dois kits comerciais de extração de DNA (extração química e extração térmica). O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro para avaliação dos parâmetros de concentração e pureza do DNA (relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0). Por fim, uma *nested* PCR foi realizada no DNA extraído para identificação do gênero *Sporothrix*.

Em relação à concentração de DNA foi observado que não houve diferença estatística entre os kits de extração e também entre os protocolos de cortes histológicos entre as amostras de cães e gatos ($p>0,05$). O mesmo foi observado em relação ao grau de pureza do DNA. As amostras de cães e gatos apresentaram baixa pureza do DNA extraído utilizando os kits de extração química e térmica e em ambos os protocolos de cortes histológicos ($p>0,05$).

A técnica de *nested* PCR demonstrou que mesmo com DNA impuro foi possível detectar a presença de *Sporothrix* spp. nos tecidos parafinados, principalmente dos gatos. Utilizando os kits de extração química e térmica, no protocolo de corte histológico de 5 μ m, a sensibilidade da PCR foi de 42.8% e 28.6%, respectivamente. Para as amostras de cães, a sensibilidade da técnica molecular foi muito baixa em todas as metodologias de extração de DNA e cortes histológicos.

Em acordo com os resultados encontrados pelo estudo anterior do nosso grupo (Luiz et al., dado não publicado), foi observado que mesmo não havendo diferença estatística em relação à concentração e baixo grau de pureza de DNA, para as amostras clínicas emblocadas em parafina de cães e gatos, o kit de extração química de DNA utilizando o protocolo de corte histológico de 5 μ m de espessura foi mais eficaz que o kit de extração térmica, e ao outro protocolo de corte histológico, principalmente pela maior sensibilidade demonstrada pelo ensaio de *nested* PCR.

O manuscrito está em fase de preparação para submissão à revista BMC Veterinary Research, conforme apresentado abaixo.

Validation protocol for the diagnosis of feline and canine sporotrichosis in FFPE tissues by nested PCR

Raul Leal Faria Luiz^{1*}, Rodrigo Caldas Menezes², Sandro Antonio Pereira², Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira³, Manoel Marques Evangelista de Oliveira¹

¹ Laboratory of Taxonomy, Biochemistry and Bioprospecting of Fungi, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

² Laboratory of Clinical Research on Dermatозoonoses in Domestic Animals, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

³ Clinical Epidemiology Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

* Corresponding Author

R.L.F. Luiz, e-mail: raulealuz@gmail.com

ABSTRACT

Sporotrichosis is a chronic, cosmopolitan granulomatous mycosis that affects humans and animals. The infection is caused by the dimorphic fungi *Sporothrix* spp. The aim of the present study was to validate a DNA extraction and molecular identification methodology previously described by our group from formalin fixed and paraffin-embedded tissues (FFPE). FFPE tissues from 14 felines and 20 canines with a definitive diagnosis of sporotrichosis by isolation of *Sporothrix* spp. by mycological culture were sectioned into two paraffin sections protocols (5 and 16 μm thick). The sections were subjected to two different DNA extraction kits (chemical and thermal extractions). The extracted DNA was subjected to a nested PCR to identify the genus *Sporothrix* spp. The chemical extraction with the 5 μm thick paraffin section protocol showed higher sensitivity for the identification of *Sporothrix* spp. by nested PCR in felines FFPE tissues (42.8 %), while canine samples showed low sensitivity in both DNA extraction protocols and histological sections tested.

Keywords: Feline, canine, sporotrichosis, *Sporothrix* spp, FFPE, DNA extraction, nested PCR

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a chronic cosmopolitan granulomatous mycosis, caused by the thermodimorphic fungus of the genus *Sporothrix*, which affects humans and a wide variety of animals, especially cats and dogs (1–4). Since 1998, there has been a large number of cases of sporotrichosis in Rio de Janeiro. At the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI) of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), one of the main reference centers for the treatment of the disease in Brazil, it was registered between 1998 and 2015 around 5,000 cases of human sporotrichosis, 5,113 feline cases during 1998 – 2018, and 244 canine (1998 to 2014) (3,5,6). The classical transmission of sporotrichosis occurs through skin trauma by traumatic implantation of the fungus, which is present in the vegetal or organic matter of soil contaminated by *Sporothrix* conidia (7). In addition, zoonotic transmission through infected animals can occur (8). In most cats and canines, the infection is acquired after fights with other infected cats and a contaminated environment (3,6). Sporotrichosis is caused by pathogenic species of *Sporothrix*, including *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto* (*s. str.*), *S. globosa*, *S. luriei*, *S. pallida*, *S. mexicana*, and *S. chilensis* (9–15). *S. schenckii* and *S. globosa* are the species generally associated with the classical (non-zoonotic) transmission route, while the species *S. brasiliensis* is associated with zoonotic sporotrichosis (11,15–18).

The reference standard method for diagnosing animal sporotrichosis is mycological culture from clinical samples, such as skin biopsies or exudate from animal lesions or swab of nasal mucosa, with a presumptive diagnosis using microscopic examinations, such as cytopathology and histopathology (19). However, in mycological culture, fungal growth may not be observed and there may be microbiological contamination. It is a laborious and often time-consuming methodology, in addition to requiring considerable knowledge for the correct morphological identification of fungal species (20,21). Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens represent an extremely valuable sample source for prospective and retrospective studies (22). If mycological culture is not possible for logistical or technical reasons, and if there are no alternative samples available other than FFPE material, polymerase chain reaction (PCR)-based molecular diagnostic approaches may be used (23). PCR methodologies have recently been developed with the aim of improving the sensitivity and specificity of diagnostic tests for sporotrichosis. These techniques can be applied to fresh samples as well as to FFPE

samples (24). Obtaining quality and pure PCR products from DNA extracted from FFPE tissue is a difficult task, because, in general, this material is scarce, degraded and contains substances that inhibit the amplification reaction, such as formalin, or inhibit proteinase K used in the extraction procedure, such as xylene (25). There is still no validated and reproducible PCR methodology for the definitive diagnosis of animal sporotrichosis using FFPE tissues. The aim of the present study was to validate a DNA extraction and molecular identification methodology previously described by our group (Luiz et al. (unpublished data)) from formalin fixed and paraffin-embedded tissues (FFPE) by analyzing two kits for DNA extraction from *Sporothrix* sp. (chemical and thermal extractions) from FFPE tissues from 14 felines and 20 canines, with a definitive diagnosis of sporotrichosis by isolation of *Sporothrix* spp. by mycological culture, using two different protocols of paraffin sections. The identification at the genus-level of *Sporothrix* was performed by nested PCR.

METHODS

Samples: FFPE tissues from 14 felines and 20 canines, with a definitive diagnosis of sporotrichosis by isolation of *Sporothrix* spp. by mycological culture, were used. These paraffin blocks were prepared in the period from 2009 to 2019. The mycological culture technique for isolation of *Sporothrix* spp. was performed on Sabouraud Dextrose Agar (Difco Becton, Dickinson and Company/Sparks) with chloramphenicol and incubated at 25°C for five to seven days. After the growth of a hyaline fungus in the filamentous form, it produces melanin, which was inoculated into a Brain Heart Infusion medium (BHI, Difco Becton, Dickinson and Company/Sparks) and incubated at 37°C for five to seven days to convert the fungus to the yeast form (7). The DNA of type strain of *S. brasiliensis* CBS120339 (formerly IPEC 16490) (11) was used as positive control in every PCR assay. To monitor possible contamination, reaction mixtures without DNA were performed in the first and nested PCRs as negative controls.

Preparation of FFPE samples: Each paraffin block was sectioned into two distinct protocols of paraffin sections: (a) eight 5 µm thick sections (5 µm section) and (b) one 16 µm thick section (16 µm section), including the blocks of negative control samples, using a microtome. Weighting of the samples was also performed in an analytical balance (Shimadzu). The sections were submitted to DNA extraction from *Sporothrix* sp. The extracted DNA was conditioned at -30° C until molecular identification by PCR.

DNA extraction from FFPE samples: DNA was extracted from the sectioned paraffin blocks using two different commercial DNA extraction kits: (1) chemical extraction using the QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, California, USA) where the sections of FFPE samples were deparaffinized with xylene; (2) thermal extraction using the ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System kit (Promega Corporation, Madison, USA) where the sections of FFPE samples were deparaffinized with mineral oil and incubated at 80° C. The extraction steps followed all the manufacturer's instructions. After extraction, the DNA of the samples was frozen at -30° C.

DNA quantification: The DNA quantification in all FFPE samples was evaluated in DNA extract using two parameters: (1) DNA concentration, using spectrophotometric measurement of absorbance at 260 nm wavelength (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); (2) DNA purity, using an absorbance ratio of 260 nm to 280 nm (A_{260}/A_{280}), considering the range of 1.8–2.0 to be of good quality (26).

Nested PCR assay: For the genus-level PCR identification of *Sporothrix* sp. in FFPE specimens a nested PCR was performed according to a previously described method that is based on amplification for the 18S region of ribosomal RNA (ITS) (27) with slight modifications (28).

A ready-to-use PCR master mix 2X solution was used (Promega Corporation, Madison, USA). PCR master mix contains 50 units/ml of Taq DNA polymerase supplied in a proprietary reaction buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP and 3mM MgCl₂. For a 50 µl total reaction volume, reactions were standardized to obtain a final concentration of 100 to 120 ng of DNA. The reaction mixture of the first-round PCR consisted of 1-15µl of DNA template, with final concentrations of 1X PCR master mix and 0,2 µM of outer primers SS1 (5'-CTC GTT CGG CAC CTT ACA CG-3') and SS2 (5'-CGC TGC CAA AGC AAC GCG GG-3') (29). The reaction mixture of the nested PCR was identical, except that 3µl of the first reaction product and the inner primer pair SS3 (5'-ACT CAC CAG GTC CAG ACA CGA TG-3') and SS4 (5'-CGC GGG CTA TTT AGC AGG TTA AG-3') (29) were used. The PCR reaction was performed in 0.5-ml thin-wall polypropylene tubes in a thermal cycler Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) under the conditions: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 1 minute denaturation at 95°C, hybridization for 1 minute at 68°C and extension for 1 minute at 72°C and then final extension for 10 minutes at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% w/v agarose gel (Agarose

Ultra-Pure – Invitrogen). DNA was stained with Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) and the amplicons were visualized on a LED K33-333 transilluminator (KASVI). The first round amplified a 305 bp fragment and the second one, a 152 bp fragment.

Statistical analysis: The exploratory analysis used mean, median, interquartile range, minimum and maximum to summarize the quantitative variables and absolute and relative frequencies to describe the qualitative variables. To compare the quantitative variables, Wilcoxon tests were used. The quantitative DNA purity variable was categorized in pure and not pure, considering acceptable as pure for DNA the value between 1.8 and 2.0, and is optimal around 1.8 (26). The sensitivity value of positive samples by nested PCR was provided with the respective 95% confidence interval (CI). P-values <0.05 indicate significant differences in the tests, however, due to the sample size, whenever possible, uncertainty measures (variability and CI) were also provided. Free software R version 4.0 was used for statistical analyses.

RESULTS

It was observed no statistical difference between the weights of the paraffin sections was observed ($p>0.05$). The mean weight of the FFPE samples in the eight 5 μm thick paraffin sections and in the single 16 μm thick section was 15.1 mg and 8.5 mg, respectively.

The comparison of the DNA extraction protocols based on the concentration and purity of the DNA using both paraffin sections (5 μm and 16 μm) is shown in the Table 1. No statistical difference in the DNA concentration between the extraction kits was observed. There was also no statistical difference between the protocols of histological sections in the samples of dogs and cats ($p>0.05$) (Table 1). The same was observed regarding the degree of purity of the DNA. The samples of dogs and cats showed low purity of the extracted DNA using the chemical and thermal extraction kits and in both histological section protocols ($p>0.05$) (Table 2).

In cats FFPE tissues, the higher sensitivity of nested PCR technique was observed using the protocol of 5 μm paraffin sections in the chemical extraction methodology (42.8% sensitivity), followed by 28.6% sensitivity in the thermal extraction (Table 3). The sensitivity of nested in FFPE tissues from dogs was low in both extraction kits and histological sections protocols (Table 3).

DISCUSSION

FFEP tissues have several advantages for diagnostic purposes, as they are easy to handle and transport, their processing is low-cost and maintain stability even when stored for a long time

at room temperature (22). However, obtaining DNA in this type of sample with sufficient quantity and quality using extraction techniques is a challenge (30). Several preanalytical factors can influence the analysis of nucleic acids in FFPE samples, such as biospecimen fixation, specimen size, block storage, section thickness, section storage, and others (31). The 5 μm thick sections are commonly used in the analysis of different types of FFPE tissues, with different numbers of sections (32–38), and the 16 μm thick sections were tested in this work as an alternative to produce samples with a smaller amount of paraffin, which contains PCR inhibitors (39), also in an attempt to increase the sensitivity of the methods.

In the present study, it was observed a large variability in DNA concentration (0.1 to 178.2 ng/ μl) in the FFEP skin biopsy samples from cats and dogs with sporotrichosis. Nechifor-Boilă et al. (2015) considered the DNA concentration of 100 ng/ μl an ideal cutoff point for a good DNA concentration in FFEP carcinoma samples (NECHIFOR-BOILĂ et al., 2015). Although the DNA concentration was similar between these animals in both protocols and paraffin sections, our data corroborate with the previous study, since we validated our PCR methodology using a DNA concentration of 100 to 120 ng/ μl as the ideal one for the amplification of our target sequence. Higher DNA concentrations ranging from 12.3 to 618.9 ng were observed by Frickmann et al. (2015) with FFPE fungal samples using the same chemical extraction kit but with one 25 μm thick sections and modifications such as longer incubation time with proteinase K and another cell lysis protocol (23). The degree of DNA purity, mainly in FFPE tissues of dogs, showed low purity of the extracted DNA using the chemical and thermal extraction kits and in both histological section protocols, considering the range of 1.8–2.0 in the A_{260}/A_{280} ratio to be of good quality. Between our clinical samples from cats and dogs, the highest degree of purity was observed in FFEP tissues from cats using the chemical extraction kit in the 16 μm section (42.9%). However, is unknown the ideal degree of purity expected in relation to samples of lesions of *Sporothrix* spp. previously fixed in formalin and embedded in paraffin.

In this work, the nested PCR methodology performed was similar to that described by Hu et al. based on amplification for the 18S region of ribosomal RNA (ITS), using specific primers for *Sporothrix* spp (27). In the present study, we used the same primer sets, specific for *Sporothrix* DNA, described by Hu et al. (2003) (27), and we were able to detect this fungus in FFPE samples from cats and dogs with sporotrichosis. Despite the high sensitivity and specificity observed, a semi-nested PCR methodology was developed for the diagnosis of human sporotrichosis in tissues embedded in paraffin, but few cases were analyzed and there is a lack of details that make its reproducibility difficult (40). Also, they used the same chemical DNA

extraction kit but it was not reported how the paraffin blocks were sectioned (40). Despite the low DNA purity observed in our FFPE samples, the nested PCR assay showed higher sensitivity of nested PCR technique using the protocol of 5 µm paraffin sections in the chemical extraction methodology in cat FFPE samples (42.8% sensitivity). This indicates that in FFPE samples the degree of DNA purity can be more variable than in fresh or frozen samples, with a range of purity larger than the one considered. Oliveira et al. also used the same sets of primers to detect the *Sporothrix sensu lato* in cerebrospinal fluid, therefore, the nested amplification of the 18S rRNA gene fragment can detect all the *Sporothrix* species of the *Sporothrix* complex (28). Another important factor in this work was the use of a master mix solution to perform the PCR mixture, which facilitates and could expedite the performance of the assays and the diagnosis of sporotrichosis in the clinical laboratory.

Despite the satisfactory results observed in our study by the nested PCR assay, it is necessary to search for alternatives to obtain FFPE samples with higher concentration and purity of DNA, such as the collection of a larger fragment of the biopsy of the lesions of dogs and cats, in order to obtain a greater fungal load in these samples, mainly from dogs, and adjustments in DNA extraction methodologies to reduce inhibitors and contaminants.

In conclusion, the DNA chemical extraction protocol with the 5 µm thick paraffin section presented here was more effective in extracting DNA from *Sporothrix* sp. from FFPE clinical samples from cats and dogs and together with the nested PCR assay have great potential to be applied in the diagnosis of feline and canine sporotrichosis in these samples.

REFERENCES

1. Díaz IAC. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia [Internet]. 1989 Nov [cited 2021 Jan 31];108(2):113–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2687693/>
2. Arenas R. Micología Medica Ilustrada. 5th ed. Mexico city, Mexico: McGraw-Hill; 2014. 160–172 p.
3. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. PLoS Pathog. 2017;13(1).

4. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5):606–20.
5. Gremião IDF, Oliveira MME, Monteiro de Miranda LH, Saraiva Freitas DF, Pereira SA. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(3):621–4.
6. Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):392–3.
7. Rippon JW. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. W B Saunders Co. 1988;3rd ed. Ph:325–52.
8. Barros MB de L, Paes R de A, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. Vol. 24, *Clinical microbiology reviews*. 2011. p. 633–54.
9. Dias NM, Oliveira MME, Portela MA, Santos C, Zancope-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal [Internet]. Vol. 17, *Emerging Infectious Diseases*. 2011 [cited 2018 Nov 8]. p. 1975–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0737_article.htm
10. Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2009 Sep 30 [cited 2018 Nov 8];26(3):218–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635441>
11. 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* [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Jan 13];45(10):3198–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17687013/>
12. Marimon R, Genè J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2018 Nov 8];46(6):621–5. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780801992837>
13. Oliveira MME de, de Almeida-Paes R, de Muniz MM, de Barros MBL, Galhardo MCG, Zancope-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: Case report. *Mycopathologia* [Internet]. 2010 May 4 [cited 2018 Nov 8];169(5):359–63. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-010-9276-7>

14. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6).
15. Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Nov 8];120(2):246–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614615000884>
16. Kano R, Okubo M, Siew HH, Kamata H, Hasegawa A. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. *Mycoses* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Nov 8];58(4):220–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12302>
17. 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* [Internet]. 2014 Dec 19 [cited 2018 Nov 8];10(1):269. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407096>
18. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2018 Nov 8];27(3):313–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x>
19. Zancope-Oliveira R, Paes R, Oliveira M, Freitas D, Galhardo MC. New Diagnostic Applications in Sporotrichosis. In 2011.
20. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2006;43(Supplement 1):S15–27. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/504491>
21. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(12):1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190>
22. Donczo B, Guttman A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2018;155:125–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.065>
23. Frickmann H, Loderstaedt U, Racz P, Tenner-Racz K, Eggert P, Haeupler A, et al. Detection of tropical fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: Still an indication for microscopy in times of sequence-based diagnosis? *Biomed Res Int*. 2015;2015.

24. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify Fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):380–5.
25. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev [Internet].* 2003 [cited 2018 Oct 25];27(5):397–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585327>
26. Thermo Fisher Scientific. Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. *Nucleic Acid [Internet].* 2010 [cited 2021 Aug 1];11:1–30. Available from: www.nanodrop.com
27. Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, et al. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol [Internet].* 2003 Apr [cited 2018 Nov 13];41(4):1414–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682123>
28. Oliveira MME, Muniz M de M, Almeida-Paes R, Zancope-Oliveira RM, Freitas AD, Lima MA, et al. Cerebrospinal fluid PCR: A new approach for the diagnosis of CNS sporotrichosis. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 2020 Jul 1 [cited 2021 Jan 20];14(7):1–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7365394/>
29. Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, et al. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1414–8.
30. Maraschin BJ, da Silva VP, Rock L, Sun H, Visioli F, Rados PV, et al. Optimizing fixation protocols to improve molecular analysis from FFPE tissues. *Braz Dent J.* 2017;28(1):82–4.
31. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(11):1520–30.
32. Barton Rogers B, Alpert LC, Hine EAS, Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1990;136(3):541–8.
33. Bernhardt A, Von Bomhard W, Antweiler E, Tintelnot K. Molecular identification of fungal pathogens in nodular skin lesions of cats. *Med Mycol.* 2015;53(2):132–44.

34. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1301–8.
35. Janecka A, Adamczyk A, Gasińska A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Anal Biochem* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2018 Nov 11];476:8–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269715000329>
36. Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, et al. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem* [Internet]. 2009;395(2):265–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.08.016>
37. Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, et al. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2147–53.
38. Sarnecka AK, Nawrat D, Piwowar M, Ligęza J, Swadźba J, Wójcik P. DNA extraction from FFPE tissue samples – a comparison of three procedures. *Wspolczesna Onkol.* 2019;23(1):52–8.
39. Frank TS, Svoboda-Newman SM, Hsi ED. Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagnostic Mol Pathol* [Internet]. 1996 Sep [cited 2021 Jul 24];5(3):220–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8866237/>
40. Hayashi S, Kaminaga T, Baba A, Koike S, Suzuki T, Hamasaki Y, et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin - embedded skin tissue. 2019;(March):1–6.

Table 1: Comparison of chemical and thermal DNA extraction protocols in FFPE tissues of 14 felines and 20 canines, using the two paraffin sections protocols (5 μm and 16 μm), in relation to the DNA concentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$) and the degree of DNA purity (A_{260}/A_{280} nm ratio).

DNA FFPE protocol	Parameter	Animal	5 μm - Paraffin section			16 μm - Paraffin section		
			Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.
Chemical extraction	DNA quantity (ng/ μl)	Cat	7.9	0.5	65.0	6.0	0.1	68.6
		Dog	4.9	0.4	178.2	2.6	0.4	24.3
	DNA purity (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Cat	1.71	0.00	2.99	1.83	0.00	2.52
		Dog	1.9	1.12	11.94	2.37	0.00	7.72
Thermal extraction	DNA quantity (ng/ μl)	Cat	10.6	2.1	73.7	10.4	2.9	49.2
		Dog	8.0	2.1	32.9	8.4	2.2	35.6
	DNA purity (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Cat	1.79	1.37	3.31	1.64	1.12	1.86
		Dog	1.60	1.30	1.94	1.55	0.88	2.16

Median, minimum (min), maximum (max) values, and interquartile ranges (IQR) of the DNA quantification results of the 34 paraffin blocks used are expressed.

Table 2: Comparison of chemical and thermal DNA extraction protocols in FFPE tissues of 14 felines and 20 canines, using the two paraffin sections protocols (5 μm and 16 μm), in relation to the the degree of DNA purity (A₂₆₀/A₂₈₀ nm ratio).

DNA FFPE protocol (n=35)	Animal	DNA purity			
		5 μm		16 μm	
		Pure (%)	Non-pure (%)	Pure (%)	Non-pure (%)
Chemical extraction	Cat	2 (14.3)	12 (85.7)	6 (42.9)	8 (57.1)
	Dog	7 (35)	13 (65)	3 (15)	17 (85)
Thermal extraction	Cat	5 (35.7)	9 (64.3)	2 (14.3)	12 (85.7)
	Dog	2 (10)	18 (90)	1 (5)	19 (95)

DNA results with the A₂₆₀/A₂₈₀ ratio falling within the range of 1.8 – 2.0 were considered as pure.

Table 3: Comparison of chemical and thermal DNA extraction protocols in FFPE tissues of 14 felines and 20 canines, using the two paraffin sections protocols (5 μm and 16 μm), in relation to the positivity, method sensitivity and confidence interval (95% CI).

DNA FFPE protocol	Animal	Nested PCR - <i>Sporothrix</i> spp.				
		Positive	Negative	Sensitivity (%)	CI (%)	
Chemical extraction	5 μ m	Cat	6	8	42.8	17.6 - 71.1
		Dog	1	19	5	0.12 - 24.8
	16 μ m	Cat	1	13	7.1	0.18 - 33.8
		Dog	1	19	5	0.12 - 24.8
Thermal extraction	5 μ m	Cat	4	10	28.6	8.4 - 58.1
		Dog	3	17	15	3.2 - 37.8
	16 μ m	Cat	1	13	7.1	0.18 - 33.8
		Dog	3	17	15	3.2 - 37.8

6 DISCUSSÃO

Para fins diagnósticos, os tecidos FFEP apresentam diversas vantagens, pois são fáceis de manusear, seu processamento é de baixo custo e mantém a estabilidade mesmo sendo armazenados em longo prazo (DONCZO; GUTTMAN, 2018). Apesar de pouco explorados, esses tecidos representam um valioso recurso para estudos moleculares retrospectivos (KOKKAT et al., 2013). Porém, a obtenção de DNA nesse tipo de amostra, em quantidade e qualidade suficientes a partir de técnicas de extração, é um desafio (MARASCHIN et al., 2017). Diversos fatores pré-analíticos podem influenciar a análise de ácidos nucleicos em amostras FFEP, como o método de fixação de amostra, o seu tamanho, armazenamento de bloco, espessura do corte histológico e seu armazenamento, entre outros (BASS et al., 2014). Além disso, o DNA extraído de amostras FFEP é escasso, degradado e geralmente contém substâncias que podem inibir as reações de amplificação (CAO et al., 2003; COURA et al., 2005).

Nesse estudo utilizamos dois kits comerciais de extração de DNA desenvolvidos para purificar o DNA de patógenos em tecidos FFEP de gatos e cães com esporotricose. A metodologia de extração química utiliza xilol no processo de desparafinização, enquanto que a metodologia de extração térmica utiliza óleo mineral e incubação à 80°C para desparafinizar as amostras FFEP. Em relação aos agentes utilizados para desparafinização, o xilol é um solvente tóxico e o mais utilizado para este fim em amostras FFEP, embora possa causar a fragmentação do DNA (RAMESH et al., 2019). Já sem possibilidade de risco ocupacional, o óleo mineral tem sido eficaz como método de desparafinização em experimentos de recuperação de DNA de amostras FFEP (LIN et al., 2009).

Cada amostra FFEP utilizada foi submetida a dois protocolos de cortes histológicos: oito cortes histológicos de 5 µm de espessura e a um corte histológico de 16 µm de espessura. Os cortes histológicos de 5 µm são comumente usadas na análise de diferentes tipos de tecidos FFEP, com diferentes números de cortes, conforme metodologias sugeridas em estudos anteriores com outros microrganismos (BARTON ROGERS et al., 1990; BERNHARDT et al., 2015; ISOLA et al., 1994; JANECKA; ADAMCZYK; GASIŃSKA, 2015; LIN et al., 2009; MUÑOZ-CADAVID et al., 2010; SARNECKA et al., 2019). Neste trabalho foi também testado o protocolo com corte de 16 µm de espessura como alternativa para a produção de amostras com menor quantidade de parafina, que apresenta inibidores de PCR, conforme descrito por Franck, Svoboda-Newman e Hsi (1996).

Alguns estudos descrevem a obtenção de alta concentração de DNA extraído de blocos parafinas, porém diferem em relação ao tipo de amostra clínica testada, tamanho do tecido emblocado em parafina, metodologia de extração e cortes histológicos (NAGAHASHI et al., 2017; NECHIFOR-BOILĂ et al., 2015; PATEL et al., 2016; SANTOS et al., 2009). Em um estudo de Nechifor-Boilă e colaboradores (2015), 100 ng/μl foi considerado um ponto de corte ideal para uma boa concentração de DNA em amostras FFEP de carcinomas (NECHIFOR-BOILĂ et al., 2015). Nosso estudo com amostras de biópsia de pele de cães e gatos com esporotricose mostrou uma grande variabilidade da concentração de DNA (0,1 a 178,2 ng/μl). Entretanto nossos dados corroboram com o estudo anterior de Nechifor-Boilă e colaboradores (2015), uma vez que validamos nossa PCR utilizando uma concentração de DNA de 100 a 120 ng/μl, como a ideal para a amplificação do nosso alvo de estudo

A pureza do DNA extraído pode ser avaliada através da razão da absorbância a 260 nm dividida pela leitura a 280 nm no espectrofotômetro, onde o DNA com melhor qualidade apresenta uma relação A_{260}/A_{280} nm entre 1,8 e 2,0. Valores dessa relação muito baixos indicam a presença de contaminantes, como proteínas e RNA, segundo dados de estudos apresentados pelo grupo Thermo Fisher Scientific (2010). Porém, não se sabe o grau de pureza ideal esperado em relação às amostras de lesões de *Sporothrix* spp. previamente fixadas em formalina e emblocadas em parafina. Alguns estudos utilizando diferentes tipos de tecidos FFEP e metodologias de extração demonstram que o grau de pureza do DNA varia nessas amostras, inclusive adotando diferentes critérios de intervalo de pureza de DNA (como 1,6 – 1,9, por exemplo) (NECHIFOR-BOILĂ et al., 2015; SARNECKA et al., 2019). Em nosso estudo com amostras clínicas, o maior grau de pureza foi observado nos tecidos FFEP de gatos utilizando o kit de extração química no corte de 16 μm (42.9%). Já nas amostras de *pellet* de cultura micológica, a pureza foi baixa em todos os cenários. As amostras FFEP utilizadas em nossos estudos são do período de 2009 a 2019, porém o período de estocagem dos blocos parafinados é sugerido por Nechifor-Boilă e colaboradores (2015) não influenciar na concentração e pureza do DNA.

Um fator importante deste trabalho foi a padronização da metodologia da PCR utilizando uma solução *master mix* para realização da mistura da PCR. Essa ferramenta facilita e agiliza a realização dos ensaios e o diagnóstico da esporotricose no laboratório clínico. Além disso, para as reações de amplificação, a concentração de DNA foi padronizada para obter uma concentração final de 100 a 120 ng de DNA.

A metodologia padrão de referência para o diagnóstico definitivo de *Sporothrix* spp. é a cultura fúngica, geralmente realizada através de biópsia de pele de lesões cutâneas (MORRIS-JONES, 2002). Caso a cultura não seja possível ou se tenha apenas amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina disponíveis, métodos moleculares podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica, como as reações de PCR (FRICKMANN et al., 2015). A reação da *nested* PCR é uma técnica que reduz a amplificação de regiões não específicas do DNA de interesse, aumentando a sensibilidade do ensaio, e é realizada por duas PCRs sucessivas (WANGER et al., 2017), sendo indicada para amplificar o DNA de amostras com baixa concentração, como em tecidos FFEP. Nesse estudo, a metodologia de *nested* PCR realizada foi similar à descrita por Hu et al. baseada na amplificação para a região 18S do RNA ribossomal (*ITS*), utilizando primers específicos para *Sporothrix* (HU et al., 2003). Uma metodologia de *semi-nested* PCR com alta sensibilidade e especificidade foi desenvolvida para o diagnóstico de esporotricose humana em tecidos emblocados em parafina utilizando novos *primers* baseados no estudo de Hu et al., porém foram analisados poucos casos e com carência de detalhes que dificultam sua reprodutibilidade (HAYASHI et al., 2019). No presente estudo, foram utilizados os mesmos conjuntos de *primers*, específicos para DNA de *Sporothrix*, descritos por Hu et al., que foram capazes de detectar esse fungo em amostras de FFEP.

Apesar dos resultados satisfatórios observados em nossos estudos, principalmente em relação à identificação molecular pela *nested* PCR, se faz necessária a busca por ferramentas para a obtenção de amostras FFEP com maior concentração e grau de pureza de DNA, como por exemplo, a coleta de um fragmento maior da biópsia das lesões de cães e gatos, a fim de obter maior carga fúngica nessas amostras, principalmente dos cães e ajustes nas metodologias de extração de DNA para reduzir inibidores e contaminantes.

Em nosso estudo de padronização das metodologias de extração de DNA, a *nested* PCR foi capaz de identificar em nível de gênero as espécies patogênicas de *Sporothrix* testadas (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*). Assim, devido a grande distribuição geográfica desse fungo, esse protocolo pode ser utilizado em qualquer região do mundo para o diagnóstico da esporotricose felina e canina em tecidos emblocados em parafina.

7 CONCLUSÕES

- A extração de DNA de tecidos FFEP de gatos e cães para detecção de *Sporothrix* foi descrita pela primeira vez;
- O protocolo de extração química utilizando o protocolo de 8 cortes histológicos de 5 µm de espessura apresentou melhor desempenho;
- O ensaio da *nested* PCR, utilizando *primers* específicos para o gênero *Sporothrix*, apresentou alta sensibilidade e especificidade para identificar esse fungo em amostras FFEP de *pellets* de fungos obtidos por centrifugação de cultura micológica (protocolo de extração química);
- As metodologias de extração de DNA e da *nested* PCR utilizadas apresentam grande potencial para serem aplicadas no diagnóstico da esporotricose felina e canina em amostras FFEP na rotina clínica.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Conclusão do desenvolvimento de novos marcadores moleculares espécie-específicos para identificação de *Sporothrix* sp.;
- Concluir a redação do artigo científico sobre a validação da metodologia de extração de DNA de *Sporothrix* a partir de tecidos parafinados desenvolvido neste estudo;
- Ingressar no curso de doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas (INI/Fiocruz) para o segmento dessa linha de estudo.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B. D.; PFALLER, M. A. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement 1, p. S15–S27, 2006.

ARENAS, R. **Micología Medica Ilustrada**. 5th ed. ed. Mexico city, Mexico: McGraw-Hill, 2014.

ARENAS, R.; MILLER, D.; CAMPOS-MACIAS, P. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 2, p. 177–179, fev. 2007.

BARONI, F.; CAMPOS, S.; DIREITO, G. A cat sporotrichosis case. **Rev Bra Med Vet**, v. 20, p. 25–27, 1998.

BARROS, M. B. DE L. et al. Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a Series of Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529–535, 2004.

BARROS, M. B. DE L. et al. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista panamericana de salud publica**, v. 27, n. 6, p. 455–60, 2010.

BARROS, M. B. DE L.; PAES, R. DE A.; SCHUBACH, A. O. **Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. Clinical microbiology reviews**, 2011.

BARTON ROGERS, B. et al. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 3, p. 541–548, 1990.

BASS, B. P. et al. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen? **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 138, n. 11, p. 1520–1530, 2014.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: A follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 28–33, 2014.

BERNHARDT, A. et al. Molecular identification of fungal pathogens in nodular skin lesions of cats. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 132–144, 2015.

BOECHAT, J. S. et al. Feline sporotrichosis: Associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 185–196, 2018.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: What are the options? **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 252–259, 2013.

CAO, W. et al. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded

tissues and buccal cells. **Cancer Detection and Prevention**, v. 27, n. 5, p. 397–404, 2003.

CHAVES, A. R. et al. Treatment abandonment in feline sporotrichosis - study of 147 cases. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 2, p. 149–153, mar. 2013.

COURA, R. et al. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 8, p. 894–895, ago. 2005.

CROTHERS, S. L. et al. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 249–259, 2009.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: Solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, n. 1907, p. 165–191, 2016.

DELLA TERRA, P. P. et al. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1–23, 2017.

DIAS, N. M. et al. **Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal** **Emerging Infectious Diseases**, out. 2011. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0737_article.htm>. Acesso em: 8 nov. 2018

DÍAZ, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, n. 2, p. 113–116, nov. 1989.

DO, H.; DOBROVIC, A. **Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization** **Clinical Chemistry** American Association for Clinical Chemistry Inc., 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421801/>>. Acesso em: 28 jan. 2021

DONADEL, K. W. et al. Esporotricose: revisão. **Anais Bras Dermatol**, v. 68, p. 45–52, 1993.

DONCZO, B.; GUTTMAN, A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 125–134, 2018.

FERNANDES, G. F. et al. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3–4, p. 445–449, 2011.

FRANCESCONI, G. et al. Comparative Study of 250 mg/day Terbinafine and 100 mg/day Itraconazole for the Treatment of Cutaneous Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 349–354, 2011.

FRANK, T. S.; SVOBODA-NEWMAN, S. M.; HSI, E. D. Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 5, n. 3, p. 220–224, set. 1996.

FREITAS, D.; M, M.; ZANI, N. L. Esporotricose : observação de caso espontâneo em

gato doméstico (*F. catus*). **Rev. Sao. Paulo. U. Fac. Med. Vet**, v. 5, p. 601–604, 1956.

FRICKMANN, H. et al. Detection of tropical fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: Still an indication for microscopy in times of sequence-based diagnosis? **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

GARCÍA CARNERO, L. et al. Immunity and Treatment of Sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 100, 2018.

GONSALES, F. F. et al. Direct PCR of lesions suggestive of sporotrichosis in felines. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 2002–2006, 2020.

GREMIÃO, I. D. F. et al. **Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects** *Medical Mycology*, 2014.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, 2017.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 26, n. 3, p. 621–624, 2020a.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020b.

HAYASHI, S. et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin-embedded skin tissue. **Mycoses**, v. 62, n. 12, p. 1148–1153, 21 dez. 2019.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*, a new pathogenic fungus. **J Experi Med**, p. 5:77-89, 1900.

HINRIKSON, H. P. et al. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2092–2103, 2005.

HU, S. et al. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1414–1418, abr. 2003.

ISOLA, J. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1301–1308, 1994.

JANECKA, A.; ADAMCZYK, A.; GASIŃSKA, A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 476, p. 8–10, 1 maio 2015.

KANBE, T. et al. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, n. 2, p. 99–106, 2005.

KANO, R. et al. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin

synthase 1 gene. **Mycoses**, v. 265, p. 261–265, 2001.

KANO, R. et al. Detection of *Sporothrix schenckii* chitin synthase 1 (CHS1) gene in biopsy specimens from human patients with sporotrichosis [3]. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, n. 1, p. 73–74, 2003.

KANO, R. et al. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 156, n. 15, p. 484–485, 2005.

KANO, R. et al. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. **Mycoses**, v. 58, n. 4, p. 220–224, abr. 2015.

KOKKAT, T. J. et al. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein. **Biopreservation and Biobanking**, v. 11, n. 2, p. 101–106, abr. 2013.

KOURKOUMPETIS, T. K. et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 9, p. 1322–1331, 2012.

LAU, A. et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify Fungal DNA in tissue specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 380–385, 2007.

LIN, J. et al. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. **Analytical Biochemistry**, v. 395, n. 2, p. 265–267, 2009.

LÓPEZ-ROMERO, E. et al. **Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem** *Future Microbiology* *Future Microbiol.*, jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21162638/>>. Acesso em: 2 ago. 2020

LUDYGA, N. et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. **Virchows Archiv**, v. 460, n. 2, p. 131–140, fev. 2012.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. **Rev Med S. Paulo**, v. 21, p. 433–450, 1907.

MACÊDO-SALES, P. A. et al. Coinfection of domestic felines by distinct *Sporothrix brasiliensis* in the Brazilian sporotrichosis hyperendemic area. **Fungal Genetics and Biology**, v. 140, n. October 2019, 2020.

MADRID, H. et al. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 3, p. 218–222, 30 set. 2009.

MADRID, I. M. et al. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 265–273, abr. 2012a.

MADRID, I. M. et al. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil.

Mycopathologia, v. 173, n. 4, p. 265–273, 6 abr. 2012b.

MARASCHIN, B. J. et al. Optimizing fixation protocols to improve molecular analysis from FFPE tissues. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 1, p. 82–84, 2017.

MARIA, R. et al. New Diagnostic Applications in Sporotrichosis. In: **Skin Biopsy - Perspectives**. [s.l.] InTech, 2011.

MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006a.

MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, set. 2006b.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621–625, set. 2008.

MENDOZA, M. et al. Evaluación de la técnica PCR anidada para el diagnóstico de la esporotricosis experimental. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 3, p. 120–125, jul. 2012.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3004–3011, 1 ago. 2002.

MEYER, K. F. The relation of animal to human sporotrichosis. **Journal of the American Medical Association**, v. LXV, n. 7, p. 579–585, 14 ago. 1915.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, P. N. 1. 27. D. 6 D. J. D. 2014. **Ministério da saúde**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.html>. Acesso em: 16 jan. 2021.

MIRANDA, L. H. M. et al. Histopathology of canine sporotrichosis: A morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). **Mycopathologia**, v. 168, n. 2, p. 79–87, 2009.

MIRANDA, L. H. M. et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 3, p. 408–411, 2011.

MIRANDA, L. H. M. et al. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 36, n. 4, p. 425–32, jul. 2013.

MONTENEGRO, H. et al. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 269, 19 dez. 2014.

MONTI, F. DOS S. **Abordagem diagnóstica e terapêutica da esporotricose em gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) na região metropolitana de Curitiba, PR.** Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2019.

MORRIS-JONES, R. **Sporotrichosis** *Clinical and Experimental Dermatology* Clin Exp Dermatol, , 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12372075/>>. Acesso em: 12 jul. 2020

MUÑOZ-CADAVID, C. et al. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2147–2153, 2010.

NAGAHASHI, M. et al. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. **Journal of Surgical Research**, v. 220, p. 125–132, 2017.

NECHIFOR-BOILĂ, A. C. et al. The storage period of the formalin-fixed paraffin-embedded tumor blocks does not influence the concentration and purity of the isolated DNA in a series of 83 renal and thyroid carcinomas. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 56, n. 2, p. 759–763, 2015.

OLIVEIRA, D. C. et al. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047–3049, ago. 2011a.

OLIVEIRA, M. M. E. DE et al. Sporotrichosis caused by *sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: Case report. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 359–363, 4 maio 2010.

OLIVEIRA, M. M. E. DE et al. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2159–2162, 2012.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* Isolates from an Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257–267, 2011b.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Molecular identification of the *sporothrix schenckii* complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 2–6, 2014.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Cerebrospinal fluid PCR: A new approach for the diagnosis of CNS sporotrichosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1–4, 1 jul. 2020.

OROFINO-COSTA, R. et al. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

PATEL, P. G. et al. Preparation of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Cores for both RNA and DNA Extraction. **Journal of Visualized Experiments**, n. 114, 21 ago. 2016.

PEREIRA, S. A. et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290–294, 6 mar. 2010.

PEREIRA, S. A. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220–223, abr.

2011.

PEREIRA, S. A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014.

PEREIRA, S. A. et al. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 311, 30 mar. 2018.

RAMESH, P. S. et al. DNA extraction from archived hematoxylin and eosin-stained tissue slides for downstream molecular analysis. **World Journal of Methodology**, v. 9, n. 3, p. 32–43, 2019.

RAMSEY, I. Infectious Diseases of the Dog and Cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 9, p. 488–488, 2008.

RASHMI, M. V.; HAMSAVEENA. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 37, n. 3, p. 247–251, 2015a.

RASHMI, M. V.; HAMSAVEENA. Haematological and biochemical markers as predictors of dengue infection. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 37, n. 3, p. 247–251, 31 jan. 2015b.

RIPPON, J. W. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. **W. B. Saunders Company**, v. 3rd ed. Ph, p. 325–352, 1988.

RODRIGUES, A. M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013.

RODRIGUES, A. M. et al. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant sporothrix species. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 5, 7 maio 2014.

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246–264, fev. 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, abr. 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2015.

SANTOS, S. et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 3, p. 421–426, 2009.

SARNECKA, A. K. et al. DNA extraction from FFPE tissue samples – a comparison of three procedures. **Wspolczesna Onkologia**, v. 23, n. 1, p. 52–58, 2019.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. **John Hopkins Hospital Bulletin**, v. 9, n. 93, p. 286–290, 1898.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. DE L.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 2008.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Record**, v. 152, n. 6, p. 172–175, 2003.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623–9, 2004a.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 6, p. 404–408, nov. 2004b.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 87–92, 2006.

SES-RJ, S. DO E. DE S.-R. DE J. Resolução SES Nº 674 DE 12/07/2013. 2013.

SILVA, M. B. T. DA et al. Esporotricose urbana: Epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, 2012.

SILVA, J. N. et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 880–884, 1 nov. 2015.

SILVA, J. N. et al. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 160, p. 72–78, 2018.

SONG, Y. et al. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 3, p. 313–318, mar. 2013.

SYKES, J. E. et al. Itraconazole for treatment of sporotrichosis in a dog residing on a Christmas tree farm. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1440–3, 1421, 1 maio 2001.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. **Nucleic Acid**, v. 11, p. 1–30, 2010.

VIANA, P. G. et al. Successful Treatment of Canine Sporotrichosis with Terbinafine: Case Reports and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 183, n. 2, p. 471–478, 2018.

WANGER, A. et al. Overview of Molecular Diagnostics Principles. **Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology**, p. 233–257, 2017.

WILLINGER, B. et al. Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p.

581–585, 1 fev. 2003.

WONG, S. Q. et al. Targeted-capture massively-parallel sequencing enables robust detection of clinically informative mutations from formalin-fixed tumours. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 13 dez. 2013.

XU, T. H. et al. Identification of *Sporothrix schenckii* of various mtDNA types by Nested PCR Assay. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 161–165, 2010.

ZHANG, Y. et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 1, 1 dez. 2015.

ZHANG, Z. et al. Variation in Genotype and Higher Virulence of a Strain of *Sporothrix schenckii* Causing Disseminated Cutaneous Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 439–446, dez. 2011.