

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA NATÁLIA GOMES LEITE

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Sporothrix*
spp. ISOLADOS DE FELINOS

PALOTINA

2022

MARIA NATÁLIA GOMES LEITE

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Sporothrix*
spp. ISOLADOS DE FELINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresenta
do ao Curso de Engenharia de Bioprocessos
e Biotecnologia
da Universidade Federal do Paraná como
requisito à obtenção do título de
obtenção do grau de Engenheira de
Bioprocessos e Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2022

*Aos meus pais, familiares e marido que me proporcionaram uma rede de apoio
e que acreditaram no meu potencial.*



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

Ata de Reunião

Aos dezesseis dias do mês de setembro do ano de 2022, às nove horas na Sala 11 do Bloco 3, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Caracterização Microbiológica e Molecular de *Sporothrix* spp. Isolados de Felinos" apresentado pela discente Maria Natália Gomes Leite, orientada pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Defesa Oral, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Defesa Oral, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki, nota 100 (cem), Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota 100: (cem), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 100 (cem). Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2022, às 09:27, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2022, às 09:27, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVIA CRISTINA OSAKI, PROFESSOR 3 GRAU**, em 26/09/2022, às 11:12, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4922756** e o código CRC **F04A8009**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter preparado esse caminho que tracei durante esses anos e por ter me iluminado e cuidado de mim enquanto tomava as decisões importantes para a minha vida.

Aos meus pais, Regina Gomes da Silva Leite e João Donizete Carneiro Leite que me apoiaram e me deram total estrutura ao longo dos anos. Agradeço pela confiança que colocaram em mim, além de todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse ter a melhor educação possível e pelo apoio para a construção da minha vida profissional.

Ao meu marido, Leonardo Prudêncio de Lima que sempre esteve ao meu lado e que me impulsiona para buscar sempre a melhor decisão para a minha carreira profissional. Seu apoio e amor me sustentaram durante todos os anos que fiquei afastada de todos os meus familiares e amigos de Itu - SP para seguir os meus sonhos acadêmicos.

Também agradeço aos meus amigos de Palotina - PR, em especial ao Acacio Batista, Ana Carolina Bertoli, Daniele Kitzberger, Francielli Assis, Giovana Martins, Nathalia Rodrigues Soares e Pedro Mattiuzzi que formaram uma rede de apoio. Agradeço por todos os momentos que tivemos juntos e que ficaram para sempre marcados no meu coração.

Em especial agradeço à Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado e ao Prof. Dr. Fabio Rogerio Rosado que durante toda a minha graduação acreditaram no meu potencial e me ensinaram com muita dedicação todas as técnicas que aprendi nos laboratórios. Vocês me inspiram para aprofundar os meus conhecimentos e também na minha carreira acadêmica, espero um dia ter um pouco do reconhecimento e importância que vocês transmitem. Agradeço à Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado por ter aceitado o meu convite para ser minha orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso, não vejo uma melhor forma de finalizar a minha graduação.

RESUMO

A esporotricose é uma infecção que acomete animais, principalmente felinos, e humanos. Essa micose apresenta como sinais clínicos, em felinos, lesões cutâneas se disseminando principalmente na região nasal e na face, já em humanos ocorre a formação de lesões cutâneas fixas. A infecção é causada pelo fungo *Sporothrix* spp. que apresenta dimorfismo e características macroscópicas variadas, pois é um gênero que apresenta inúmeras espécies. O presente trabalho teve como objetivo principal, realizar a caracterização fenotípica e genotípica dos três isolados fúngicos de amostras coletadas de felinos que apresentaram diagnóstico clínico sugestivo para esporotricose, além disso são discutidos os principais desafios da identificação laboratorial desse agente. Duas amostras foram coletadas na cidade de Guaíra - PR e a terceira em Palotina - PR. Para a caracterização fenotípica, os fungos foram cultivados em ágar micobiótico, para observação das características das colônias e a micromorfologia foi realizada após microcultivo em lâmina. A identificação molecular foi realizada para uma das amostras, após extração do DNA utilizando kit *Plant/Fungi DNA Isolation kit (Norgen)*, por meio do sequenciamento da região do espaçador transcrito interno da região do gene ribossomal rDNA ITS1-4. Todos os isolados apresentaram colônias secas, sendo duas de coloração creme e um de coloração acastanhada. Nenhum dos isolados apresentou dimorfismo pela conversão da forma micelial para levedura, utilizando ágar micobiótico, nas temperaturas de 25 e 37°C. Porém, quando as amostras foram cultivadas, em caldo BD e posteriormente semeadas em ágar micobiótico, foi possível observar a formação de colônias isoladas, ainda com coloração creme e aspecto seco. Não foi possível confirmar a ocorrência da transição micélio-levedura apenas com a análise macromorfológica e novos testes com outros meios de cultura deverão ser realizados, além da micromorfologia da cultura. Com a análise microscópica foi possível confirmar o gênero, pela observação de hifas finas e presença de conídios ovalados, organizados no topo de conidióforos, característicos do gênero. Para o sucesso na amplificação por PCR, foi necessário realizar uma precipitação com acetato de potássio 3M, para eliminar possíveis contaminantes e concentrar as amostras. O sequenciamento resultou em uma sequência de apenas 181 pb, comparando com o tamanho do *amplicon*, que foi de aproximadamente 600 pb o que não interferiu no resultado da comparação com sequências depositadas no GenBank. A amostra identificada apresentou 93% de similaridade com *Sporothrix brasiliensis*, espécie mais comumente isolada no Brasil. Os resultados apresentados nesse trabalho são importantes para contribuir com estudos epidemiológicos da esporotricose na região do Oeste do Paraná e para a conduta terapêutica dos animais, mas será igualmente útil como um guia para caracterização microbiológica e molecular do agente fúngico para futuros trabalhos.

Palavras-chave: Esporotricose. *Sporothrix*. Caracterização fenotípica e genotípica.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an infection that affects animals, mainly felines and humans. In felines the clinical signs of the disease are skin lesions that spread mainly in the nasal region and face. However, in humans, fixed skin lesions occur. The fungi from the genus *Sporothrix spp.* cause the infection and present dimorphism and diverse macroscopic characteristics. The main goal of this work was to carry out the phenotypic and genotypic characterization of three fungi isolates from samples collected from felines with suggestive clinical diagnosis of sporotrichosis, besides the discussion of the main challenges of the laboratory identification of this agent. Two samples were collected in the city of Guaíra and the third was collected in Palotina, both located in the state of Paraná, Brazil. For phenotypic characterization, the fungi were cultured on mycobiotic agar to observe the characteristics of the colonies. The micromorphology was performed after microculture on a slide. Molecular identification was performed for one of the samples, after DNA extraction using a kit *Plant/Fungi DNA Isolation kit (Norgen)*, through the sequencing of the internal transcribed spacer region of the rDNA ITS1-4 ribosomal gene region. All isolates showed dry colonies, two of which were cream colored and one brownish. None of the isolates showed dimorphism by the conversion of the mycelial form to yeast, using mycobiotic agar at temperatures of 25 and 37 °C. However, when the samples were cultured in PD broth and later seeded on mycobiotic agar, we observed the formation of isolated colonies, still cream-colored and with dry appearance. It was not possible to confirm the occurrence of mycelium-yeast transition only with macromorphological analysis. Future tests with other culture media should be performed, in addition to the micromorphology of the culture. The microscopic analysis confirmed the genus through the observation of thin hyphae and the presence of oval conidia, organized on top of conidiophores. For success in PCR amplification, it was necessary to perform a precipitation with potassium acetate to eliminate possible contaminants and concentrate the samples. The sequencing resulted in a sequence of only 181 bp compared to the size of the amplicon, which was approximately 600 bp and did not interfere with the result of the comparison with sequences deposited in GenBank. The identified sample showed 93% similarity with *Sporothrix brasiliensis*, which is the most commonly isolated species in Brazil. The results presented in this work contribute to epidemiological studies of sporotrichosis in the western region of the state of Paraná and to the therapeutic conduct of animals, as well as being a useful guide for microbiological and molecular characterization of the fungal agent for future works.

Keywords: Sporotrichosis. *Sporothrix*. Phenotypic and genotypic characterization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01 - MACROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS 01, 02 e 03 DE <i>Sporothrix</i> spp. AMOSTRAS CULTIVADAS À 25°C E 37°C	28
FIGURA 02 - ASPECTO DA CULTURA DE <i>Sporothrix</i> spp. EM MEIO BD	30
FIGURA 03 - MICROCULTIVO EM LÂMINA.....	30
FIGURA 04 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DA AMOSTRA 01	31
FIGURA 05 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DA AMOSTRA 02	31
FIGURA 06 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DA AMOSTRA 03	32
FIGURA 07 - ELETROFORESE GEL DE AGAROSE DA AMPLIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR DA REGIÃO ITS1-4 DA AMOSTRA 1.....	34
FIGURA 08 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO ITS1-4 DO ISOLADO 01 ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLASTn (NCBI).....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	33
TABELA 02 - QUANTIFICAÇÃO DNA AMPLIFICADO (PCR) APÓS PRECIPITAÇÃO.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	TAXONOMIA E ESPÉCIES DE <i>Sporothrix spp.</i>	15
3.2	ETIOPATOGENIA	16
3.3	ASPECTOS CLÍNICOS	17
3.4	DIAGNÓSTICO	18
3.4.1	Diagnóstico Micológico (microscopia direta e cultura).....	18
3.4.2	Diagnóstico Sorológico.....	20
3.4.3	Diagnóstico Molecular	20
3.5	TRATAMENTO.....	21
4	METODOLOGIA	23
4.1	FONTE DE AMOSTRAS	23
4.2	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS	23
4.2.1	Cultura fúngica	23
4.2.2	Microcultivo em lâmina	24
4.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS	25
4.3.1	Extração de DNA.....	25
4.3.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região ITS.....	25
4.3.3	Eletroforese em Gel de Agarose	26
4.3.4	Concentração dos produtos de amplificação.....	26
4.3.5	Sequenciamento da região ITS1-4.....	26
5	RESULTADOS	28

5.1	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS.....	28
5.1.1	Características macroscópicas.....	28
5.1.1.1	Cultivo dos fungos em Meio Líquido BD.....	29
5.1.2	Características microscópicas.....	30
5.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS.....	32
5.2.1	Qualidade do DNA extraído.....	32
5.2.2	Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).33	
5.2.3	Alinhamento da sequência ITS do isolado 01 com a sequência de maior homologia depositada no GenBank.....	34
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores populações de gatos do mundo, cerca de 24 milhões de indivíduos. Os gatos são animais que apresentam certa independência e que não necessitam de tanta companhia igual a outros animais domésticos, sendo assim atualmente estão tornando-se os animais domésticos preferidos em residências com espaço reduzido (GENARO, 2010).

Os gatos são animais que normalmente apresentam uma maior probabilidade de estarem circulando pelas ruas com condições precárias em relação à saúde, entretanto essa condição é vista pelos humanos como comum para os gatos que ao retornarem para a residência podem carrear zoonoses. Dentre essas zoonoses destaca-se a esporotricose, uma infecção causada pelo fungo *Sporothrix* spp. (GENARO, 2010). Esses animais domésticos quando apresentam esse acesso livre às ruas contribuem para a proliferação da esporotricose, já que o fungo *Sporothrix* spp. é aderido nas unhas e nas cavidades oral dos gatos. *Sporothrix* spp. são fungos dimórficos encontrados em regiões tropicais e subtropicais no solo e vegetação, nos animais são encontradas em forma de leveduras alongadas (PADILHA, 2015).

A esporotricose é uma micose que causa lesões cutâneas podendo se desenvolver para úlceras, e em alguns casos essas áreas afetadas podem apresentar necrose (BISON, 2020). Já em humanos, a esporotricose ocorre de forma isolada em indivíduos que tiveram contato com solos e plantas contaminadas ou por arranhões causados por gatos que apresentam a infecção por esporotricose ou até mesmo contato direto das lesões (OLIVEIRA, 2011).

O padrão ouro para o diagnóstico decisivo da esporotricose é a cultura micológica. Para os felinos essa técnica é eficiente, pois as lesões cutâneas apresentam uma elevada concentração de células fúngicas permitindo que o crescimento do fungo na placa com meio de cultivo se desenvolva. Entretanto, para lesões humanas essa técnica não é eficiente, pois não possuem a quantidade necessária de carga fúngica. Sendo assim, o cultivo do material coletado das lesões da esporotricose apresenta uma maior sensibilidade, apesar do resultado negativo não dispensar a esporotricose, embora em algumas regiões do Brasil essa infecção seja subdiagnosticada e negligenciada pelos médicos veterinários levando a um difícil tratamento e prevenção (RODRIGUES, 2020).

A identificação fenotípica de diferentes espécies de *Sporothrix* tem, como desvantagem, o uso de métodos demorados, trabalhosos e com resultados variáveis. O desenvolvimento de métodos de identificação molecular e genotipagem rápidos e de baixo custo são importantes para o diagnóstico, bem como para estudos epidemiológicos, considerando que as espécies patogênicas do *Sporothrix* diferem em termos de sua distribuição geográfica, virulência e suscetibilidade a antifúngicos (OROFINO-COSTA et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização fenotípica e genotípica de isolados com cultura positiva para *Sporothrix* spp., isolados de felinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfologia da colônia desses isolados;
- Caracterizar o aspecto microscópico dos isolados;
- Confirmar o gênero e identificar, no nível de espécie, utilizando o sequenciamento da região do rDNA ITS;
- Discutir os principais desafios da identificação laboratorial de *Sporothrix* spp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TAXONOMIA E ESPÉCIES DE *Sporothrix* spp.

O gênero *Sporothrix* spp. pertence à classe Sordariomycetes do filo Ascomycota, grupos de fungos terrestres, patógenos de invertebrados, vertebrados e até de plantas. Os fungos pertencentes a esse gênero podem manter uma relação de mutualismo, parasitismo e comensalismo com insetos. Por esse gênero apresentar inúmeras espécies de *Sporothrix*, podem ser encontrados em animais, seres humanos e no meio ambiente (RODRIGUES et al., 2020).

Os fungos do gênero *Sporothrix* possuem ampla diversidade genômica e há descrição de pelo menos sete espécies consideradas como agentes da infecção. *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* são as espécies que possuem mais relação com as infecções. Em contrapartida, *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis* são as espécies mais comumente encontradas no ambiente e geralmente não possuem relação com as infecções diagnosticadas (CHAKRABARTI et al., 2015). As espécies de *S. schenckii* e *S. globosa* são as que apresentam relatos de infecção causadas a partir de fontes ambientais. Existe a ocorrência de infectados por *S. schenckii* em zonas rurais (BARROS et al., 2001). As espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* já foram isoladas no Brasil (RODRIGUES et al., 2014).

A transmissão da esporotricose em gatos ou em humanos, causadas por arranhões ou mordidas de gatos infectados, é mais comumente causada pelo *S. brasiliensis*. Em 2007, ao fazer análises Marimon e colaboradores demonstraram que todas as amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro pertenciam à espécie *S. brasiliensis*. Apesar dessa espécie apresentar mais incidência no Brasil, outras espécies do gênero estão presentes em território brasileiro.

Um estudo realizado por Bento et al. (2021) de 122 casos de esporotricose diagnosticada na região Nordeste do Brasil apresentaram, por meio de diagnóstico por PCR, 71 resultados identificados como o *S. brasiliensis* sendo o agente infeccioso. Desses 122 casos, 115 relataram que tiveram contato com felinos que foram acometidos com a infecção.

Esporotricose já foi descrita em humanos e em várias espécies animais que incluem gatos, cães, ratos, tatus, equinos (TÉLLEZ et al., 2014), asininos, bovinos,

caprinos, suínos, hamsters, camelos, chimpanzés e aves domésticas (GINN et al., 2007), mas é diagnosticada com maior frequência em gatos (LACAZ, 2002). A esporotricose transmitida por gatos causada pelo *S. brasiliensis* é uma micose negligenciada endêmica no Brasil e é uma zoonose frequentemente relatada nas regiões sul e sudeste há quase 21 anos (LOPES-BEZERRA et al., 2018).

3.2 ETIOPATOGENIA

A esporotricose é uma doença causada pelos fungos do gênero *Sporothrix* predominantemente em áreas tropicais e subtropicais. Trata-se de uma micose subcutânea e vasos linfáticos adjacentes, raramente o seu desenvolvimento pode acometer o sistema nervoso central, ossos, articulações, pulmões e coração em animais e seres humanos (BARROS, 2010).

A patogênese da doença depende do tipo da espécie de *Sporothrix* que é transmitida, pelas quantidades dos morfotipos celulares (conídios e/ou leveduras) que são inoculados, além do tipo do inóculo. A gravidade do quadro clínico de cada espécie está diretamente relacionada com as características do patógeno quanto a sua virulência e ao estado imunológico do hospedeiro. *Sporothrix brasiliensis* é uma das espécies mais virulentas quando comparadas com as demais espécies, enquanto a *Sporothrix globosa* apresenta pouca virulência (CASTRO et al., 2013).

Existem sete espécies de fungos do gênero *Sporothrix* que são agentes responsáveis pela esporotricose. No Brasil, estudos demonstraram que o *Sporothrix brasiliensis* é uma espécie associada aos casos de felinos infectados (RODRIGUES et al., 2020). Os fungos *Sporothrix* spp. são dimórficos que em temperatura ambiente (25° - 30°C) estão na sua forma filamentosa e leveduriforme em cultivos com temperatura de 37°C. As colônias na forma filamentosa apresentam uma coloração branca no início do seu crescimento que aos poucos vão adquirindo uma coloração marrom a preta por meio do crescimento de conídios escuros, apesar de algumas espécies apresentarem essa coloração mais escura desde o início. Em relação a suas estruturas microscópicas, apresentam hifas septadas e conídios unicelulares. Já em sua forma de levedura as colônias apresentam uma coloração bege e um aspecto cremoso. Estruturalmente são leveduras unicelulares podendo ser ovaladas ou globulares e possuem brotamentos (FREITAS, 2014).

A infecção por *Sporothrix* spp. pode ocorrer ao se ter o contato com as hifas do patógeno que estejam no ambiente, entretanto a transmissão da doença de um animal para o outro ocorre por meio da inoculação direta das células em sua forma leveduriforme, sendo assim essa é a forma mais transmissível quando comparada com a forma micelial (RODRIGUES et al., 2013).

Por se tratar de uma infecção que apresenta uma disseminação rápida, o atraso de um diagnóstico preciso e de um tratamento eficaz em felinos pode causar um aumento no número de casos em humanos, principalmente em áreas que não apresentam um saneamento básico e um serviço de saúde adequado (RODRIGUES et al., 2013).

3.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Os gatos são os animais domésticos mais afetados pela esporotricose, cujo principal sinal clínico está no desenvolvimento de ulcerações cutâneas, podendo se manifestar como uma simples e única lesão na pele ou de forma disseminada, em quadros sistêmicos afetam principalmente o sistema respiratório podendo levar o animal ao óbito. A exposição desse animal ao agente se dá por meio do hábito em arranhar troncos de árvores, enterrar suas fezes, lambedura de seu corpo, conseqüentemente abrigando o fungo em sua cavidade oral e unhas. No tecido subcutâneo humano e de outros animais ocorre a implantação traumática do fungo pelo felino, este por sua vez também manifesta os sinais clínicos da doença, em sua maioria na forma cutânea disseminada (RODRIGUES et al., 2013).

Em humanos a esporotricose se manifesta, em sua maioria, em sua forma linfocutânea associada com a forma cutânea fixa. A esporotricose linfocutânea apresenta nódulos ao longo do sistema linfático que ao se desenvolverem surgem úlceras que fistulam, principalmente nas regiões dos membros. Já a esporotricose cutânea fixa se caracteriza um por única lesão na pele o que dificulta no diagnóstico da infecção, já que essas lesões se assemelham com as de outras doenças como, por exemplo, leishmaniose cutânea e lúpus. Entretanto, essas manifestações da esporotricose dependem da quantidade do inóculo e a sua condição, ou seja, conídios ou leveduras, mas depende também da situação do indivíduo afetado, se apresenta alguma deficiência imunológica (RODRIGUES et al., 2020).

3.4 DIAGNÓSTICO

A esporotricose pode ser diagnosticada por meio de uma combinação de manifestações clínicas e epidemiológicas e exames laboratoriais, incluindo exame direto, cultura, exames histopatológicos, detecção molecular, testes cutâneos de esporotriquina e detecção de anticorpos. Dependendo da progressão da lesão, é difícil detectar as células de levedura por exame direto, provavelmente porque são muito pequenas (2 a 6 μm de diâmetro), mas podem ser observadas no tecido por exame histopatológico (LOPES-BEZERRA et al., 2018). No entanto, nem o exame direto nem o exame histopatológico são capazes de identificar o patógeno no nível da espécie. A cultura, obtida de material ativo como lesões, pus, secreções ou biópsias, ainda é considerada um padrão ouro no diagnóstico, seguida ou não por caracterização por métodos moleculares (ZHANG et al., 2019).

3.4.1 Diagnóstico Micológico (microscopia direta e cultura)

Amostras para cultura fúngica podem ser obtidas por exsudato de lesão de pele ou secreções de mucosa coletadas com *swab* estéril, bem como biópsias de lesões, aspirados de linfonodo e fragmentos de órgãos coletados durante a necropsia. No caso de animais, amostras de unhas e cavidade oral também são utilizadas.

Idealmente, as amostras clínicas devem ser semeadas o mais rápido possível nos meios de cultura apropriados para o isolamento do fungo, mas, se não for possível, as amostras podem ser coletadas com o auxílio de *swabs*, e é recomendado que sejam armazenados em *Stuart Transport Medium* para uma melhor preservação da clínica para o laboratório (GREMIÃO et al., 2021). A utilização de solução salina é recomendada para o armazenamento de fragmentos de biópsias de pele. Se a cultura imediata for impossível, as amostras devem ser armazenadas a 4°C por não mais que 8–10 h (SCHUBACH et al., 2012).

O diagnóstico da esporotricose muitas vezes é realizado na própria clínica, por meio de microscopia direta das lesões. Comparado à cultura, a microscopia direta apresenta baixa sensibilidade e especificidade (MAHAJAN, 2014). Por outro lado, comparando a microscopia direta em amostras humanas e animais, ela é mais sensível em animais, principalmente felinos, devido à grande quantidade de células fúngicas nos tecidos, exibindo sensibilidade de quase 85% (SILVA et al., 2015).

Ocasionalmente, ao se preparar uma lâmina com a técnica de esfregaço podem ser vistas formas leveduriformes cercadas por um halo claro, ovais a redondas e mais comumente alongadas, “em forma de charuto”, medindo aproximadamente 5-8 mm (DE HOOG e GUARRO, 1995). Ao se realizar um cultivo do fungo em ágar-Sabouraud com antibióticos como cloranfenicol ou gentamicina para inibir o crescimento de bactérias, surge o aparecimento de colônias em três a cinco dias, em 28°C para amostras coletadas de lesões de pele, porém esse período pode se estender a quatro semanas, dependendo da espécie (PAPPAS et al., 2000). Após cultura em ágar Sabouraud, colônias hialinas filamentosas começam a crescer e depois desenvolvem uma cor escura, especialmente no centro das colônias. As culturas positivas fornecem uma forte evidência de esporotricose, e isolados obtidos da cultura podem ser testados quanto à suscetibilidade antifúngica, fenotípica e caracterização (HEKTOEN & PERKINS, 1990).

O ágar Mycosel ou ágar fungibiótico, é recomendado para ser utilizado na cultura primária, pois contém cicloheximida, um agente que inibe o crescimento de fungos saprofíticos. Também se pode utilizar o meio BHI (Brain Heart Infusion), para o enriquecimento da cultura (MORIS-JONES, 2002). O exame microscópico da cultura cultivada em temperatura ambiente revela a forma micelial do fungo “com hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas com conídios unicelulares ovais ou piriformes dispostos ao longo da hifa com aparência de cachos ou buquê” (FREITAS, 2014, p.24).

O isolamento e a cultura do agente causador da esporotricose a partir de exames amostras clínicas é considerado um método diagnóstico simples, embora possa não ser útil para algumas formas sistêmicas e atípicas de esporotricose (LOPES-BEZERRA et al., 2006; DE MACEDO et al., 2015). No entanto ainda há dificuldades durante o isolamento e correta identificação dos fungos em cultura.

3.4.2 Diagnóstico Sorológico

Um diagnóstico sorológico da esporotricose não é utilizado usualmente, apesar de apresentar uma certa eficácia, já que seu resultado positivo é insinuante, mas não confirma realmente se o indivíduo está com esporotricose. Sendo assim, é recomendado o diagnóstico sorológico para casos em que há lesões cutâneas externas ou para casos no qual a coleta para um diagnóstico micológico não é acessível. Esse diagnóstico é realizado pelas seguintes técnicas: ELISA, imunodifusão dupla e imunofluorescência direta. Por meio da ELISA (ensaio imunoenzimático), que detecta anticorpos IgG contra um antígeno purificado de *Sporothrix* spp., pode se obter um diagnóstico mais preciso do que as outras técnicas, pois apresenta uma alta sensibilidade, entretanto em alguns casos raros podem apresentar uma reação cruzada com o soro de indivíduos acometidos com a leishmaniose (FREITAS, 2014).

3.4.3 Diagnóstico Molecular

Com o desenvolvimento da biologia molecular, um número crescente de métodos baseados em análise do material genético tem sido aplicado para o diagnóstico rápido de agentes causadores de doenças infecciosas. Os testes de diagnóstico molecular incluem sequenciamento genético, Nested-PCR, RFLP (Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PCR usando primers espécie-específicos, PCR-Multiplex, para analisar coinfeções, dentre outros (ZHANG et al., 2019). A maioria deles só consegue identificar isolados a partir da cultura, e apenas alguns métodos foram avaliados com amostras clínicas (HU et al., 2003; XU et al., 2010).

A PCR é considerada uma técnica para um diagnóstico rápido e preciso, pois, apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade às amostras, além de não apresentar reações cruzadas com outros fungos presentes nas amostras, principalmente das retiradas das lesões cutâneas dos felinos (KANO et al., 2005). A PCR pode ser realizada pela amplificação e sequenciamento parcial do operon ribossômico, incluindo as regiões ITS1, 5.8s e ITS2. O ITS (Espaçador Interno Transcrito de genes ribossomais), funciona como um marcador universal para a

identificação de *Sporothrix* spp. As espécies mais frequentemente isoladas de animais e seres humanos estão distribuídas nos clados *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*. Portanto, é importante que, além da região ITS, outras regiões sejam sequenciadas, como genes que codificam proteínas como a beta-tubulina (*BT2*), calmodulina (*CAL*) e o fator de alongamento 1 α (*EF-1 α*), para melhorar as resoluções taxonômicas. A região entre os éxons três e cinco do gene da calmodulina aparecem como o principal marcador de reconhecimento de interesse clínico de *Sporothrix* (KANO et al., 2015). No entanto, as espécies ambientais de *Sporothrix* apresentam entre si uma distância filogenética relativamente grande e é recomendado que, além da região ITS, sejam utilizados outros marcadores moleculares, codificantes de proteínas como já citado (*BT2*, *CAL* e *EF-1 α*) principalmente para espécies raras como o complexo *S. pallida* (*S. pallida*, *S. mexicana*, e *S. chilensis*).

Para analisar a variabilidade inter e intraespecífica, a técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) é realizada primeiramente amplificando uma sequência alvo no genoma do fungo por meio de PCR, seguido de digestão do amplicon com uma ou uma combinação de enzimas de restrição (RFLP), e tem sido usada com sucesso para detectar várias espécies fúngicas. A identificação de espécies de *Sporothrix* que apresentam semelhanças morfológicas pode ser realizada com o uso dessa técnica. Após a amplificação parcial da do exon 3-5 do gene da calmodulina, realiza-se a clivagem do amplicon com a enzima de restrição *HhaI*, produzindo cinco perfis de restrição diferentes (específicos da espécie), representando todas as espécies de importância médica (RODRIGUES et al., 2014). As vantagens desta técnica incluem baixo custo, execução rápida e fácil, associada à ausência de necessidade de instrumentos avançados.

3.5 TRATAMENTO

O tratamento para a esporotricose depende da situação do indivíduo infectado e das condições das lesões. O tratamento mais recomendado é com o uso de iodeto de potássio com a adição do itraconazol, para a infecção na forma cutânea e linfática, pois o iodeto de potássio tem o potencial de inibir o desenvolvimento de biofilme das leveduras de *Sporothrix* spp. (GREMIÃO et al., 2015). Apesar de ser um tratamento eficiente tanto para os felinos quanto para os humanos, os felinos apresentam uma sensibilidade ao iodeto de potássio, sendo assim nesses casos recomenda-se o uso

do iodeto inorgânico, mas principalmente do itraconazol. Todos os medicamentos devem ser utilizados até 30 dias depois da cicatrização total das lesões e os exames apresentarem um resultado negativo, se não forem seguidas essas orientações o caso clínico do indivíduo pode agravar retardando o processo de cura (RHODES, 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 FONTE DE AMOSTRAS

Foram analisadas três amostras durante a pesquisa. A amostra 01 e 02 foram gentilmente cedidas pela equipe de pesquisa do Laboratório de Saúde Única, da UFPR-Setor Palotina, sob supervisão da Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki, as quais foram coletadas de lesões de gatos domésticos da cidade de Guaíra - PR que apresentavam possíveis sinais clínicos de esporotricose. A cultura das amostras foi realizada no dia seguinte da coleta e estavam acondicionadas em tubos de vidro com salina estéril (NaCl 0,85). Já a amostra 03 foi cedida por uma médica veterinária de uma clínica particular da cidade de Palotina-PCR, coletada de um felino doméstico, que teve diagnóstico sugestivo de *Sporothrix* spp., pela técnica de *imprint* citológico (comunicação pessoal). A cultura dessa amostra foi realizada no mesmo dia da coleta, a partir de *swab* obtido da lesão, acondicionado em meio de transporte do tipo Stuart.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.2.1 Cultura fúngica

A cultura fúngica foi realizada em meio ágar Micobiótico Seletivo, a partir dos *swabs* coletados dos animais, exceto para a mostra 01, em que o agente fúngico já tinha sido previamente isolado pela equipe do Laboratório de Saúde Única. O ágar Micobiótico contém cicloheximida, que inibe o crescimento de fungos saprófitos e cloranfenicol, para inibir o crescimento de bactérias. Esse meio nutritivo é preparado com a adição de 35,5 gramas da mistura em 1L de água destilada, em seguida o meio de cultura é autoclavado por 20 min à 1 atm e 121°C. Foram utilizadas placas descartáveis e estéreis (60 x 15 mm) para o acondicionamento do meio de cultura.

O material contido no *swab* de coleta foi depositado em duas placas com o meio de cultivo, essas foram incubadas em estufas com temperaturas distintas, 25°C e 37°C, pois o fungo *Sporothrix* spp. apresenta dimorfismo, sendo assim foi feito esse crescimento no mesmo meio, para analisar as diferenças morfológicas que a colônia pode apresentar.

Para verificar a conversão da forma micelial para levedura, após obtenção das culturas em ágar Micobiótico, os isolados foram cultivados em caldo BD (Batata

Dextrose). O meio foi preparado adicionando 140 g de batata cozida por 15 minutos em 1L de água destilada. O caldo foi filtrado em papel filtro e adicionado 4% de glicose (dextrose). Foram utilizados frascos Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, para a adição de 100 mL do meio de cultura. Em seguida, o meio nutritivo foi autoclavado por 20 min à 1 atm e 121°C.

Foi inoculado nos frascos um fragmento de aproximadamente 1x1 (cm) da colônia previamente isolada e o meio foi incubado à 37°C com uma rotação constante de 100 rpm. Após seis dias, o meio de cultivo apresentou um aspecto turvo, indicando o crescimento das amostras na forma de levedura.

Com auxílio de uma alça de platina a solução líquida foi semeada no ágar Micobiótico Seletivo e novamente incubada à 37° C.

4.2.2 Microcultivo em lâmina

Para a realização da técnica de microcultivo foi adicionado, ao centro de uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril, um cubo de ágar Micobiótico. Uma segunda lâmina foi utilizada como suporte, posicionada abaixo da lâmina de microcultivo. Fragmentos de micélios de culturas fúngicas obtidos de um repique recente foram semeados nos quatro lados do cubo de ágar e posteriormente recobertos com uma lamínula esterilizada. Em seguida, foi adicionado de 1 a 2 ml de água destilada estéril no fundo da placa, que já continha papel filtro esterilizado, para formar uma câmara úmida e evitar dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. As placas foram tampadas e mantidas a 28°C por três dias. Após a cultura, a lamínula foi removida com auxílio de uma pinça, para que ficassem aderidas as hifas e esporos do fungo. Foi utilizado o corante lactofenol azul algodão para a coloração da amostra e as estruturas fúngicas observadas sob microscopia óptica com o aumento de 400x.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.3.1 Extração de DNA

Primeiramente uma colônia isolada das amostras 01, 02 e 03 foi retirada do meio de cultivo, sem fragmento do ágar, para reduzir contaminantes na amostra. Esse micélio separado foi macerado com auxílio de nitrogênio líquido, para que ocorra um rompimento mecânico da parede celular. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit *Plant/Fungi DNA Isolation Kit* (Norgen). Esse material macerado foi dividido em amostras com 0,2 gramas de micélio em diferentes tubos e em cada tubo foram adicionadas 5 pérolas de vidro, dessa forma seguindo as etapas do protocolo de extração do kit.

Após a extração, o DNA extraído foi quantificado e avaliado quanto à sua pureza e concentração em espectrofotômetro 2000® (Thermo Fisher), observando-se a absorbância a 260 e 280 nm, além das relações 260/280 nm e 260/230 nm. Para a remoção de possíveis contaminantes que pudessem interferir na reação de PCR, o DNA extraído foi precipitado adicionando acetato de potássio 3M (10% do volume da amostra) e adição de etanol absoluto gelado (dobro do volume). As amostras foram precipitadas por 1 hora a -20°C, posteriormente centrifugadas a 13000 rpm por 10 min e secas a 40°C. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 50 µl de água ultrapura.

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região ITS

O protocolo de PCR utilizado seguiu a recomendação do kit *GoTaq Master Mix* (Promega), com modificações. A região do espaçador transcricional interno (ITS1-4) do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (MIRHENDI *et al.*, 2006) foi amplificada, por PCR, em uma reação de 25 µl contendo aproximadamente 150 ng do DNA genômico, 0,4 µM do iniciador *forward* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e do iniciador *reverse* ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0,8 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂ e 1 U de *GoTaq DNA Polimerase* no tampão apropriado da enzima. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; com extensão final a 72°C por 7 minutos, em termociclador.

4.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Um total de 2 µl das reações de PCR foram aplicadas nos poços de um gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio, para confirmação do tamanho, em pares de bases dos *amplicons* e qualidade das amostras. A amplificação da região ITS, com os primers utilizados nesse trabalho, produz um *amplicon* de aproximadamente 600 pb. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen TM). Após a corrida eletroforética (corrente constante de 80 mA por cerca de 45 minutos, com o tempo variando conforme o tamanho do gel), o gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento Locus Biotecnologia L.PIX.

4.3.4 Concentração dos produtos de amplificação

Após a PCR todos os tubos da mesma amostra foram vertidos em um único tubo para que o volume somatório fosse medido. Em seguida é adicionado acetato de potássio, sendo 10% do volume medido, agitando constantemente a mistura. Em seguida, é adicionado etanol absoluto gelado, o dobro do volume da mistura, agitar e condicionar a -20°C por uma hora. Após a refrigeração centrifugar as amostras a 12000 rpm por 10 minutos. Ao finalizar a centrifugação as amostras devem ser secadas em uma estufa a 50°C para que possam ser ressuspensas em 50 µl de *elution buffer*, ou seja, em um volume menor para que o DNA amplificado esteja em uma concentração maior do que a inicial.

4.3.5 Sequenciamento da região ITS1-4

Uma alíquota de 5 a 10 µl da reação de PCR foi seca em estufa a 50°C e enviadas para a empresa Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada-RS, para a realização do sequenciamento. Foi utilizado o sequenciador automático ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Com as sequências geradas, o eletroferograma foi gerado utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e os resultados do sequenciamento foram comparados com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology), através da ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST

2.0). O critério adotado para interpretação foi de que sequências com identidade $\geq 99\%$ foram consideradas como pertencentes à mesma espécie e gênero; sequências $\geq 98\%$ pertencem ao mesmo gênero, porém representam variação dentro da espécie; e sequências $\geq 95\%$ e inferiores a 98% pertencem apenas ao mesmo gênero (GODINHO et al., 2013).

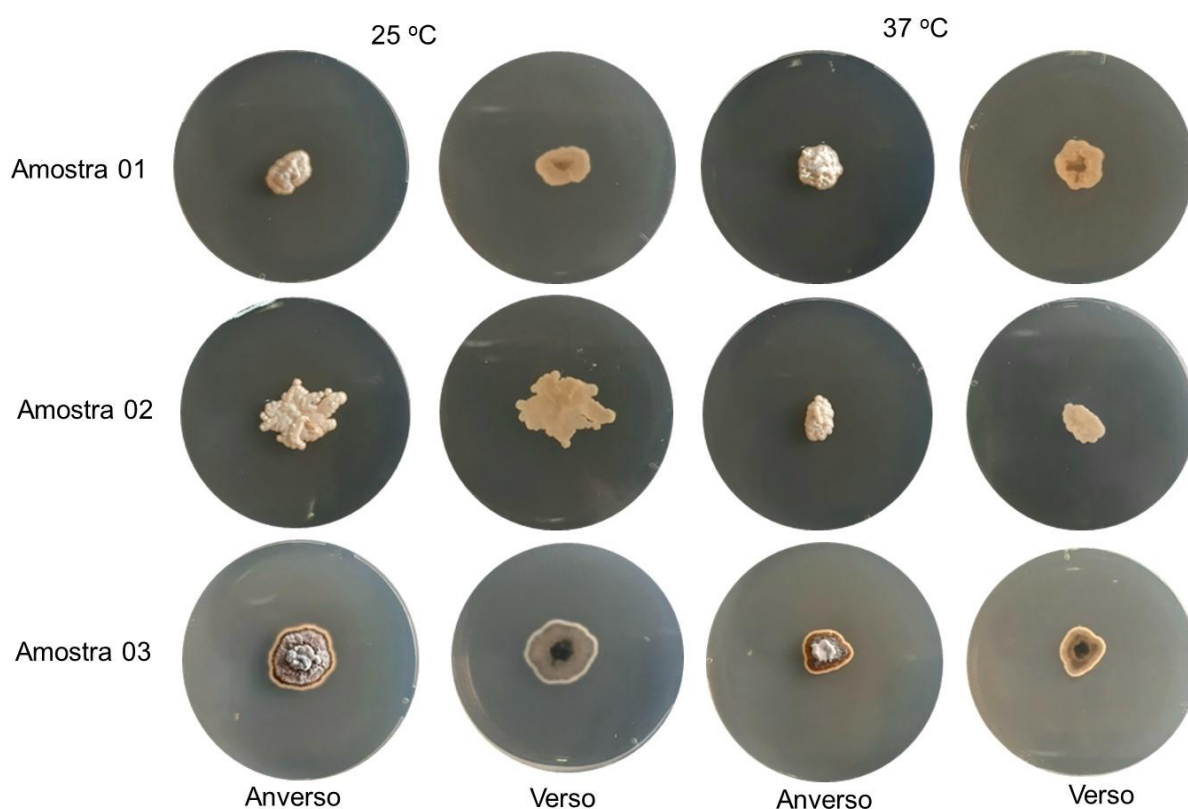
5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS

5.1.1 Características macroscópicas

As colônias do *Sporothrix* spp., não apresentaram dimorfismo ao serem cultivadas nas temperaturas de 25°C e 37°C, durante cinco dias, em ágar Micobiótico Seletivo. As características observadas em ambas as temperaturas foram: colônias pequenas, secas e com coloração creme, para os isolados 01 e 02 e acastanhada, para o isolado 03 (FIGURA 01).

FIGURA 01 - MACROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS 01, 02 e 03 DE *Sporothrix* spp. AMOSTRAS CULTIVADAS À 25°C E 37°C.



FONTE: A AUTORA (2022)

A amostra 01 apresentou, em ambas as temperaturas, colônias com uma coloração creme e com um relevo, caracterizando como uma colônia micelial cultivada à 25°C, sendo assim a amostra cultivada à 37°C não apresentou a conversão da forma micelial para a forma de levedura. A mesma situação ocorreu para a amostra 02 que também apresentou a mesma coloração creme nas duas temperaturas diferentes de cultivo.

Já a amostra 03 obteve características distintas das outras duas amostras, as colônias adquiriram uma coloração de castanho e cinza escuro com as bordas mais claras. O aspecto escuro das colônias é devido à presença de melanina, que é considerado um fator de virulência nos fungos e resistência a antifúngicos (NOSANCHUK et al., 2015).

E como as outras amostras, não houve uma diferença nas características macroscópicas, apesar de serem cultivadas em temperaturas diferentes que permitiriam o dimorfismo característico do fungo *Sporothrix* spp. A não conversão micélio-levedura em ágar Micobiótico pode não ter sido conseguida, pois, de acordo com a literatura, a conversão da forma micelial na forma de levedura pode ser obtida cultivando o fungo em meio BHI (Brain Heart Infusion) ou ágar Sangue (OROFINO-COSTA et al., 2017). No entanto, observamos essa transição utilizando caldo BD (Batata Dextrose), item 5.1.1.1. A observação do dimorfismo não é um requerimento importante para o diagnóstico microbiológico de *Sporothrix*, pois a forma infectante do fungo (leveduriforme) pode ser facilmente observada em *imprints* citológicos, que é rotineiramente utilizada na prática da clínica veterinária.

5.1.1.1 Cultivo dos fungos em Meio Líquido BD

Para se verificar se o cultivo prévio, em caldo BD, poderia induzir a transição da forma micelial para levedura, foi realizado um cultivo em caldo BD dos isolados e, após a turvação do meio, foi realizada semeadura em placa de Petri contendo ágar micobiótico (FIGURA 02). Foi possível observar colônias individuais, de coloração creme, mas ainda de aspecto seco. No entanto, não foi realizada a análise microscópica desses isolados, para confirmar a conversão da forma micelial para levedura. O meio BD foi utilizado, ao invés de BHI ou ágar sangue, pois se encontrava disponível no laboratório. Análises posteriores com esses três meios de cultura poderão ser realizadas, em conjunto com a observação microscópica, para confirmar se o meio BD possa ter contribuído para esse dimorfismo.

FIGURA 02 - ASPECTO DA CULTURA DE *Sporothrix* spp. EM MEIO BD

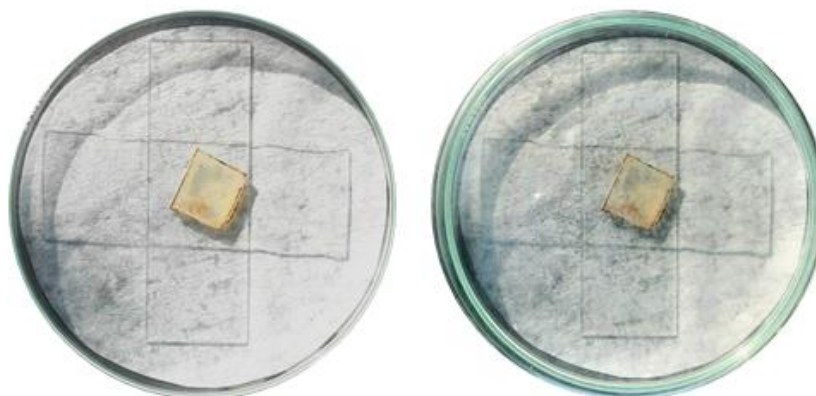
Legenda: Cultura, em ágar Micobiótico, de dois isolados de *Sporothrix* spp., previamente cultivados em caldo BD na temperatura de 37°C.

FONTE: A AUTORA (2022)

5.1.2 Características microscópicas

O fungo *Sporothrix* spp. possui como características microscópicas hifas finas, delicadas, septadas e ramificadas com a presença de conídios ovais e unicelulares que se posicionam ao longo das hifas formando estruturas semelhantes à uma margarida ou cachos (FREITAS, 2014). A análise microscópica, visando observar o padrão de filamentação à disposição dos conídios de forma preservada pode ser realizada a partir do microcultivo em lâmina (FIGURA 03).

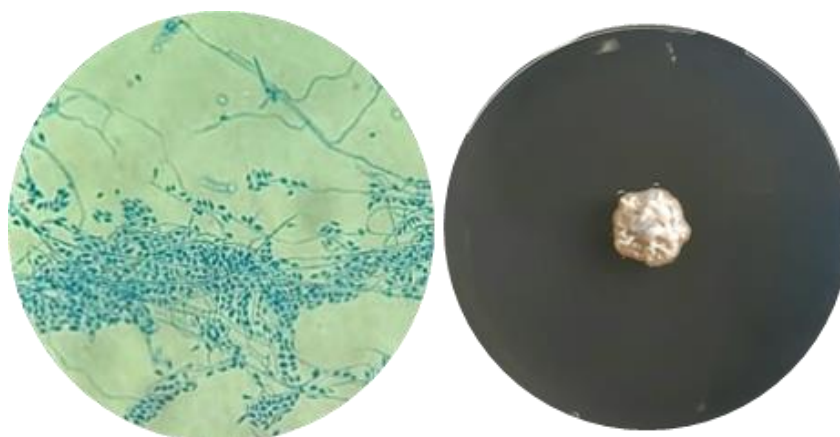
FIGURA 03 - MICROCULTIVO EM LÂMINA



Legenda: Microcultivo, em ágar Micobiótico, de um isolado de *Sporothrix* spp., mostrando o crescimento do micélio nas extremidades do bloco do meio de cultura, depositado sobre uma lâmina de microscopia. FONTE: A AUTORA (2022)

As Figuras 04, 05 e 06, a seguir, apresentam o resultado das análises microscópicas (aumento de 400x) das lamínulas utilizadas no microcultivo das amostras, para que as hifas e esporos do fungo ficassem fixados e ao serem corados pelo corante lactofenol azul algodão as estruturas fúngicas pudessem ser observadas sob microscopia óptica.

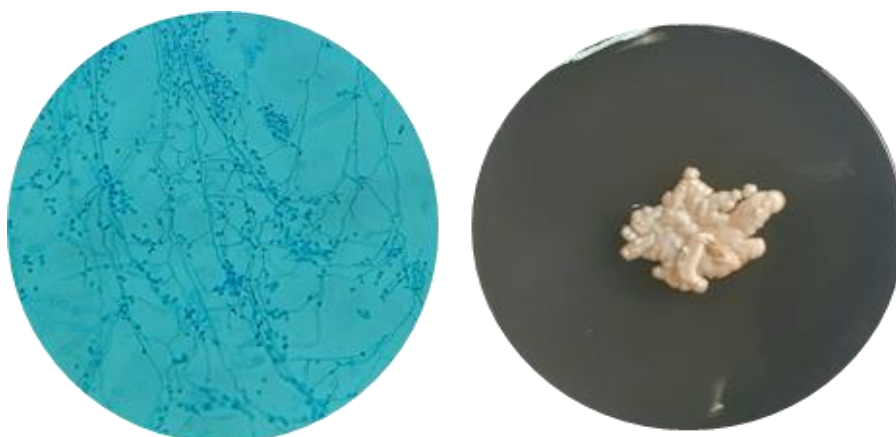
FIGURA 04 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DA AMOSTRA 01



Legenda: Micromorfologia (características microscópicas) da amostra 01 evidenciando a presença de hifas finas e presença de conídios. Macromorfologia: características da colônia.

FONTE: A AUTORA (2022)

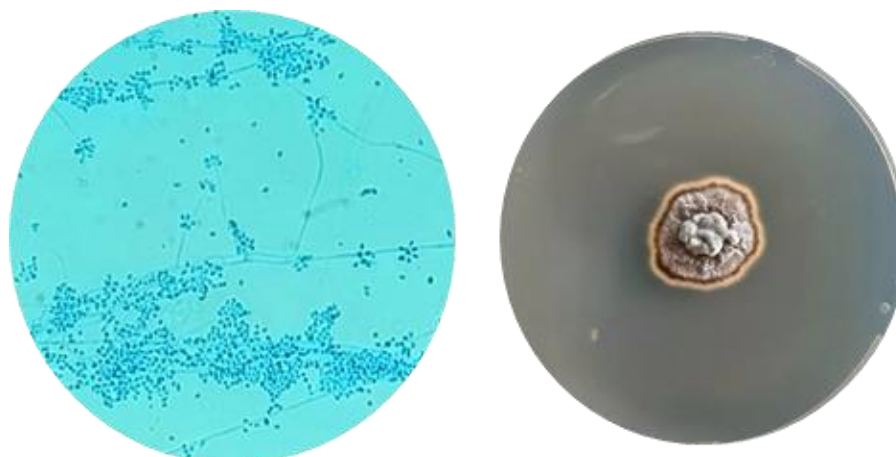
FIGURA 05 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DA AMOSTRA 02



Legenda: Micromorfologia (características microscópicas) da amostra 02 evidenciando a presença de hifas finas e presença de conídios. Macromorfologia: características da colônia.

FONTE: A AUTORA (2022)

FIGURA 06 - MICRO E MACROMORFOLOGIA DA AMOSTRA 03



Legenda: Micromorfologia (características microscópicas) da amostra 03 evidenciando a presença de hifas finas e presença de conídios mais escuros (não observado nessa imagem). Macromorfologia: características da colônia.

FONTE: A AUTORA (2022)

Todas as três amostras apresentaram as estruturas compatíveis com as do *Sporothrix* spp, apesar das características da colônia da amostra três se diferenciarem das outras duas amostras. Apresentaram as hifas finas e septadas com os seus conídios se posicionando como margaridas nas hifas, como pode ser bem observado na Figura 06. Foram também realizadas preparações microscópicas utilizando fita adesiva do tipo durex, para a coleta dos micélios e adicionadas em lâminas contendo lactofenol azul de algodão (resultados não apresentados). As imagens foram similares às obtidas pela técnica de microcultivo, mas as estruturas dos conidióforos não foram totalmente preservadas. Além disso, o tempo de armazenamento, o material adesivo da fita interfere com o corante, ocasionando uma opacidade do material. A técnica da fita adesiva é utilizada por muitos micologistas, para a análise rápida das estruturas fúngicas, mas para o diagnóstico preciso, é recomendado o microcultivo.

5.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS

5.2.1 Qualidade do DNA extraído

A quantificação de DNA por espectrofotometria é utilizada para determinar a concentração dos ácidos nucleicos na amostra, por meio da medição da luz no comprimento de onda de 260 nm absorvida pelo DNA. O valor de absorbância de 1,0 corresponde a 50 µg/ml de DNA, sendo assim quanto maior a absorbância maior a

concentração. Durante a extração do DNA pode ocorrer a contaminação das amostras com outras moléculas, como proteínas e carboidratos. Essas contaminações podem ser observadas, pois a espectrofotometria permite a determinação da pureza da amostra usando o cálculo de 260 nm/280 nm. Os valores maiores ou iguais a 1,80 da razão 260/280 demonstram uma pureza adequada, valores distintos desse podem apresentar contaminantes.

TABELA 01 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Amostra	Conc. ácido nucleico	Unid	A260	A280	260/280	260/230
01	192,00	ng/μl	3,839	2,207	1,74	1,21
02	123,1	ng/μl	2,463	1,169	2,11	1,80
03	48,2	ng/μl	0,964	0,488	1,98	3,07

Legenda: Resultados da quantificação, em Nanodrop, do DNA extraído, em ng/μl, e razões de indicativo de pureza (260/280 e 260/230). Valores menores que 2 podem indicar presença de contaminantes na amostra.

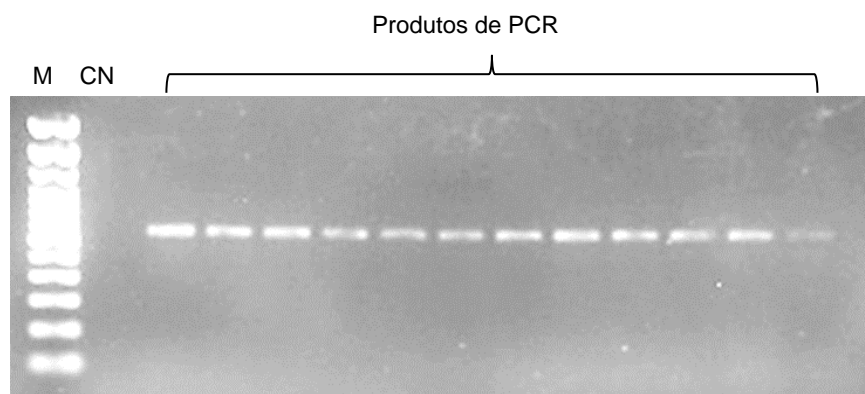
FONTE: A AUTORA (2022)

Foi possível obter DNA com concentração adequada para a posterior amplificação por PCR. As razões 260/280 e 260/230, obtidas logo após a extração do DNA, apresentaram valores abaixo de 2,0, o que pode indicar a presença de impurezas, que podem consistir na liberação de metabólitos do próprio fungo ou a presença, o que pode variar de acordo com o tipo de fungo ou contaminantes que possam ser originados do meio de cultivo. A PCR foi realizada diretamente das amostras extraídas, e não foi possível obter amplificação por PCR. Dessa forma, o DNA passou por um processo de purificação e concentração, pois foi necessário realizar várias reações de PCR para cada amostra, utilizando acetato de potássio e etanol absoluto, o que contribuiu para uma melhora na qualidade do DNA e sucesso na amplificação (TABELA 01).

5.2.2 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Figura 07 mostra os produtos de amplificação, de aproximadamente 600 pb, de várias reações de PCR realizadas para o isolado 1, para serem precipitadas visando concentrar a amostra. A reação de PCR também foi positiva para as demais amostras, 2 e 3 (dados não mostrados).

FIGURA 07 - ELETROFORESE GEL DE AGAROSE DA AMPLIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR DA REGIÃO ITS1-4 DA AMOSTRA 1.



Legenda: M - marcador de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen TM). CN - Controle negativo da reação. Produtos de PCR da região ITS1-4 de aproximadamente 600 pb, da amostra 1.

FONTE: A AUTORA (2022)

A Tabela 02 mostra as concentrações dos produtos de amplificação da região ITS, das amostras 01, 02 e 03, após precipitação com acetato de potássio e etanol absoluto. Podemos observar que todas as amostras apresentaram grau de pureza nas razões 260/230 satisfatórias. As razões 260/280 abaixo do recomendado (valor 2,0), pode indicar a presença de proteínas na amostra.

TABELA 02 - QUANTIFICAÇÃO DNA AMPLIFICADO (PCR) APÓS PRECIPITAÇÃO

Amostra	Conc. ácido nucleico	Unid	A260	A280	260/280	260/230
01	1113,9	ng/μl	22,27	12,84	1,73	2,23
02	997,7	ng/μl	19,95	11,26	1,77	1,91
03	691,3	ng/μl	13,82	7,915	1,75	2,58

Legenda: Resultados da quantificação, em Nanodrop, dos produtos de PCR, após precipitação, em ng/μl, e razões de indicativo de pureza (260/280 e 260/230). Valores menores que 2 podem indicar presença de contaminantes na amostra.

FONTE: A AUTORA (2022)

5.2.3 Alinhamento da sequência ITS do isolado 01 com a sequência de maior homologia depositada no GenBank

Até o momento da descrição deste trabalho foi possível obter o resultado do sequenciamento apenas da amostra 01. Foi obtido resultado satisfatório de amplificação das amostras 02 e 03 e os produtos de PCR foram enviados para a

realização do sequenciamento. O produto de amplificação da região ITS1-4 foi submetido ao sequenciamento e gerou uma sequência de 181 pb, que apresentou 93% de similaridade com a espécie *Sporothrix brasiliensis*, número de acesso no GenBank MW091522.1 (FIGURA 08). Apesar do tamanho reduzido da sequência obtida, podemos concluir que se trata dessa espécie. Considerando que esses dados ainda são preliminares, após a obtenção do resultado do sequenciamento das demais amostras, as sequências passarão por edição utilizando o software BioEdit.

FIGURA 08 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DA REGIÃO ITS1-4 DO ISOLADO 01 ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLASTn (NCBI)

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Sporothrix brasiliensis strain L1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
 Sequence ID: [MW091522.1](#) Length: 458 Number of Matches: 1

Range 1: 293 to 457 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
254 bits(137)	4e-63	154/165(93%)	1/165(0%)	Plus/Minus
Query 18	CTCCTMATCCGAGGTCACCTTGT-MMAGAAKAGYTGCCGTCATGCGCGTTTTTCRCGGGA	76		
Sbjct 457	CTCCTGATCCGAGGTCACCTTGTATAAGAAGAGCTGCCGTCATGCGCGTTTTTCACGGCA	398		
Query 77	GGGCGCCTggggggCGTCCGGAGCGAGGGGAGAACATGCGTTCRGWACTGCGCTCGGAG	136		
Sbjct 397	GGGCGCCTGGGGGGCGTCCGGAGCGAGGGGAGAACATGCGTTCGGTACTGCGCTCGGAG	338		
Query 137	CCATCCACAGGGCCCGCCACTCGCTTTTCGGGGGCCCCCGCCAGG	181		
Sbjct 337	CCATCCACAGGGCCCGCCACTCGCTTTTCGGGGGCCCCCGCCAGG	293		

Legenda: Query - Sequência de 181 pb parcial da região ITS1-4 do isolado 01. Subject - sequência da espécie *Sporothrix brasiliensis*, do GenBank com maior similaridade (93%).

FONTE: A AUTORA (2022)

O diagnóstico da esporotricose, utilizando análise molecular do agente fúngico, pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma ótima opção para diagnóstico, mas ainda não é utilizada e implementada na rotina da clínica, sendo utilizada com mais frequência principalmente em pesquisas científicas (GREMIÃO et al., 2021). O diagnóstico da esporotricose, por PCR, produz melhores resultados quando realizados a partir da cultura fúngica isolada, comparando com alguns ensaios que já foram realizados a partir de amostras de tecidos infectados. Vários autores relatam que, apesar do diagnóstico padrão-ouro da esporotricose ainda ser o método clássico de cultura, o resultado da cultura micológica pode demorar de sete a trinta dias para ficar disponível. No nosso trabalho, as colônias fúngicas do referente à amostra 03 foi observada rapidamente, após dois dias de incubação, provavelmente devido à alta carga fúngica contida na amostra de *swab*, o qual foi enviado em tubo de transporte, tipo Stuart. A amostra apresentava também uma quantidade observável

de sangue. Após a realização da cultura, o *swab* dessa amostra foi passado em uma lâmina de microscopia, corado com lactofenol azul algodão e foram observadas estruturas de *Sporothrix* spp. (hifas e conídios), reforçando a alta carga fúngica da amostra. Não temos informações sobre o tempo de aparecimento da cultura da amostra 01. A amostra 02 foi coletada utilizando *swab* com haste recortada dentro de um tubo com salina estéril e enviada ao laboratório. O *swab* foi semeado no meio de cultivo e foram observadas culturas após cinco dias. Dessa forma, podemos concluir que o tempo necessário para a positividade da cultura pode variar, dependendo da carga fúngica presente na amostra e talvez devido à fisiologia do fungo.

Considerando que o diagnóstico precoce contribui para um tratamento prematuro e com isso, com o controle na disseminação desta micose, estudos foram realizados sobre a possibilidade de fazer a identificação do agente em tecidos infectados. Poester et al. (2021) extraíram DNA diretamente de amostras de *swabs* de lesões, usando um método de extração *in house* e foi submetido à amplificação, com um par de *primers* espécie-específico (Sbra), descrito por Rodrigues et al. (2015). Os autores observaram uma alta taxa de resultados falso-negativos, mostrando que, no estudo realizado, esta técnica não poderia ser utilizada para a exclusão do diagnóstico de esporotricose em casos suspeitos. Os mesmos autores relatam que a presença de inibidores da PCR podem estar presentes em amostras clínicas, como anticorpos e hemoglobina (SCHRADER et al., 2012) ou os *swabs* apresentaram uma baixa carga fúngica.

Rodrigues et al. (2015) e Zhang et al. (2019) utilizaram kits comerciais para a extração de DNA direto de amostras clínicas e obtiveram uma alta sensibilidade para resultados positivos. No nosso trabalho, não foram testados protocolos *in house*, mas mesmo utilizando um kit comercial específico para a extração de DNA de fungos, não foi possível obter amplificação por PCR sem a etapa da precipitação, mesmo consistindo em material de cultura e uso de nitrogênio líquido. A quantidade de DNA genômico obtida foi satisfatória e a relação de pureza aceitável, mas inibidores de PCR poderiam estar presentes nas amostras. Zhang et al. (2019) empregaram a PCR multiplex em Tempo Real, apresentando 93,9% de detecção ao *Sporothrix* spp. em amostras de biópsia, mas, de fato, esta técnica permite a detecção de quantidades menores de DNA quando comparado à PCR convencional. A utilização de Nested-PCR poderia aumentar a sensibilidade da reação, como reportado por (RODRIGUES et al., 2015).

A região do espaçador interno transcrito dos genes ribossomais (ITS) funciona como um marcador universal para a identificação de fungos e tem sido utilizado para o sequenciamento de *Sporothrix* spp. (ZHOU et al., 2014). No entanto, como as espécies ambientais de *Sporothrix* apresentam entre si uma distância filogenética relativamente grande, é recomendado que, além da região ITS, sejam utilizados outros marcadores moleculares, codificantes de proteína, como já citados (BT2, CAL e EF-1 α) principalmente para espécies raras como o complexo *S. pallida* (*S. pallida*, *S. mexicana*, e *S. chilensis*). Consideramos que, na medicina veterinária, principalmente em felinos, a utilização da região ITS é suficiente e informativa, visto que a espécie mais frequentemente encontrada em esporotricose em gatos domésticos é *S. brasiliensis*, responsável por mais de 90% dos casos de esporotricose humana e felina no Brasil.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada a caracterização fenotípica de três amostras de *Sporothrix* spp., isolados de felinos domésticos e o sequenciamento de um dos isolados. Nossos resultados demonstraram diferenças morfológicas entre o isolado 03 (colônia com aspecto pardo), comparando com colônias cremes, observadas para os isolados 01 e 02. O isolado 01 foi identificado como *S. brasiliensis*, por meio do sequenciamento da região do rDNA (ITS1-4). A obtenção do resultado de sequenciamento dos demais isolados, principalmente o isolado 03, que apresentou morfologia diferente dos demais, será importante para trabalhos futuros, visando fazer uma correlação com as formas clínicas, origem do isolado e suscetibilidade a antifúngicos sintéticos e naturais. Além disso, a utilização de marcadores moleculares adicionais à região ITS, assim como o uso da PCR-RFLP, bem como aumentar o número de isolados, será importante para realizar correlações entre diferenças morfológicas e aspectos clínicos da doença e do agente. Os resultados apresentados nesse trabalho poderão contribuir com estudos epidemiológicos da esporotricose na região do Oeste do Paraná e poderá ser utilizado como um guia para caracterização microbiológica e molecular do agente fúngico para futuros trabalhos da equipe.

REFERÊNCIAS

- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, 2010.
- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. P.; GALHARDO, M. C. G.; SCHUBACH, A. O.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; LAZÉRA, M. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C. M. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-779, 2001.
- BENTO, A. O.; COSTA, A. S. S.; LIMA, S. L.; ALVES, M. M.; MELO, A. S. A.; RODRIGUES, A. M.; SILVA-ROCHA, W. P.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, 2021.
- BISON, I.; PARENTONI, R. N.; BRASIL, A. W. L. **METANÁLISE DE ESPOROTRICOSE FELINA: UM DESTAQUE PARA SUA OCORRÊNCIA NO BRASIL**. 2020. 15 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.
- CASTRO, R. A.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P. H.; TEIXEIRA, P. A. C.; SANCHES, G. F.; TEIXEIRA, M. M.; QUINTELLA, L. P.; ALMEIDA, S. R.; COSTA, R. O.; CAMARGO, Z. P.; FELIPE, M. S. S. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. **Public Library of Science One**, v. 8, n. 10, 2013.
- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.
- DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Baarn: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 1995.
- DE MACEDO, P.M.; SZTAJNBOK, D.C.; CAMARGO, Z.P.; RODRIGUES, A. M.; LOPES-BEZERRA, L.M.; BERNARDES-ENGEMAN, A. AR.; et al. Dacryocystitis due to *Sporothrix brasiliensis*: a case report of a successful clinical and serological outcome with low dose potassium iodide treatment and oculoplastic surgery. **British Journal of Dermatology**. v. 172, p. 1116-1119, 2015.
- FREITAS, D. F. S. **Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose**. 2014. 148 f. (Doutorado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- GENARO, G. Gato doméstico: futuro desafio para controle da raiva em áreas urbanas? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 186-189, 2010.
- GINN P. E.; MANSELL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Sporotrichosis. **Pathology of Domestic Animals**, v. 1, p. 703-704, 2007.
- GODINHO, V. M.; FURBINO, L.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N.; PUPO, D.; ALVES, T. M.; A S JUNIOR, P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. Diversity and

bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The Isme Journal**, v. 7, n. 7, p. 1434-1451, 2013.

GREMIÃO, I.D.F.; MENEZES, R.C.; SCHUBACH, T.M.P.; FIGUEIREDO, A.B.; CAVALCANTI, M.C.; PEREIRA, S.A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, p.15–21, 2015.

GREMIÃO, I.D.F.; MARTINS DA SILVA DA ROCHA, E.; MONTENEGRO, H.; CARNEIRO, A.J.B.; XAVIER, M.O.; DE FARIAS, M.R.; MONTI, F.; MANSO, W.; DE MACEDO ASSUNÇÃO PEREIRA, R.H.; PEREIRA, S.A.; LOPES-BEZERRA, L.M. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 107-124, 2021

HEKTOEN, L.; PERKINS C. F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 1, n. 5, p. 77–89, 1990.

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

KANO, R.; OKUBO, M.; SIEW, H. H.; KAMATA, H.; HASEGAWA, A. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. **Mycoses**, v. 58, n. 4, p. 220-224, 2015.

KANO, R.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; HASEGAWA, A. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 156, n. 15, p. 484-485, 2005.

LACAZ, C. S. **Esporotricose e outras Micoses Gomosas**, p.479-487. In: Lacaz C.S., Porto E., Martins J.E.C., Heis-Vaccari E.M. & Takahashi de Melo N. (Eds), Tratado de micologia médica Lacaz. 9ª ed. Savier, São Paulo, 2002.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M.; ZHANG, Y, et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, p.126, 2018.

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

MAHAJAN, V.K; Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, artigo id. 272376, 2014.

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

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; KHORAMIZADEH, M.; YAMAGUCHI, H. A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida Species. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, n. 3, p. 225-229, 2006.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, n. 27, p. 427-431, 2002.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1463, 2015.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. **Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* Isolates from an Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil**. 2011. 11 f. Rio de Janeiro, 2011.

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

PADILHA, A. R. **Esporotricose Felina: Primeiro Relato de Caso no Município de Ortigueira – PR**. 2015. 26 f. Monografia (Especialização) - Curso de Pós-Graduação, Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, Fundação Educacional Jayme de Altavila, Curitiba, 2015.

PAPPAS, P. G.; TELLEZ, I.; DEEP, A. E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 65-70, 2000.

POESTER, V. R.; VON GROLL, A.; MUNHOZ, L. S.; MELO, A. M.; BASSO, R. P.; MADRID, I. M.; MORA-MONTES, H. M.; XAVIER, M. O. SPECIES-SPECIFIC PCR FOR THE DIAGNOSIS OF SPOROTRICHOSIS CAUSED BY *Sporothrix brasiliensis*. **Archives of Veterinary Science**, v.26, n.3, p. 72-81, 2021.

RHODES, K. H.; **Dermatologia de pequenos animais**, 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 702p

RODRIGUES, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; DE HOOG, G.S.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A. FERNANDES, G.F. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013.

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, p. 383-387, 2014.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, 2015.

RODRIGUES, A. M.; TERRA, P. P. D.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; OROFINOCOSTA, R.; CAMARGO, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 21, p. 1-30, 2020.

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

SCHUBACH, T. M.; MENEZES, R. C.; WANKE, B. Sporotrichosis. In: Greene CE, editor. Infectious diseases of the dog and cat. 4. **Philadelphia: Saunders Elsevier**; p. 645–650, 2012.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 2012.

TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS I. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v. 160, p. 2352-2365, 2014.

XU, T.; LIN, J.; GAO, X.; WEI, H.; LIAO, W.; CHEN, H. Identification of *Sporothrix schenckii* of various mtDNA types by Nested PCR Assay. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 161-165, 2010.

ZHANG, M.; LI, F.; LI, R.; GONG, J.; ZHAO, F. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, 2019.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P.; HOOG, G. S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 66, p. 153-165, 2014.