



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



DANIELLE BARRETO DE ALMEIDA

Diagnóstico de Esporotricose: Reações de Detecção (PCR) e Diferenciação (PCR-RFLP) de Espécies de *Sporothrix* spp.

MANAUS - AM

2025



DANIELLE BARRETO DE ALMEIDA



Diagnóstico de Esporotricose: Reações de Detecção (PCR) e Diferenciação (PCR-RFLP) de Espécies de *Sporothrix* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza.

Coorientador: Prof.^a Dr.^a. Flávia da Silva Fernandes.

MANAUS - AM

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

- A447d Almeida, Danielle Barreto de
Diagnóstico de esporotricose: reações de detecção (PCR) e diferenciação (PCR-RFLP) de espécies de sporothrix spp. / Danielle Barreto de Almeida. - 2025.
70 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): João Vicente Braga de Souza.
Coorientador(a): Flavia da Silva Fernandes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Manaus - Am, 2025.
1. Sporothrix. 2. Diagnóstico molecular. 3. PCR. 4. Extração de DNA. 5. Amazônia. I. Souza, João Vicente Braga de. II. Fernandes, Flavia da Silva. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título
-

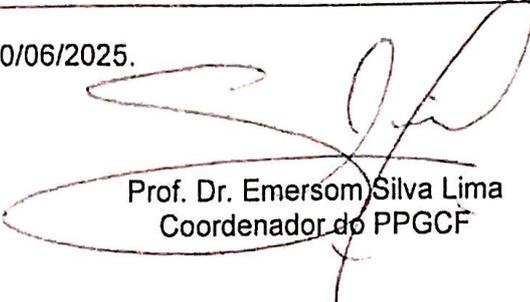
"DIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOSE: REAÇÕES DE DETECÇÃO (PCR) E DIFERENCIAÇÃO (PCR-RFLP) DE ESPÉCIES DE *SPOROTHRIX SPP.*"

DISCENTE: DANIELLE BARRETO DE ALMEIDA

PARECER:

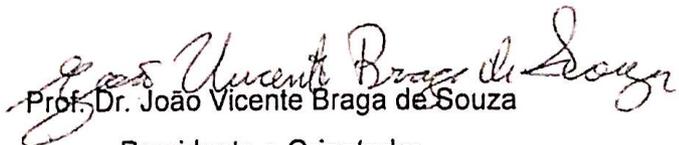
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 30/06/2025.



Prof. Dr. Emersom Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



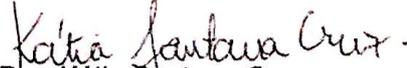
Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Presidente e Orientador



Profa. Dra. Waldireny Rocha Gomes

Membro Interno



Profa. Dra. Kátia Santana Cruz

Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, elevo meus sinceros agradecimentos a Deus, o Criador de todas as coisas, minha rocha e fortaleza constante em cada momento desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Vicente, pela sua inestimável orientação, paciência e dedicação, que foram cruciais para a concretização deste trabalho. Estendo meus agradecimentos a Prof.^a Dra. Erika e à Prof.^a Dra. Ana Cortez, pelo apoio técnico e pelos conhecimentos compartilhados, que enriqueceram significativamente esta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Flávia, agradeço pela paciência e suporte que tornaram este percurso da pesquisa mais enriquecedor com suas experiências e dedicação.

Aos meus colegas Juan, Nayara, Isabela, Vanessa de Sá, e a todos os demais colegas que, direta ou indiretamente, contribuíram com trocas de ideias, apoio e incentivo, tornando esta experiência mais rica e colaborativa.

Um agradecimento especial e cheio de carinho à minha tia e amiga, Maria Selma, cujo apoio incondicional e palavras de força foram fundamentais para que eu não desistisse diante das lutas e provas que surgiram ao longo deste período.

Á todos os colaboradores do laboratório, que com sua dedicação e profissionalismo, criaram um ambiente propício ao desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade, a todos os professores pelos ensinamentos. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa no Estado do Amazonas.

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea emergente de relevância na região Amazônica, com aumento expressivo de casos em humanos e felinos. A identificação rápida e precisa dos agentes etiológicos é essencial para o manejo clínico e a vigilância epidemiológica. Este estudo teve como objetivo aprimorar o diagnóstico molecular da esporotricose, avaliando diferentes métodos de extração de DNA e comparando a sensibilidade de três regiões-alvo do DNA ribossomal (ITS, ITS/LSU e D1/D2 do 28S) para amplificação por PCR. Três protocolos de extração de DNA (fenol-clorofórmio, colunas de sílica e precipitação por sal) foram aplicados a isolados de *Sporothrix brasiliensis*, *S. schenckii*, um isolado regional de *Sporothrix spp.*, além de *Candida albicans* e *Aspergillus niger* como controles externos. O método de fenol-clorofórmio apresentou maior rendimento e pureza de DNA. Os primers ITS1–ITS4 foram os mais sensíveis, detectando até 0,0002 ng de DNA, seguidos por NL1–NL4 (0,002 ng) e ITS5–NL4 (0,02 ng). Uma análise *in silico* avaliou cinco enzimas de restrição (HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI), mas os perfis de fragmentação gerados pelas diferentes espécies de *Sporothrix* apresentaram tamanhos muito semelhantes, com diferenças menores que 20 pb, dificultando a diferenciação prática por PCR-RFLP. Experimentalmente, a PCR-RFLP permitiu distinguir os isolados de *Sporothrix* dos fungos não relacionados (*C. albicans* e *A. niger*), mas não foi eficaz para diferenciar entre *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. A análise filogenética baseada na região ITS confirmou que todos os isolados clínicos de Manaus pertenciam ao clado de *S. brasiliensis*. Conclui-se que a combinação da extração por fenol-clorofórmio e PCR com primers ITS1–ITS4 representa uma alternativa sensível e acessível para o diagnóstico da esporotricose na região Amazônica.

Palavras-chave: *Sporothrix*, Diagnóstico molecular, PCR, Extração de DNA, Amazônia.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an emerging subcutaneous mycosis of significant relevance in the Amazon region, with a marked increase in cases among humans and felines. Rapid and accurate identification of the etiological agents is essential for clinical management and epidemiological surveillance. This study aimed to enhance the molecular diagnosis of sporotrichosis by evaluating different DNA extraction methods and comparing the sensitivity of three target regions of ribosomal DNA (ITS, ITS/LSU, and D1/D2 of 28S) for PCR amplification.

Three DNA extraction protocols (phenol-chloroform, silica columns, and salt precipitation) were applied to isolates of *Sporothrix brasiliensis*, *S. schenckii*, a regional isolate of *Sporothrix spp.*, as well as *Candida albicans* and *Aspergillus niger* as external controls. The phenol-chloroform method yielded the highest DNA yield and purity. The primers ITS1–ITS4 were the most sensitive, detecting as little as 0.0002 ng of DNA, followed by NL1–NL4 (0.002 ng) and ITS5–NL4 (0.02 ng).

An *in silico* analysis evaluated five restriction enzymes (HaeIII, MspI, HinfI, DdeI, and RsaI), but the fragmentation profiles generated by the different *Sporothrix* species showed very similar sizes, with differences of less than 20 bp, making practical differentiation by PCR-RFLP challenging. Experimentally, PCR-RFLP allowed for the distinction of *Sporothrix* isolates from unrelated fungi (*C. albicans* and *A. niger*), but it was not effective in differentiating between *S. brasiliensis* and *S. schenckii*. Phylogenetic analysis based on the ITS region confirmed that all clinical isolates from Manaus belonged to the *S. brasiliensis* clade. It is concluded that the combination of phenol-chloroform extraction and PCR with ITS1–ITS4 primers represents a sensitive and accessible alternative for the diagnosis of sporotrichosis in the Amazon region.

Keywords: *Sporothrix*, Molecular diagnosis, PCR, DNA extraction, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore Filogenética	13
Figura 2 - Linha do tempo esporotricose no Amazonas, Brasil e Mundo.....	19
Figura 3 - Citologia de uma amostra coletada de um gato.....	21
Figura 4 - Cultura de <i>Sporothrix</i> spp.	22
Figura 5 - Cultura leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp.....	22
Figura 6 - Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição – RFLP.....	26
Figura 7 - Fluxograma da metodologia e dos procedimentos	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da esporotricose no mundo no período de 2012 a 2022.....	15
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Referências de primers para cada região alvo	32
Quadro 2 - Procedimentos de Reação de PCR para Cada Marcador Molecular	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

°C - Graus Celsius

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de Busca Básica de Alinhamento Local)

CAL – Calmodulina

DAS - Sabouraud dextrosy ágar (ágar sabouraud dextrose)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Deoxinucleotídeos trifosfatados

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ITS – Espaçador Transcrito Interno

LSU rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico de Subunidade Grande

Min - Minuto mL- Mililitros

OTU – Unidades Taxonômicas Operacionais

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

RFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

Mg - Micrograma

µl – Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 <i>SPOROTHRIX</i> E ESPOROTRICOSE.....	13
2.1.1 <i>Patogenia</i>	13
2.2 EPIDEMIOLOGIA	15
2.2.1 <i>Mundo</i>	15
2.2.2 <i>América Latina</i>	16
2.2.3 <i>Brasil</i>	17
2.2.4 <i>Amazonas</i>	17
2.2.5 <i>Esporotricose em gatos e sua distribuição geográfica</i>	18
2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOSE.....	20
2.3.1 <i>Exame direto</i>	20
2.3.2 <i>Histopatológico</i>	20
2.3.3 <i>Exame citológico</i>	20
2.3.4 <i>Cultura</i>	21
2.4 DIAGNÓSTICO COM A REAÇÃO DE PCR.....	23
2.4.1 <i>Extração do DNA de Sporothrix</i>	23
2.4.2 <i>Alvos moleculares para detecção de Sporothrix por PCR</i>	24
2.5 TÉCNICA DE RFLP-PCR.....	25
2.5.1 <i>Análise in silico</i>	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 <i>Objetivo Geral:</i>	28
3.2 <i>Objetivos Específicos:</i>	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 TIPO DE ESTUDO	29
4.2 CEPAS PADRÃO.....	29
4.3 PROCEDIMENTOS.....	29
4.3.1 <i>Avaliação a eficácia de três diferentes métodos de extração de DNA</i>	29

4.3.2 Comparação da eficiência da amplificação de DNA de <i>Sporothrix brasiliensis</i> por PCR	31
4.3.3 Análise in silico de RFLP-PCR.....	33
4.3.4 Confirmação da identidade molecular dos isolados aleatórios de <i>Sporothrix regionais</i>	34
4.3.5 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	36
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é causada por fungos do gênero *Sporothrix*, uma micose que acomete humanos e animais, principalmente os gatos domésticos (Gremião et al., 2021a). Esse gênero é caracterizado como dimórfico por apresentarem fase em micélio e leveduras (Lopez-Bezerra et al., 2018). O gênero *Sporothrix* possui classificações por clados, e o clado patogênico, que é de maior importância, inclui *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* (Nava-Pérez et al., 2022). A transmissão ocorre através de arranhões, ou contato direto com materiais orgânicos contaminados, podendo causar lesões na pele, tecido subcutâneo, mucosas e órgãos internos (De Lima Barros; De Almeida Paes; Schubach, 2011a; Gremião et al., 2021a).

O diagnóstico da esporotricose é desafiador, pois os sinais clínicos na pele podem ser confundidos com outras enfermidades como a criptococose, leishmaniose tegumentar, doenças bacterianas, neoplasia etc. (Lloret et al., 2013; Maria et al., 2011). E muitos laboratórios não possuem um aparato adequado para realizar os exames, e quando tem um método, os resultados são demorados, como a cultura fúngica (Etchecopaz et al., 2021).

A distribuição geográfica da esporotricose envolve diversos países, incluindo o Brasil. No país a esporotricose avança por quase todos os estados, causando preocupação para a saúde pública e a classe médica veterinária (Almeida-Paes et al., 2014; Angelo et al., 2023; Gonçalves et al., 2024b; Gremião et al., 2020; Rabello et al., 2022). O *Sporothrix brasiliensis*, possui maior prevalência e incidência no Brasil (Boechat et al., 2022; Etchecopaz et al., 2021; Gomez et al., 2018; Gremião et al., 2015, 2020; Rachman et al., 2022). No estado do Amazonas, os primeiros casos de esporotricose em animais e humanos surgiram no ano de 2020 e 2021 (Mesquita et al., 2024). Desde então, o número de casos vem crescendo e se disseminando para diversos municípios do Estado do Amazonas (FVS - RCP/AM, 2023).

A esporotricose é uma doença silenciosa e que está se espalhando descontroladamente. E para realizar o monitoramento dessa epidemia é necessário fazer a identificação dos agentes em nível de espécies ou intra-espécies. Embora existam técnicas de diagnósticos diferenciados elas são demoradas e não têm uma boa resolutividade na detecção e diferenciação das espécies de forma rápida e confiável. A falta de disponibilidade de profissionais capacitados com biologia molecular e a complexidade da interpretação dos resultados tornam a aplicação dessas técnicas limitada na rotina clínica e epidemiológica. E Manaus tem enfrentado, atualmente, a dificuldade de identificar as diferentes espécies de *Sporothrix* presentes em gatos.

Este estudo teve como objetivo aprimorar o diagnóstico molecular da esporotricose por meio da comparação de métodos de extração de DNA e da avaliação da sensibilidade de diferentes regiões do DNA ribossomal para detecção de *Sporothrix* spp. por PCR. Também foi realizada uma análise *in silico* com múltiplas enzimas de restrição para verificar o potencial de diferenciação de espécies por PCR-RFLP, seguida de validação experimental. Além disso, a identidade molecular dos isolados regionais foi confirmada por análise filogenética com base na região ITS. O trabalho buscou contribuir com o desenvolvimento de um protocolo mais sensível, específico e de fácil aplicação para o diagnóstico da esporotricose na Amazônia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Sporothrix* e Esporotricose

O gênero *Sporothrix* é composto por fungos dimórficos, atualmente reconhecidos em cerca de 53 espécies. Essas espécies são agrupadas em diferentes clados com base em análises filogenéticas, ou seja, grupos de organismos com ancestralidade comum. Dentre elas, destacam-se, do ponto de vista médico, as espécies (Figura 1): *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* (Nava-Pérez et al., 2022). A esporotricose é uma micose subcutânea causada por esses fungos e essa doença acomete humanos, animais e, principalmente, felinos, sendo considerada uma importante zoonose emergente na atualidade (Nava-Pérez et al., 2022).

As espécies do gênero *Sporothrix* pertencem ao Reino Fungi, divisão Ascomycota, Classe Pirenomyces, Ordem Ophiostimatales e Família Ophiostomataceae (Corrêa-Junior et al., 2023).

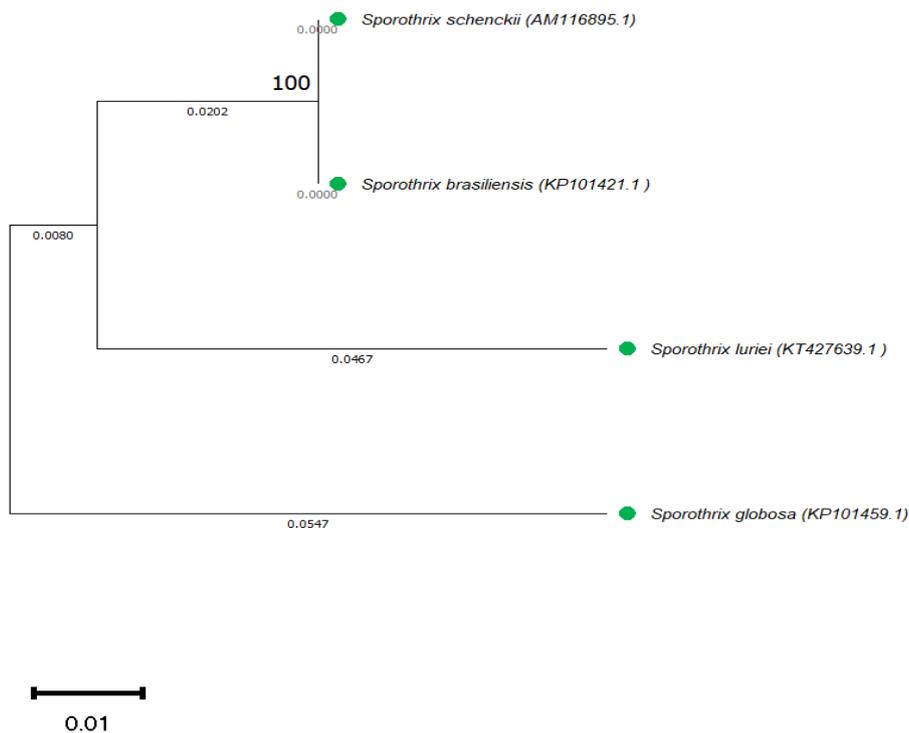


Figura 1- Árvore Filogenética gerada pelo método neighbor-joining (NJ) construída para o marcador molecular Calmodulina (CAL) no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). A árvore foi construída a partir do alinhamento das sequências de espécies do gênero *Sporothrix* disponíveis na base de dados do NCBI.

2.1.1 Patogenia

A infecção por *Sporothrix* ocorre principalmente através do contato direto com material contaminado como espinhos de plantas, solo, ou através de arranhaduras ou mordeduras de animais infectados, especialmente os gatos (Barros et al., 2023). Após a inoculação do fungo no tecido subcutâneo, ocorre a formação de lesões nodulares ou ulceradas, que podem se disseminar pela pele, linfonodos e em casos mais graves atingir órgãos internos (Gremião et al., 2021a).

A patogenia da esporotricose está relacionada à capacidade do fungo crescer a temperaturas corporais e de atingir a resposta imunológica dos hospedeiros. Os mecanismos que o *Sporothrix* causa a doença ainda não foram descobertos, mas sabe-se que envolvem fatores de virulência, melanização e biofilme (Della Terra et al., 2017).

A esporotricose até poucos anos atrás, era atribuído a um único agente causal, o fungo termodimórfico, *Sporothrix schenckii*, a partir de 2006, foi demonstrada variabilidade genética entre os isolados identificados morfológicamente como *S. schenckii*, o que levou à proposição de pelo menos seis espécies, descritas filogeneticamente como *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix pallida*, e *Sporothrix luriei* (Boechat et al., 2018). A espécie *Sporothrix schenckii* é reconhecida como o agente causador da doença há mais de um século e também é a mais estudada do grupo patogênico *Sporothrix* (Nava-Pérez et al., 2022).

Os fungos patogênicos deste gênero são organismos heterotróficos, imóveis e sua capacidade adaptativa pode ser constatada pela transição morfológica disparada pela temperatura, ou seja, são capazes de realizar dimorfismo térmico em duas formas distintas: a forma multicelular e filamentosa (micélio) e a unicelular (levedura) - que os permite sobreviver e continuar se propagando mesmo em temperaturas prejudiciais à fisiologia de outros microrganismos (Corrêa-Junior et al., 2023).

A transmissão da esporotricose pode ocorrer tanto de forma zoonótica, através de contato com animais infectados ou através da manipulação de materiais contaminados. Embora a doença esteja associada ao gato, ela também pode afetar outros animais e até os seres humanos, especialmente aqueles que trabalham com jardinagem, agricultura, ou manipulação de solo contaminado (Corrêa-Junior et al., 2023).

A incidência da esporotricose vem aumentando em diversas partes do mundo, o que ressalta a importância do estudo da patogenia e da transmissão do *Sporothrix* para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e controle da doença (Gremião et al., 2021a).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Mundo

No mundo a esporotricose tem distribuição global e os agentes etiológicos são do clado patogênico *Sporothrix* e a maioria dos casos animais e humanos concentram-se em países localizados no Japão, Reino Unido, Austrália, Estados Unidos, Índia, México, Paraguai, Colômbia, Chile, Argentina, Uruguai, Peru e no Brasil (Benedict; Jackson, 2020; Cabeza et al., 2022; Etchecopaz et al., 2020; Gallo et al., 2022; Miranda et al., 2024; Sakai et al., 2024; Sharma; Agarwal; Nachiketa, 2024; Silvero et al., 2025). No país, os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraíba, Distrito Federal, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Acre, Pará e Amazonas (Gómez-Gaviria; Martínez-Álvarez; Mora-Montes, 2023). Na Tabela 1 é apresentado o número de casos de esporotricose no mundo no período de dez anos.

No Amazonas, houve 950 casos de esporotricose em humanos e 2.823 casos em animais entre 2020 e 2023. O aumento de casos humanos entre 2021 e 2022 foi de 304% e, entre 2022 e 2023, atingiu 249%. Em comparação, o aumento de casos animais foi de 428% e 345%, respectivamente, nos mesmos períodos (Mesquita et al., 2024).

A primeira evidência de esporotricose transmitida por gatos foi documentado nos EUA, em 1952 e de 1907 a 2007, descobriu-se que a esporotricose pode ser causada por pelo menos três espécies gênicas, *S. schenckii*, *S. brasiliensis* ou *S. globosa* (Gremião et al., 2020).

Tabela 1 - Distribuição da esporotricose no mundo no período de 2012 a 2022

Região	País / Localidade	Número de Casos
América do Norte	Canadá	2
	Estados Unidos	27
	México	1431
América Central e Caribe	Costa Rica	126
	Guatemala	65
	Honduras	1
	Panamá	1
	Caribe	2

Região	País / Localidade	Número de Casos
América do Sul	Argentina	38
	Brasil	5546
	Colômbia	50
	Chile	3
	Paraguai	23
	Peru	4792
	Uruguai	157
	Venezuela	452
Amazonas (Brasil)	Manaus	240
	Presidente Figueiredo	1
	Irاندوبا	3
	Careiro	1

Fonte: Hernandez-Castro et al., 2022; Boletim epidemiológico - FVS/AM, 2023 com adaptações

As espécies de *Sporothrix* não são igualmente distribuídas em todo o mundo, alguns regionalismos são observados: *S. brasiliensis* é encontrado no Brasil e na Argentina, o *S. globosa* é predominante na Ásia, enquanto *S. schenckii* é distribuído em todo o mundo (Gómez-Gaviria; Martínez-Álvarez; Mora-Montes, 2023).

Em 1950, na África do Sul, houve um surto de esporotricose, causado pelo fungo *Sporothrix* de origem ambiental, envolvendo 3.000 trabalhadores de uma mineração, nos Estados Unidos em por volta de 1980 ocorreu também um surto acometendo trabalhadores de reflorestamento que foram infectados com pinheiros e mudas de musgo (Corrêa-Junior et al., 2023).

2.2.2 América Latina

A América Latina é um dos principais focos de esporotricose humana e felina. Em humanos, a doença foi relatada em diversos países, com transmissão endêmica ocorrendo no Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, México, Paraguai, Chile e Uruguai. *Sporothrix brasiliensis* é a espécie mais comum identificada em casos humanos no Brasil, enquanto *Sporothrix schenckii* predomina em outros países. Os gatos domésticos são a principal

fonte de infecção no ciclo de transmissão zoonótica da esporotricose (Etchecopaz et al., 2020; Santos et al., 2024; Thomson et al., 2023).

2.2.3 Brasil

Em 1907, Adolph Lutz e Affonso Splendore relataram esporotricose em ratos marrons (*Ratus norvegicus*) coletados na cidade de São Paulo. Em 1955 foi reportado o primeiro caso de esporotricose em ser humano associado a um gato doente, em São Paulo, região sudeste do Brasil (Gremião et al., 2020).

No Brasil foram registados cerca de 12.000 casos de *S. brasiliensis* transmitidas por gatos no Rio de Janeiro no período de 2000 a 2017, considerado muito virulento, tem rapidamente se espalhado pelo Brasil, assim como Argentina e Paraguai sendo transmitida principalmente por gatos infectados através de arranhões, mordeduras e até espirros (Etchecopaz et al., 2021).

O *S. brasiliensis* tem sido responsável por surtos infecciosos em todo o território brasileiro acometido, e é considerado a espécie mais virulenta (Gómez-Gaviria; Martínez-Álvarez; Mora-Montes, 2023). Este fungo, surgiu no país como uma doença zoonótica transmitida de gatos infectados para humanos através de mordidas, arranhões ou contato com o exsudato das lesões cutâneas de gatos doentes. No Rio de Janeiro essa doença atingiu cerca de mais de 4.000 casos de esporotricose entre humanos e felinos e nos estados do Sudeste foram mais de 5.510 casos (Etchecopaz et al., 2021).

No período de 1997 a 2011, foram registrados 4.188 casos humanos de esporotricose associados às transmissões felinas no Rio de Janeiro, desde então, a doença tornou-se uma epidemia que atualmente se espalha em diferentes regiões do país (Gremião et al., 2017). Esta zoonose foi relatada no sul e regiões sudeste por quase três décadas e a expansão geográfica da esporotricose zoonótica para a região nordeste do país ocorreu nos últimos anos (Gremião et al., 2020).

2.2.4 Amazonas

A esporotricose tem preferência por regiões quentes e úmidas, sendo por esse motivo o Brasil e a América Latina um dos locais de maior prevalência da doença. Com isso observa-se um aumento expressivo no número de casos na região amazônica (FVS - RCP/AM, 2023; Mesquita et al., 2024). Devido à falta de políticas públicas e ao seu perfil de transmissão, de

acordo com Mesquita et al. (2024), o número de casos de esporotricose vem crescendo no Estado do Amazonas, por possuir as características favoráveis para o crescimento do fungo.

Segundo informações da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas - Dra. Rosemary Costa Pinto (FVS - RCP/AM, 2023), foram notificados no período de janeiro a maio de 2025, 2.105 casos de esporotricose animal, sendo confirmados 1.950 confirmados e 1.071 em tratamento e a maior quantidade de animais é de gatos (97,2%), seguidos de cães (2,8%) e os animais envolvidos em maior quantidade são os machos (FVS - AM, 2025).

No Amazonas conforme os dados mais recentes disponíveis no Informe Epidemiológico da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Dra. Rosimary Costa Pinto, foram notificados 603 casos de esporotricose humana no período de 1º de janeiro a 27 de maio de 2025, nas cidades de Manaus, Presidente Figueiredo, Barcelos, Manacapuru, Maués, Rio Preto da Eva, Careiro, Iranduba, Silves e Tabatinga (FVS - RCP/AM, 2025).

2.2.5 Esporotricose em gatos e sua distribuição geográfica

A esporotricose felina se manifesta de uma única lesão de pele a formas sistêmicas e disseminadas fatais e geralmente as lesões múltiplas ulcerativas são observadas na região da cabeça, nariz e patas (Gremião et al., 2015, 2020; Silva et al., 2022). A esporotricose foi relatada em diversos animais como tatu, camelo, cão, vaca, golfinho, camundongos, no entanto o gato doméstico é o animal mais suscetível a infecção e a sua entrada na cadeia de transmissão da esporotricose tem um grande significado no quadro epidemiológico (Angelo et al., 2023; De Carvalho et al., 2021).

O Brasil é o país com maior número de casos de esporotricose felina já notificados em todo o mundo. A esporotricose felina foi a primeira descrita no Brasil na década de 1950 e sua ocorrência permaneceu esporádica até a década de 1990 (Gremião et al., 2020).

Nos últimos anos o agente *S. brasiliensis* tem atraído atenção por causa dos surtos zoonóticos no Brasil, afetando tanto gatos domésticos quanto seres humanos (Nava-Pérez et al., 2022) A Figura 2 mostra os primeiros relatos da esporotricose no mundo, Brasil e estado do Amazonas.



Figura 2 - Linha do tempo esporotricose no Amazonas, Brasil e Mundo.

Fonte: MOTHE, G.B., et al 2023; Boletim epidemiológico, 2025, com adaptações.

2.3 Métodos de diagnóstico de esporotricose

O diagnóstico da esporotricose em animais é realizado combinando dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, incluindo teste citológico, exame direto, cultura, testes histopatológicos e sorológicos (De Carvalho et al., 2022; Orofino-Costa et al., 2017; Rodrigues et al., 2022b). No passado, um ensaio de aglutinação em látex, foi usado para auxiliar no diagnóstico da esporotricose meníngea, hoje não está mais disponível, e os testes sorológicos têm pouca utilidade em qualquer outra coisa que não seja a meningite (Thompson et al., 2021).

2.3.1 Exame direto

O exame direto é feito o esfregaço utilizando-se coloração Gram ou Giemsa, ou com KOH a 10%. Através desse método as estruturas são difíceis de serem visualizadas podendo se confundir com outros agentes e não é conclusivo para esporotricose, porém pode acelerar o diagnóstico em casos de lesões em gatos devido à elevada carga fúngica (Alvarez; Oliveira; Pires, 2022).

2.3.2 Histopatológico

No exame histopatológico as colorações mais utilizadas são hematoxilina-eosina (HE), impregnação pela prata de Grocott (IPG) e ácido periódico de Schiff (PAS) (Gremião et al., 2015; Silva et al., 2022). Na histopatologia há uma dificuldade de visualizar as formas leveduriformes, e é muitas vezes negativa, o que se deve em grande parte ao pequeno número de organismos necessários para causar doenças. As células de levedura ovóides têm 3–5 µm de diâmetro, formato oval a formato de charuto, e projeções eosinofílicas da levedura podem estar presentes, representando o corpo asteróide (Thompson et al., 2021).

2.3.3 Exame citológico

O exame citológico é recomendado na impossibilidade de realização da cultura micológica, e a coleta pode ser realizada por meio de *swab* com esfregaço na lâmina ou *imprint/decalque* sem limpeza prévia de lesão, corados pelas colorações do tipo Romanowsky, de baixo custo, rápido quando comparado com os demais métodos (Figura 3) (Gremião et al., 2020; Rodrigues et al., 2022b).

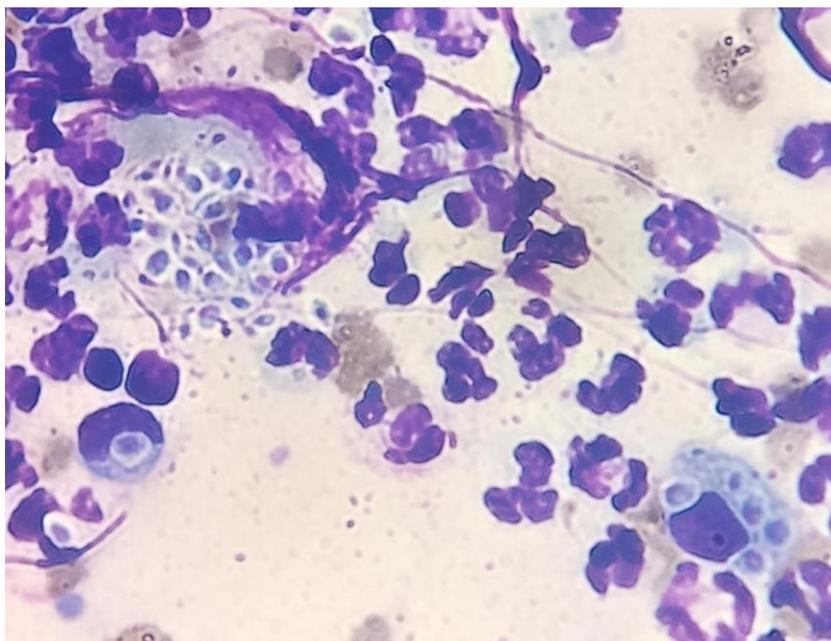


Figura 3 - Citologia de uma amostra coletada de um gato pelo método *imprint* da lesão de um gato e corado pelo método de Romanovsky. Imagem apresentando células ovaladas dando as características leveduriformes sugestivo de *Sporothrix* sp.

Autor: Arquivo pessoal

2.3.4 Cultura

O padrão-ouro para o diagnóstico baseia-se na cultura de secreções e amostras de tecido, pois a sua sensibilidade é baixa (Alvarez; Oliveira; Pires, 2022; Orofino-Costa et al., 2017). As amostras são normalmente semeadas no ágar dextrose Sabouraud (SDA) e no ágar mycosel por 7 a 21 dias à temperatura ambiente (Lacaz, 2002). O exame macroscópico de culturas à temperatura ambiente (fase micelial) pode inicialmente observar culturas pequenas que podem ficar pardas ou quase pretas (Orofino-Costa et al., 2017; Rodrigues et al., 2020). Microscopicamente, a forma micelial é observada como hifas septadas, finas, ramificadas e hialinas, com células conidiogênicas surgindo de hifas indiferenciadas, formando conídios de paredes espessas (hialinas ou marrons), pequenos ($2-3 \times 3-6 \mu\text{m}$), com um arranjo diferente, como a forma simpodial, aparecendo em pequenos grupos de dentículos em uma ligeira dilatação apical do conidióforo ou como sésseis (Figura 4) (De Lima Barros; De Almeida Paes; Schubach, 2011a; Rodrigues et al., 2022b). O crescimento no hospedeiro (fase de levedura), pode ser cultivada em meio de infusão cérebro-coração (BHI) com sangue (5%), ágar Sabouraud dextrose com 2% de glicose suplementado com sangue, ágar Mycosel modificado com 37 °C por até 7 dias (Mahajan, 2014; Rodrigues et al., 2022b). As colônias são de cor castanha ou creme e lisas. Micromorfológicamente, é possível observar células fusiformes e

ovais medindo 2,5–5 μm de diâmetro, como botões em forma de charuto em uma base estreita (Figura 5) (Da Cruz Bahiense Rocha et al., 2021; Rodrigues et al., 2022b).

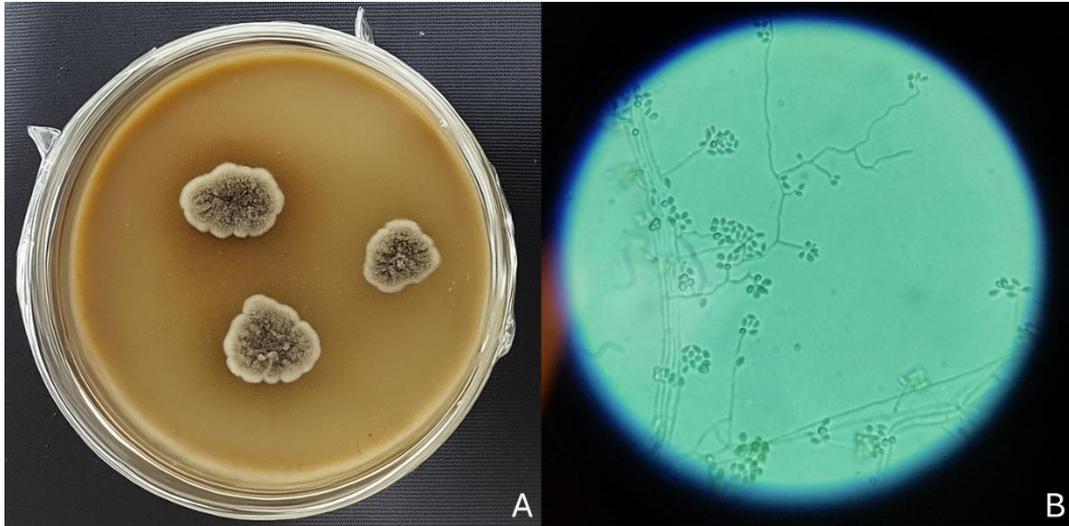


Figura 4 - Cultura de *Sporothrix* spp. Cultura em ágar Sabouraud acrescido de clorafenicol com crescimento em cinco dias (A). Microscopia com presença de hifas e microconídios agrupados em formato de uma margarida (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

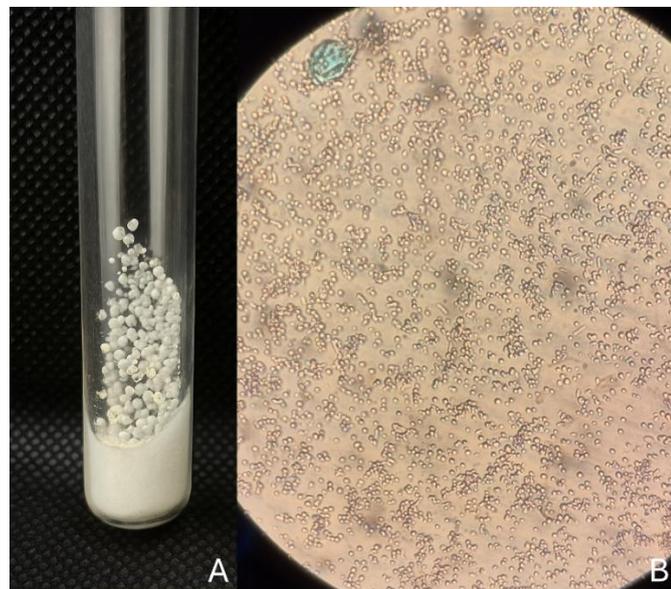


Figura 5 - Cultura leveduriforme de *Sporothrix* spp. Cultura em BHI ágar acrescido de clorafenicol, incubado a 37°C com crescimento em cinco dias (A). Microscopia com presença de células ovais e em forma de charuto agrupados em formato de uma margarida (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4 Diagnóstico com a reação de PCR

Os ensaios moleculares têm complementado e gradualmente substituído os testes micológicos clássicos para detectar e/ou diferenciar com rapidez e precisão moleculares em *Sporothrix* e o padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose tem sido o isolamento do fungo *in vitro* (De Carvalho et al., 2021). O diagnóstico de esporotricose através de métodos fenotípicos, embora apresentem custo reduzido, são trabalhosos, consomem muito tempo entre a coleta e o diagnóstico final e não permitem identificar a nível de espécie, pois apresentam características morfológicas e fisiológicas semelhantes (Rodrigues et al., 2020).

Para amplificar o material genético, a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi utilizada em 1985, pela primeira vez, por Mullis et al. Essa técnica fornece uma grande quantidade de DNA do material utilizado. E a reação em cadeia de polimerase se baseia em três etapas: desnaturação de DNA em temperaturas elevadas, recozimento de primer e extensão da polimerase. Para a utilização dessa técnica é necessário termociclador, um equipamento capaz de alterar as temperaturas de acordo com o ciclo, e os resultados são analisados por meio do gel de agarose (Ghannam; Varacallo, 2023; Kadri; Kadri, 2019; Khehra; Padda; Swift, 2023).

O diagnóstico de esporotricose com reação de PCR foi descrito em 2001, por Kano et al., eles identificaram o *S. schenckii* utilizando como alvo molecular na amplificação do DNA a quitina sintase I com a coloração de brometo de etídio onde foi possível detectar a partir de 10pg de DNA genômico (Kano et al., 2001).

HU et al. (2003), fizeram o primeiro relatório de um ensaio de PCR aninhado, para detectar o DNA de *S. schenckii* em amostras de tecido de camundongos servindo como modelo de esporotricose e em amostras clínicas de pacientes com a mesma doença micótica.

Estudos realizados por Rodriguez-Brito et al., com base no gene do rDNA 18S da espécie de *Sporothrix*, utilizando a PCR convencional, foi possível utilizar 20pg para detecção de esporotricose (Rodríguez-Brito et al., 2015).

2.4.1 Extração do DNA de *Sporothrix*

A extração do DNA de *Sporothrix* é um procedimento essencial para diversos estudos e esse processo permite obter o material genético, possibilitando a identificação de genes específicos, estudos genéticos e epidemiológicos e é de suma importância para a compreensão da sua estrutura genética e identificação de fatores de virulência (Della Terra et al., 2017; Luiz et al., 2022).

Com a extração do DNA é possível o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais precisos, identificação de marcadores moleculares para diferenciação das espécies, analisar a diversidade genética entre cepas de *Sporothrix*, e desenvolvimento de técnicas de detecção e identificação rápida desse fungo em amostras clínicas, permitindo um diagnóstico mais preciso e eficiente (Luiz et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Os métodos que já foram utilizados para extração de DNA de *Sporothrix* encontrado na literatura foram kits comerciais para extração de DNA (De Carvalho et al., 2022), protocolo Fast DNA (MP Biomedicals, Vista, CA, EUA) (Rodrigues et al., 2013; De Carvalho et al., 2020), DNeasyPowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) (Almeida-Silva et al., 2022; Rabello et al., 2022) e extração pelo método fenol-cloroformio-álcool isoamílico (Xu et al., 2010), Kit Invitrogen (USA)(Fernandes et al., 2023b).

A obtenção de DNA de alta qualidade é essencial para uma variedade de aplicações, desde análises filogenéticas até estudos de patogenicidade e resistência a medicamentos (Köser; Ellington; Peacock, 2014).

2.4.2 Alvos moleculares para detecção de *Sporothrix* por PCR

Os métodos padrão ouro para reconhecimento de espécies são baseados em sequências de DNA abrigadas em loci genômicos que codificam proteínas, como calmodulina, beta-tubulina e fator de alongamento de translação (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015a). Por volta dos anos de 1990 houve uma revolução da reação em cadeia de polimerase (PCR), com a sua característica de realizar várias cópias do DNA, e devido a amplificação o DNA ribossomal (rDNA) operon foi o foco principal para a realização dos estudos filogenéticos de fungos (Kausrud, 2023; Martin; Rygiewicz, 2005)

O espaçador transcrito interno (ITS) é um marcador de código de barras universal usado para identificação de fungos, o qual é recomendado para diagnóstico molecular das espécies de *Sporothrix*. As regiões ITS são biologicamente importantes no processamento dos RNA ribossomais, uma vez que formam estruturas secundárias específicas, imprescindíveis para o correto reconhecimento de locais de clivagem e para a ligação de proteínas e RNAs nucleolares durante a maturação dos ribossomas (Zhou et al., 2014).

As regiões ITS permitiram o desenvolvimento de primers altamente conservados para amplificar a maioria dos fungos e regiões variáveis permitiram o desenvolvimento de marcadores específicos de espécies e essas características contribuíram para que o ITS se tornasse o código de barra de DNA fúngico (Cheng et al., 2020a; Vu et al., 2019; Xu, 2016). A

identificação dos fungos de forma precisa é fundamental para registrar adequadamente esses organismos tanto em nível de gênero quanto de espécie (Bhunjun et al., 2021; Raja et al., 2017).

Em algumas situações as sequências de ITS não são suficientes para a identificação de espécies e revelar as relações filogenéticas e é comum combinar sequências ITS com outros fragmentos de genes que também codificam como por exemplo a calmodulina (CAL), a β -tubulina (BT2) e o fator de alongamento da tradução (EF-1 α) (Liu et al., 2007). Para determinar as espécies de *Sporothrix* os loci-codificação de proteínas mais utilizados são os marcadores Calmodulina (CAL), betatubulina (BT2) e o fator de alongação de tradução (EF-1 α) (De Carvalho et al., 2022; Kidd et al., 2025). A calmodulina é um marcador de identificação mais utilizado nos estudos para a identificação devido a facilidade de amplificação e de detecção das espécies patogênicas de *Sporothrix*, como as espécies *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis* (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015a)

No fluxo de trabalho de metabarcodificação do DNA está a anotação taxonômica das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e onde é utilizado bases de dados como UNITE ou INSD, as anotações taxonômicas podem ser feitas por diversas maneiras utilizando sequências de referência taxinômica conhecida e a abordagem mais simples é a BLAST (Kausrud, 2023). Para detecção de patógenos fúngicos pode-se utilizar cluster de gene RNA ribossômico em fragmentos de DNA, esse cluster é composto por centenas de unidades onde cada unidade contém genes que codificam a subunidade de RNA ribossômico (18S), ITS 1 e 2 que são separadas pela subunidade rRNA 5.8S a subunidade rRNA (28S) e toda a região do fragmento é de 500 a 750pb (Cheng et al., 2020b).

A amplificação de RFLP-PCR com os primers (CDM5e CDM6) amplificados com o gene calmodulina com um fragmento de 800pb e digerido com a enzima Hha I (5'-GCGC-3') pode ser empregado para produzir perfis específicos para as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* (Lopes-Bezerra et al., 2018).

Nos estudos filogenéticos de grupos fúngicos divergentes o EF-1 α é o segundo gene alvo mais comum utilizado no diagnóstico molecular de fungos, ou seja, é o código de barra de DNA secundário, e é de codificação nuclear única com sequências conservadas entre as espécies (Raja et al., 2017).

2.5 Técnica de RFLP-PCR

O polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) foi desenvolvido por Alec Jeffreys em 1984 (McDonald; Lehman, 2012).

A esporotricose no Japão era comum nas décadas de 1940 a 1980 e a epidemiologia molecular foi influenciada por RFLP E PCR-RFLPs análise do mtDNA o qual revelou os dois cladros principais (Rodrigues, 2022).

O Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), é uma técnica onde amostra de DNA são digeridas com enzimas endonucleases específicas para cada fragmento utilizando diferentes combinações de nucleotídeos nos primers seletivos resultando comprimentos característicos de cada espécie (Santos et al., 2010a). Essa técnica é simples de realizar, requer equipamento de biologia molecular, fornece resultados reconhecíveis e é facilmente reproduzível para a maioria dos laboratórios de diagnósticos (Jiang; Jiang, 2013).O método pode ser combinado com PCR (RFLP-PCR), que consiste na amplificação seletiva dos fragmentos utilizando diferentes combinações de nucleotídeos nos primers seletivos (De Carvalho et al., 2022).

O ensaio de triagem RFLP-PCR por ser barato, rápido, fácil e simples de interpretar é uma alternativa para a identificação de fungos, e do ponto de vista clínico e epidemiológico é importante ter um método confiável para a identificação rápida e precisa das espécies de *Sporothrix* (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2014b). A Figura 5 mostra as etapas de um RFLP.

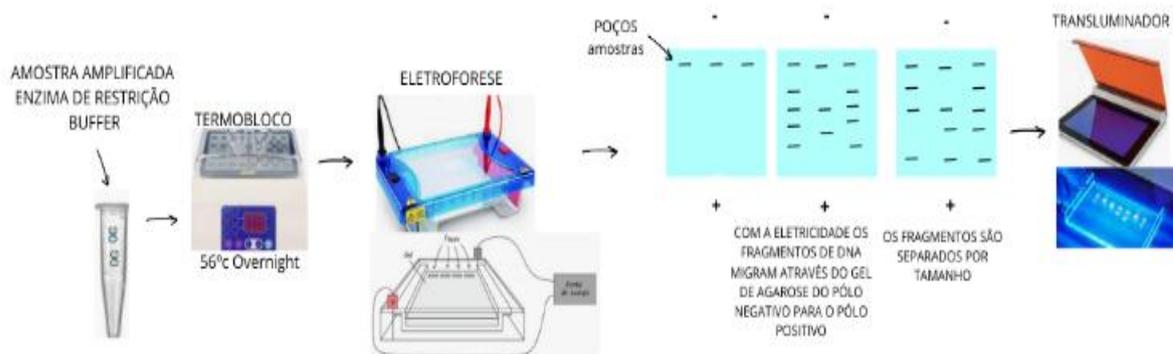


Figura 6 - Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição – RFLP

Uma grande vantagem do RFLP e do RFLP-PCR é seu baixo custo, que facilita sua utilização em laboratórios de rotina (Rohit et al., 2016)

2.5.1 Análise *in silico*

As ferramentas biomolecular e de bioinformática são ferramentas que facilitam a criação de biomarcadores específicos para cada microorganismo. A tecnologia da bioinformática (NEBcutter V3.0) é uma ferramenta online desenvolvida pela New England

Biolabs (NEB) está disponível gratuitamente na web para análises de sequência de DNA com enzimas de restrição de maneira conveniente e de fácil uso (Vincze, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), tem ajudado os diversos laboratórios a acelerar o processo de diagnóstico, por ser confiável e eficiente, e esse procedimento é de grande importância juntamente com o padrão-ouro mesmo este sendo demorado (Valones et al., 2009). E durante a espera do resultado do padrão-ouro o estudo *in silico* facilita realizar simulações e testes para ganhar tempo e economia de material durante os experimentos *in vitro* (Garre et al., 2019). Os estudos *in silico* são realizados utilizando sequências de rDNA do gênero *Sporothrix*, depositadas no GenBank, uma base de dados genômica que ficam disponíveis para acesso.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Investigar o aprimoramento da detecção molecular de espécies do gênero *Sporothrix* por meio da comparação de diferentes métodos de extração de DNA e da avaliação da sensibilidade de distintos marcadores moleculares amplificados por PCR.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a eficácia de três diferentes métodos de extração de DNA (fenol-clorofórmio, kit comercial e precipitação por sal);
- Avaliar a eficiência da amplificação de DNA de *Sporothrix brasiliensis* por PCR utilizando três pares de primers direcionados a diferentes regiões do DNA ribossomal;
- Realizar análise *in silico* de RFLP-PCR com diferentes enzimas de restrição (HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI) aplicadas à região ITS;
- Confirmar a identidade molecular dos isolados aleatórios de *Sporothrix* regionais, através da árvore filogenética, baseada na região ITS com 5 isolados da referência (*S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*) e 4 isolados provenientes da Amazônia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

O estudo proposto é uma pesquisa laboratorial experimental, de natureza descritiva e analítica. A abordagem envolve técnicas moleculares, incluindo extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e análises filogenéticas. O foco principal foi desenvolver e validar uma abordagem RFLP-PCR para identificar espécies patogênicas de *Sporothrix* em gatos na cidade de Manaus.

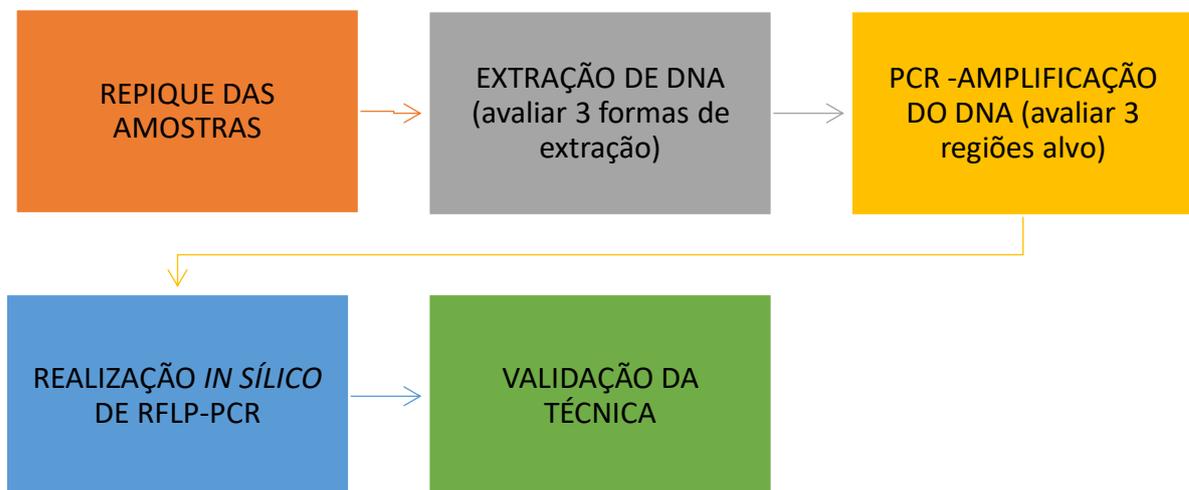


Figura 7 - Fluxograma da metodologia e dos procedimentos

4.2 Cepas padrão

Foram utilizadas cepas padrão de *Sporothrix* para fins de comparação e identificação das espécies. As cepas que serão utilizadas são *S. schenckii* (ATCC CFP 00746), e *S. brasiliensis* (ATCC MYA-4606), obtidas do American Type Culture Collection (ATCC), *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. E *Sporothrix* amostra regional do acervo do INPA que foram coletados de felinos em uma clínica veterinária na Cidade de Manaus.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Avaliação a eficácia de três diferentes métodos de extração de DNA (fenol-clorofórmio, colunas de sílica e precipitação por sal)

Com o objetivo de avaliar o desempenho de diferentes métodos de extração de DNA para aplicações moleculares em *Sporothrix* spp., foram comparadas três abordagens distintas: extração por colunas de sílica, por precipitação por sal e por fenol-clorofórmio. Todas as extrações foram realizadas com amostras de culturas fúngicas (~200 mg), previamente cultivadas em ágar Sabouraud.

- a) Extração com colunas de sílica (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha):

A extração com membrana de sílica foi realizada utilizando o kit (DNeasy Blood & Tissue, 2023), conforme o protocolo do fabricante. As amostras foram tratadas com 20 µL de proteinase K e 180 µL de tampão AL, incubadas a 56 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de etanol absoluto, e a solução foi transferida para colunas contendo membranas de sílica. Após centrifugação, foram realizadas lavagens com 500 µL dos tampões AW1 e AW2. A eluição final foi realizada com 100 µL de tampão ATE (Tris-EDTA, pH 9,0), coletando o DNA genômico na fase aquosa. Essa metodologia é baseada na afinidade do DNA com superfícies de sílica sob alta força iônica, permitindo eficiente purificação mesmo na presença de contaminantes celulares.

- b) Extrações baseadas em precipitação por sal (MasterPure DNA Purification Kit for BloodVersion II, Epicentre, Madison, WI, EUA):

O método de salinização incluiu a lise celular com SDS e proteinase K, seguida da adição de acetato de sódio 3M para precipitação de proteínas e outros contaminantes. Após centrifugação, o DNA na fase superior foi precipitado com etanol absoluto e lavado com etanol 70%.

- c) Extrações de DNA fenol-clorofórmio, com uma adaptação para o uso de esferas de vidro (0,45 mm) na desagregação celular, visando as frações de polaridade.

A extração por fenol-clorofórmio foi realizada com base no método clássico de fenol:clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1), Ferrer et al. (2001) com adaptações, com adaptação para utilização de esferas de vidro de 0,45mm para lise mecânica celular. As amostras fúngicas foram transferidas para tubos contendo as esferas e misturadas com 500 µl tampão de lise, passaram por choque térmico em termobloco e as amostras passaram por choque térmico em termobloco a 85 °C por 15 minutos. Para maior eficiência na ruptura da parede celular de *Sporothrix*, as amostras foram submetidas à congelamento a -80 °C por 30 minutos, seguido de aquecimento em banho-maria a 100 °C por mais 60 minutos. Em seguida, foi realizada maceração vigorosa da biomassa utilizando palitos de swab (sem algodão), e adicionados mais

500 µL de tampão de lise, totalizando 1000 µL. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos. Foi então adicionado 20 µL de proteinase K, e as amostras incubadas a 56 °C por 1 hora em termobloco para digestão de proteínas.

As amostras foram agitadas por 30 segundos em vórtex e em seguida, adicionou-se 500 µL da solução orgânica fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), sendo a mistura homogeneizada por inversão (100x) — o uso de vórtex foi evitado nesta etapa para prevenir a fragmentação do DNA. A separação das fases foi realizada por centrifugação a 13.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi cuidadosamente transferido para novo microtubo de 2 mL contendo 500 µL de isopropanol. A homogeneização para precipitação do DNA foi feita por inversão (50x).

Após o período de precipitação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, mantendo o pellet de DNA. A purificação foi realizada com duas lavagens em etanol 70%: em cada uma, adicionou-se 500 µL de etanol, seguido de homogeneização por inversão e centrifugação a 13.500 rpm por 15 minutos. O etanol residual foi completamente eliminado utilizando pipeta de 200 µL. Para remoção de vestígios de álcool, os microtubos permaneceram semiabertos em termobloco a 65 °C por 10 minutos. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão de eluição TE, sendo os microtubos devidamente identificados com informações sobre a amostra, data e concentração. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até completa eluição e, posteriormente, armazenadas em geladeira específica para DNA extraído.

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (Gene Quant pro RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 260 nm, onde uma unidade de absorvância será equivalente a 50 µg/ml. A pureza do DNA foi avaliada pela relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm. Uma diluição 1:50 foi preparada utilizando 4 µL do DNA bruto e 196 µL de água MilliQ. A leitura foi realizada na função “DNA”, com ajuste prévio do fator de diluição. Os parâmetros de concentração (ng/µL) e razão de pureza (A260/280 e A260/230) foram anotados. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração desejada para uso em PCR, de acordo com a fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

As amostras diluídas foram armazenadas em tampão TE, em microtubos de 500 µL, devidamente rotulados e mantidos na geladeira de DNA extraído.

4.3.2 Comparação da eficiência da amplificação de DNA de *Sporothrix brasiliensis* por PCR

Foram avaliados três métodos baseados em PCR para a detecção de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, utilizando amostras com diferentes concentrações de DNA de *S. brasiliensis* (20, 2, 0,2, 0,02 e 0,002ng) para amplificação, com o objetivo de determinar o limite de detecção de cada protocolo. As análises foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, conforme especificado.

Este estudo visou comparar três marcadores moleculares específicos conforme descrição no quadro 1 — ITS (White et al., 1990), ITS/LSU (Santos et al., 2010) e D1/D2 do 28S (LSU rRNA nuclear) (Kurtzman et al., 2006) — no contexto da amplificação de *S. brasiliensis* (CFP 00551) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

Quadro 1 - Referências de primers para cada região alvo

REGIÃO	PRIMER FORWARD	SEQUÊNCIA DO PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	SEQUÊNCIA DO PRIMER REVERSE	REFERÊNCIA
ITS	ITS1	5'- TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3'	ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'	White et al., 1990
ITS/LSU	ITS5	5'- GGAAGTAAAAGTC GTAACAAG-3'	NL4	5'- GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3'	Santos et al., 2010
D1/D2 do 28S (LSU rRNA nuclear)	NL1	5'- GCATATCAATAAGC GGAGGAAAAG-3'	NL4	5'- GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3'	Kurtzman et al., 2006

Fonte: White et al., 1990; Hong et al., 2005; Santos et al., 2010; Kurtzman et al., 2006.

Para cada marcador, o limite de detecção foi meticulosamente avaliado, empregando uma série de diluições de DNA em dez concentrações distintas, variando de 100 ng/μL a 1 pg/μL. As amostras foram submetidas à PCR em um termociclador padrão, sob condições rigorosamente otimizadas para cada marcador, como está descrito no quadro 2, consistindo em um protocolo de 35 ciclos de amplificação.

Quadro 2 - Procedimentos de Reação de PCR para Cada Marcador Molecular

Marcador	Primers	Composição da mistura de reação	Condições de PCR	Referência
ITS	Forward (ITS1): 5'- TCCGTAGGTGAA	VOL. P/ 1 REAÇÃO (30μL) H2O Milli-Q = 14,5 μL	Desnaturação: 94 °C por 5 minutos	White et al., 1990

	CCTGCGG-3' Reverse (ITS4): 5'- TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3'	Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 58 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 10 minutos	
ITS/LSU	ITS5: 5'- GGAAGTAAAAG TCGTAACAAG-3' NL4: 5'- GGTCCGTGTTTC AAGACGG-3'	VOL. P/ 1 REAÇÃO (30µL) H2O Milli-Q = 14,5 µL Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	Inicial Desnaturação: 94 °C por 3 minutos 35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 56,5 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 10 minutos	Santos et al., 2010
D1/D2 LSU Rrna	Forward (NL1): 5'- GCATATCAATAA GCGGAGGAAAA G-3' Reverse (NL4): 5'- GGTCCGTGTTTC AAGACGG-3'	VOL. P/ 1 REAÇÃO (30µL) H2O Milli-Q = 14,5 µL Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	Inicial Desnaturação: 94 °C por 3 minutos 35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 50 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 7 minutos	Kurtzman et al., 2006

4.3.3 Análise *in silico* de RFLP-PCR

Utilizando software de análise genética (NEBcutter V3.0), foram avaliadas as enzimas de restrição (HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI) na região de amplificação (ITS) com as 3

espécies de fungo *Sporothrix*. Esta análise visou identificar padrões únicos de fragmentos que permitam a diferenciação clara entre *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. schenckii*, mas também as demais espécies causadoras da esporotricose.

O NEBcutter V3.0 é uma ferramenta online desenvolvida pela New England Biolabs (NEB) para análises de sequências de DNA com enzimas de restrição. Suas principais funcionalidades incluem: 1) Mapeamento de restrição: onde pode-se inserir uma sequência de DNA no formato FASTA ou texto simples e a ferramenta poderá identificar e marcar todos os sítios de reconhecimento para uma vasta gama de enzimas de restrição. 2) Seleção de Enzima: A ferramenta permite selecionar enzimas específicas ou grupos de enzimas. 3) Análise de Fragmentos Gerados: Após a digestão *in silico*, O NEBcutter V3.0 exibe o tamanho dos fragmentos de DNA gerados. 4) Visualização Gráfica: A ferramenta oferece uma representação gráfica dos sítios de restrição ao longo da sequência, facilitando a visualização. 5) Opções de Busca Avançada: A ferramenta oferece opções de refinar a busca por enzimas com características específicas, como enzimas não metil-sensíveis ou aquelas que requerem cofatores específicos. 6) Comparação de Sequências: A ferramenta consegue comparar múltiplas sequências lado a lado na mesma análise de digestão e facilita a comparação dos padrões de cortes gerados.

4.3.4 Confirmação da identidade molecular dos isolados aleatórios de *Sporothrix* regionais

A identidade molecular dos isolados regionais de *Sporothrix* spp. foi confirmada por meio de análise filogenética baseada na região ITS. Para a construção da árvore filogenética, foram utilizadas sequências de cinco isolados de referência disponíveis no GenBank, representando as espécies *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix globosa*. Como controles externos, foram incluídos isolados de *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Além disso, foram analisados quatro isolados clínicos provenientes da região Amazônica, obtidos da coleção fúngica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento das sequências pelo método Neighbor-Joining, utilizando suporte de *bootstrap* para avaliar a confiabilidade dos agrupamentos, por meio do software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

4.3.5 Análise estatística

Os experimentos foram feitos em triplicata, cada experimento de PCR foi feito três vezes para cada concentração de DNA e para cada marcador molecular (ITS, ITS/LSU, D1/D2 do 28S). Foram registrados os valores obtidos das amplificações, como a intensidade das bandas de PCR ou a quantidade de produto amplificado.

No cálculo da Média (M), foram somados os valores e dividido por 3 para cada conjunto de três medidas. Da mesma forma foi feito para realizar o cálculo do Desvio Padrão.

Para a análise de variância foi utilizado (ANOVA), para determinar se houve diferenças estatísticas significativa entre as médias dos diferentes grupos utilizando a ferramenta estatística do Excel.

5 RESULTADOS

Os resultados e discussões da presente dissertação serão apresentados na forma de artigo científico para a Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde – RECIIS.

ARTIGO ORIGINAL

"Otimização de Métodos Moleculares e Laboratoriais para Detecção e Diferenciação de Espécies de *Sporothrix* na Amazônia"

Danielle Barreto de Almeida [1], Nayara de Fátima Lazameth Diniz [2], Vanessa de Sá Pinheiro [1,2], Flávia da Silva Fernandes [3], Ana Cláudia Alves Cortez [2] e João Vicente de Braga de Souza [2].

[1] Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus – AM, Brasil.

[2] Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus - AM, Brasil.

[3] Laboratório Temático de Biologia Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus - AM, Brasil.

Resumo

A esporotricose, causada por espécies do gênero *Sporothrix*, é uma zoonose emergente na Amazônia. Este estudo avaliou três métodos de extração de DNA (fenol-clorofórmio, colunas de sílica e sal) e três regiões-alvo (ITS, ITS/LSU e D1/D2 do 28S) para diagnóstico molecular por PCR. O método de fenol-clorofórmio apresentou melhor rendimento e pureza. O par de primers ITS1–ITS4 foi o mais sensível, detectando até 0,0002 ng de DNA. A análise *in silico* com cinco enzimas de restrição (HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI) indicou alta similaridade nos perfis de fragmentação entre as espécies de *Sporothrix*, com diferenças inferiores a 20 pb, limitando a diferenciação por PCR-RFLP. No entanto, a PCR-RFLP foi eficiente para distinguir *Sporothrix spp.* de fungos não relacionados (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*). Análises filogenéticas com a região ITS confirmaram que todos os isolados regionais pertencem ao clado de *S. brasiliensis*. O estudo contribui para o aprimoramento do diagnóstico molecular da esporotricose na Amazônia.

Palavras-chave: *Sporothrix*, Diagnóstico molecular, PCR, Extração de DNA, Amazônia

Introdução

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por espécies do gênero *Sporothrix*, caracterizada por uma ampla distribuição geográfica e impacto crescente em humanos e animais (Morgado et al., 2022). Na região Amazônica, a esporotricose tem emergido como um problema de saúde pública devido à alta prevalência em gatos e sua transmissão zoonótica (Mesquita et al., 2024c). Este cenário é agravado pela ausência de métodos diagnósticos rápidos e precisos, que são essenciais para o manejo clínico e controle epidemiológico (Rodrigues, 2022). Métodos moleculares, como a PCR, têm potencial para superar as limitações das abordagens convencionais, como cultura e coloração direta, que frequentemente apresentam baixa sensibilidade e especificidade (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015b). Apesar de avanços em estudos moleculares, a padronização de métodos que otimizem a detecção de *Sporothrix* permanece limitada, especialmente em áreas endêmicas com recursos tecnológicos restritos (Rodrigues et al., 2022a).

Estudos prévios demonstraram a eficácia da PCR na detecção de *Sporothrix* utilizando marcadores como ITS, calmodulina (CAL) e região D1/D2 do RNA ribossomal (rRNA) (Ezeonuegbu et al., 2022; Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015c). Esses marcadores têm sido amplamente utilizados para a diferenciação de espécies e avaliação da diversidade genética em contextos epidemiológicos (Ezeonuegbu et al., 2022; Tekpinar; Kalmer, 2019b). Na Amazônia, investigações envolvendo cepas de *Sporothrix* ainda são incipientes, com poucos estudos explorando amostras clínicas e ambientais dessa região (Gonçalves et al., 2024a). Pesquisas conduzidas em outras áreas tropicais indicam que a variabilidade genética das espécies pode influenciar sua virulência e resistência antifúngica, o que torna urgente a realização de estudos regionais (Machado et al., 2025; Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015c). Referências relevantes incluem trabalhos de White et al. (1990), Hong et al. (2005) e O'Donnell (1993), que estabeleceram a base para o uso dos marcadores ITS, CAL e rDNA em análises moleculares de fungos.

Embora métodos moleculares tenham sido validados em outros contextos, a falta de estudos direcionados às populações locais de *Sporothrix* dificulta a aplicação prática desses métodos na Amazônia (Machado et al., 2025). Questões como o desempenho de diferentes métodos de extração de DNA, sensibilidade e especificidade dos marcadores moleculares e a reprodutibilidade dos resultados permanecem sem respostas claras (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2014a). Além disso, a ausência de validação experimental e *in silico* para combinações de marcadores e enzimas de restrição limita a implementação de técnicas como a

RFLP-PCR, que poderia oferecer soluções rápidas e acessíveis para identificação de espécies em cenários clínicos e ambientais (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015b).

Este estudo avaliou estratégias para aprimorar o diagnóstico molecular da esporotricose na Amazônia, com foco em populações felinas. Foram comparados diferentes métodos de extração de DNA e regiões-alvo do DNA ribossomal para amplificação por PCR. Também foi realizada uma análise de potencial para diferenciação de espécies por PCR-RFLP, cujos resultados mostraram limitações na distinção entre espécies do complexo *Sporothrix*. A análise filogenética confirmou a predominância de *S. brasiliensis* nos isolados regionais. Os achados contribuem para o desenvolvimento de protocolos diagnósticos mais sensíveis e adequados à realidade laboratorial da região, fortalecendo a vigilância de micoses na Amazônia.

Material e Métodos

Tipo de Estudo

O estudo proposto é uma pesquisa laboratorial experimental, de natureza descritiva e analítica. A abordagem envolve técnicas moleculares, incluindo extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e análises filogenéticas. O foco principal foi desenvolver e validar uma abordagem RFLP-PCR para identificar espécies patogênicas de *Sporothrix* em gatos na cidade de Manaus.

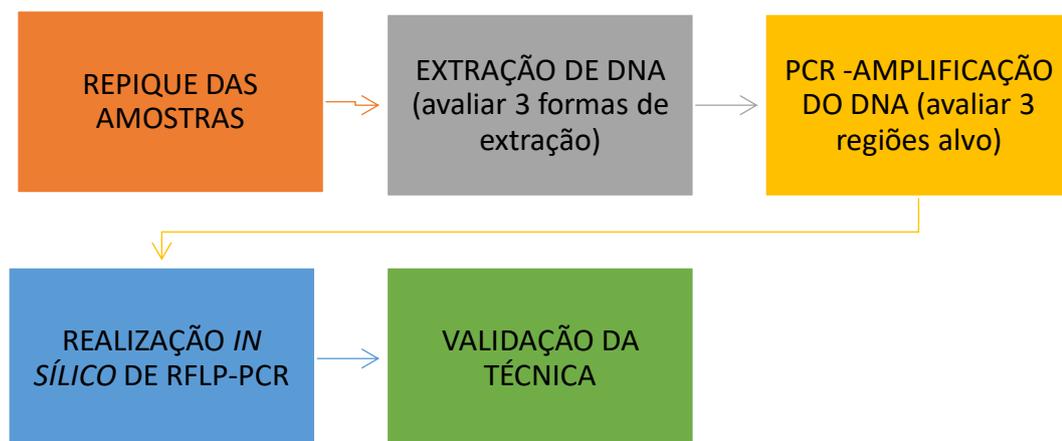


Figure 1 - Fluxograma da metodologia e dos procedimentos

Cepas Padrão

Foram utilizadas cepas padrão de *Sporothrix* para fins de comparação e identificação das espécies. As cepas que serão utilizadas são *S. schenckii* (ATCC CFP 00746), e *S. brasiliensis* (ATCC MYA-4606), obtidas do American Type Culture Collection (ATCC), *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. E *Sporothrix* amostra regional do acervo do INPA que foram coletados de felinos em uma clínica veterinária na Cidade de Manaus.

Procedimentos

Avaliação da eficácia de três diferentes métodos de extração de DNA (fenol-clorofórmio, kit comercial e precipitação por sal)

Com o objetivo de avaliar o desempenho de diferentes métodos de extração de DNA para aplicações moleculares em *Sporothrix spp.*, foram comparadas três abordagens distintas: extração por colunas de sílica, por precipitação por sal e por fenol-clorofórmio. Todas as extrações foram realizadas com amostras de culturas fúngicas (~200 mg), previamente cultivadas em ágar Sabouraud.

- a) Extração com colunas de sílica (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha):

A extração com membrana de sílica foi realizada utilizando o kit (DNeasy Blood & Tissue, 2023), conforme o protocolo do fabricante. As amostras foram tratadas com 20 µL de proteinase K e 180 µL de tampão AL, incubadas a 56 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de etanol absoluto, e a solução foi transferida para colunas contendo membranas de sílica. Após centrifugação, foram realizadas lavagens com 500 µL dos tampões AW1 e AW2. A eluição final foi realizada com 100 µL de tampão ATE (Tris-EDTA, pH 9,0), coletando o DNA genômico na fase aquosa. Essa metodologia é baseada na afinidade do DNA com superfícies de sílica sob alta força iônica, permitindo eficiente purificação mesmo na presença de contaminantes celulares.

- b) Extrações baseadas em precipitação por sal (MasterPure DNA Purification Kit for BloodVersion II, Epicentre, Madison, WI, EUA):

O método de salinização incluiu a lise celular com SDS e proteinase K, seguida da adição de acetato de sódio 3M para precipitação de proteínas e outros contaminantes. Após centrifugação, o DNA na fase superior foi precipitado com etanol absoluto e lavado com etanol 70%.

- c) Extrações de DNA fenol-clorofórmio, com uma adaptação para o uso de esferas de vidro (0,45 mm) na desagregação celular, visando as frações de polaridade.

A extração por fenol-clorofórmio foi realizada com base no método clássico de fenol:clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1), Ferrer et al. (2001) com adaptações, com adaptação para utilização de esferas de vidro de 0,45mm para lise mecânica celular. As amostras fúngicas foram transferidas para tubos contendo as esferas e misturadas com 500 µl tampão de lise, passaram por choque térmico em termobloco e as amostras passaram por choque térmico em termobloco a 85 °C por 15 minutos. Para maior eficiência na ruptura da parede celular de *Sporothrix*, as amostras foram submetidas à congelamento a -80 °C por 30 minutos, seguido de aquecimento em banho-maria a 100 °C por mais 60 minutos. Em seguida, foi realizada maceração vigorosa da biomassa utilizando palitos de swab (sem algodão), e adicionados mais 500 µL de tampão de lise, totalizando 1000 µL. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos. Foi então adicionado 20 µL de proteinase K, e as amostras incubadas a 56 °C por 1 hora em termobloco para digestão de proteínas.

As amostras foram agitadas por 30 segundos em vórtex e em seguida, adicionou-se 500 µL da solução orgânica fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), sendo a mistura homogeneizada por inversão (100x) — o uso de vórtex foi evitado nesta etapa para prevenir a fragmentação do DNA. A separação das fases foi realizada por centrifugação a 13.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi cuidadosamente transferido para novo microtubo de 2 mL contendo 500 µL de isopropanol. A homogeneização para precipitação do DNA foi feita por inversão (50x).

Após o período de precipitação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, mantendo o pellet de DNA. A purificação foi realizada com duas lavagens em etanol 70%: em cada uma, adicionou-se 500 µL de etanol, seguido de homogeneização por inversão e centrifugação a 13.500 rpm por 15 minutos. O etanol residual foi completamente eliminado utilizando pipeta de 200 µL. Para remoção de vestígios de álcool, os microtubos permaneceram semiabertos em termobloco a 65 °C por 10 minutos. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão de eluição TE, sendo os microtubos devidamente identificados com informações sobre a amostra, data e concentração. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até completa eluição e, posteriormente, armazenadas em geladeira específica para DNA extraído.

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (Gene Quant pro RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 260 nm, onde uma unidade de

absorbância será equivalente a 50 µg/ml. A pureza do DNA foi avaliada pela relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm.. Uma diluição 1:50 foi preparada utilizando 4 µL do DNA bruto e 196 µL de água MilliQ. A leitura foi realizada na função “DNA”, com ajuste prévio do fator de diluição. Os parâmetros de concentração (ng/µL) e razão de pureza (A260/280 e A260/230) foram anotados. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração desejada para uso em PCR, de acordo com a fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

As amostras diluídas foram armazenadas em tampão TE, em microtubos de 500 µL, devidamente rotulados e mantidos na geladeira de DNA extraído.

Comparação da eficiência da amplificação de DNA de *Sporothrix brasiliensis* por PCR

Foram avaliados três métodos baseados em PCR para a detecção de *S. brasiliensis*, utilizando amostras com diferentes concentrações de DNA de *S. brasiliensis* e *S. schenkii* (20, 2, 0,2 0,002, 0,0002 ng) para amplificação, com o objetivo de determinar o limite de detecção de cada protocolo. As análises foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, conforme especificado.

Este estudo visou comparar três marcadores moleculares específicos conforme descrição no quadro 1— ITS: (White et al., 1990), ITS/LSU (Santos et al., 2010) e D1/D2 do 28S (LSU r RNA nuclear) (Kurtzman et al., 2006.) — no contexto da amplificação de *S. brasiliensis* (CFP 00551) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

Quadro 1 - Referências de primers para cada região alvo

REGIÃO	PRIMER FORWARD	SEQUÊNCIA DO PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	SEQUÊNCIA DO PRIMER REVERSE	REFERÊNCIA
ITS	ITS1	5'- TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3'	ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'	White et al., 1990
ITS/LSU	ITS5	5'- GGAAGTAAAAGTC GTAACAAG-3'	NL4	5'- GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3'	Santos et al., 2010
D1/D2 do 28S (LSU rRNA nuclear)	NL1	5'- GCATATCAATAAGC GGAGGAAAAG-3'	NL4	5'- GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3'	Kurtzman et al., 2006

Fonte: White et al., 1990; Hong et al., 2005; Santos et al., 2010; Kurtzman et al., 2006.

Para cada marcador, o limite de detecção foi meticulosamente avaliado, empregando uma série de diluições de DNA em dez concentrações distintas, variando de 100 ng/µL a 1 pg/µL. As amostras foram submetidas à PCR em um termociclador padrão, sob condições

rigorosamente otimizadas para cada marcador, como está descrito na Quadro 2, consistindo em um protocolo de 35 ciclos de amplificação.

Quadro 2 - Procedimentos de Reação de PCR para Cada Marcador Molecular

Marcador	Primers	Composição da mistura de reação	Condições de PCR	Referência
ITS	Forward (ITS1): 5'- TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3' Reverse (ITS4): 5'- TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3'	VOL. P/ 1 REAÇÃO (30µL) H2O Milli-Q = 14,5 µL Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	Desnaturação: 94 °C por 5 minutos 35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 58 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 10 minutos	White et al., 1990
ITS/LSU	ITS5: 5'- GGAAGTAAAAG TCGTAACAAG-3' NL4: 5'- GGTCCGTGTTTC AAGACGG-3'	VOL. P/ 1 REAÇÃO (30µL) H2O Milli-Q = 14,5 µL Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	Inicial Desnaturação: 94 °C por 3 minutos 35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 56,5 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 10 minutos	Santos et al., 2010
D1/D2 LSU rRNA	Forward (NL1): 5'- GCATATCAATAA GCGGAGGAAAA G-3' Reverse (NL4): 5'- GGTCCGTGTTTC AAGACGG-3'	VOL. P/ 1 REAÇÃO (30µL) H2O Milli-Q = 14,5 µL Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	Inicial Desnaturação: 94 °C por 3 minutos 35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 50 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 7 minutos	Kurtzman et al., 2006

Análise *in silico* de RFLP-PCR

Utilizando software de análise genética (NEBcutter V3.0), foram avaliadas as enzimas de restrição (HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI) na região de amplificação (ITS) com as 3 espécies de fungo *Sporothrix*. Esta análise visou identificar padrões únicos de fragmentos que permitam a diferenciação clara entre *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. schenkii*, mas também as demais espécies causadoras da esporotricose.

O NEBcutter V3.0 é uma ferramenta online desenvolvida pela New England Biolabs (NEB) para análises de sequências de DNA com enzimas de restrição. Suas principais funcionalidades incluem: 1) Mapeamento de restrição: onde pode-se inserir uma sequência de DNA no formato FASTA ou texto simples e a ferramenta poderá identificar e marcar todos os sítios de reconhecimento para uma vasta gama de enzimas de restrição. 2) Seleção de Enzima: A ferramenta permite selecionar enzimas específicas ou grupos de enzimas. 3) Análise de Fragmentos Gerados: Após a digestão *in silico*, O NEBcutter V3.0 exibe o tamanho dos fragmentos de DNA gerados. 4) Visualização Gráfica: A ferramenta oferece uma representação gráfica dos sítios de restrição ao longo da sequência, facilitando a visualização. 5) Opções de Busca Avançada: A ferramenta oferece opções de refinar a busca por enzimas com características específicas, como enzimas não metil-sensíveis ou aquelas que requerem cofatores específicos. 6) Comparação de Sequências: A ferramenta consegue comparar múltiplas sequências lado a lado na mesma análise de digestão e facilita a comparar os padrões de cortes gerados.

Confirmação da identidade molecular dos isolados aleatórios de *Sporothrix* regionais

A identidade molecular dos isolados regionais de *Sporothrix spp.* foi confirmada por meio de análise filogenética baseada na região ITS. Para a construção da árvore filogenética, foram utilizadas sequências de cinco isolados de referência disponíveis no GenBank, representando as espécies *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenkii* e *Sporothrix globosa*. Como controles externos, foram incluídos isolados de *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Além disso, foram analisados quatro isolados clínicos provenientes da região Amazônica, obtidos da coleção fúngica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A árvore filogenética foi construída com base no alinhamento das sequências pelo método Neighbor-Joining, utilizando suporte de *bootstrap* para avaliar a confiabilidade dos agrupamentos, por meio do software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Análise estatística

Os experimentos foram feitos em triplicata, cada experimento de PCR foi feito três vezes para cada concentração de DNA e para cada marcador molecular (ITS, ITS/LSU, D1/D2 do 28S). Foram registrados os valores obtidos das amplificações, como a intensidade das bandas de PCR ou a quantidade de produto amplificado.

No cálculo da Média (M), foram somados os valores e dividido por 3 para cada conjunto de três medidas. Da mesma forma foi feito para realizar o cálculo do Desvio Padrão.

Para a análise de variância foi utilizado (ANOVA), para determinar se houve diferenças estatísticas significativa entre as médias dos diferentes grupos utilizando a ferramenta estatística do Excel.

RESULTADOS

Eficiência dos métodos de extração de DNA

Com o objetivo de avaliar a eficácia de três métodos distintos de extração de DNA, foram analisadas as concentrações e purezas obtidas dos fungos *Sporothrix schenckii* ATCC CFP-00746, *Sporothrix brasiliensis* ATCC MYA-4606, *Sporothrix* amostra regional, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. Na Figura 2 apresentada estão descritas as concentrações médias e purezas obtidas utilizando os métodos Fenol-Clorofórmio, Método de Coluna e Precipitação por Acetato. O método Fenol-Clorofórmio resultou nas maiores concentrações médias, destacando-se *S. schenckii* ($86,81 \pm 81,61$ ng/ μ L) e *C. albicans* ($44,55 \pm 21,35$ ng/ μ L). O Método de Coluna apresentou menores concentrações médias em todas as espécies, sendo o valor mais elevado para *Sporothrix* amostra regional ($7,69 \pm 8,34$ ng/ μ L). No método de Precipitação por Acetato, as concentrações médias foram intermediárias, destacando-se *C. albicans* ($15,91 \pm 10,29$ ng/ μ L). Quanto à pureza do DNA, as razões de absorvância (260/280 nm) obtidas pelos três métodos ficaram entre 1,6 e 2,25, indicando purezas satisfatórias em todos os casos.

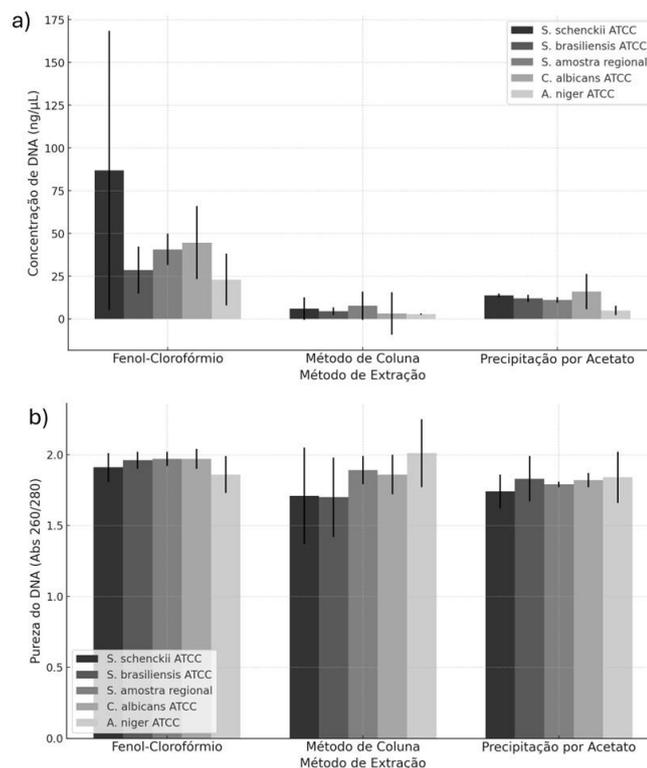


Figura 2 – Avaliação comparativa dos métodos de extração de DNA aplicados aos isolados fúngicos *Sporothrix schenckii* ATCC CFP-00746, *Sporothrix brasiliensis* ATCC MYA-4606, *Sporothrix* amostra regional, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. (a) Concentração média de DNA (ng/μL) obtida pelos métodos Fenol-Clorofórmio, Coluna de Sílica e Precipitação por Acetato. (b) Pureza média do DNA extraído, expressa pela razão das absorvâncias a 260/280 nm. As barras de erro representam o desvio padrão das medidas realizadas em triplicata.

Amplificação com diferentes marcadores moleculares

A eficiência da amplificação de DNA de *Sporothrix brasiliensis* foi avaliada utilizando três pares de primers direcionados a diferentes regiões do DNA ribossomal (Figura 3). Os primers ITS1–ITS4 amplificaram consistentemente a região alvo em todas as concentrações testadas, desde 20 ng até 0,0002 ng, demonstrando alta sensibilidade do marcador. A amplificação com os primers NL1–NL4 também apresentou boa eficiência, com bandas visíveis e de intensidade satisfatória até a concentração de 0,002 ng. Já os primers ITS5–NL4 geraram produtos de amplificação com boa intensidade de banda até 0,02 ng, apresentando uma sensibilidade menor em relação aos demais marcadores. Esses resultados indicam que todos os pares de primers foram capazes de amplificar o DNA de *S. brasiliensis* em diferentes faixas de

concentração, sendo os primers ITS1–ITS4 e NL1–NL4 foram os mais sensíveis dentre os testados.

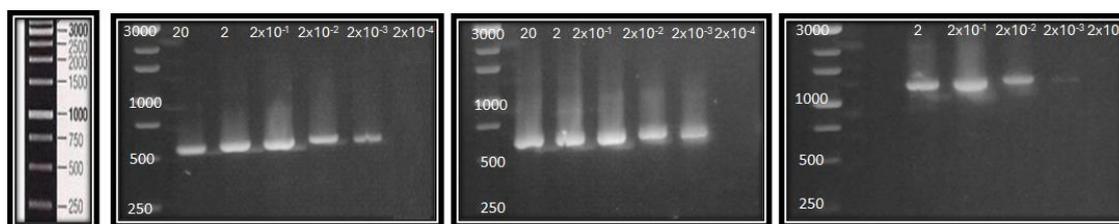


Figura 3 - Amplificação por PCR de regiões do DNA ribossomal de *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4606) utilizando os pares de primers ITS1–ITS4 (a), NL1–NL4 (b) e ITS5–NL4 (c), em uma curva de diluição seriada do DNA genômico (20 ng a 2×10^{-4} ng).

Análise de RFLP-PCR experimental e *in silico*

Com o objetivo de avaliar o potencial discriminatório de diferentes enzimas de restrição aplicadas à região ITS de espécies fúngicas, foi realizada uma análise *in silico* utilizando o software NEBcutter V3.0, com sequências tipo TYPE depositadas no GenBank. A Tabela 1 apresenta os fragmentos gerados pelas enzimas HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI para *Sporothrix brasiliensis* NR 147565.1, *Sporothrix schenckii* NR 14566.1, *Sporothrix globosa* NR 189348.1, *Aspergillus niger* NR 111348.1 e *Candida albicans* NR 125332.1. Entre as espécies do gênero *Sporothrix*, observou-se que os perfis gerados por cada enzima foram altamente semelhantes, com variações de até 2 pb em fragmentos maiores. Por exemplo, a enzima HaeIII produziu cinco fragmentos principais em *S. brasiliensis* (82, 33, 276, 21 e 116 pb), *S. schenckii* (81, 33, 276, 21 e 114 pb) e *S. globosa* (97, 33, 277, 21 e 113 pb). A enzima MspI gerou pares de fragmentos 463–65 pb, 462–63 pb e 479–62 pb para essas mesmas espécies, respectivamente. De forma similar, a enzima HinfI produziu perfis compostos por cinco fragmentos com variações entre 253 e 258 pb no fragmento maior. Embora tais diferenças possam ser observadas *in silico*, os fragmentos obtidos apresentam pesos moleculares muito próximos, com diferenças inferiores a 20 pb em sua maioria, o que pode limitar a diferenciação prática dessas espécies por PCR-RFLP. Por outro lado, *A. niger* e *C. albicans* apresentaram padrões de fragmentação distintos em todas as enzimas testadas, como observado com HaeIII (seis fragmentos para *A. niger*, dois fragmentos de 69 e 426 pb para *C. albicans*) e com DdeI (187–389 pb para *A. niger* e 397–98 pb para *C. albicans*), permitindo sua distinção em relação ao grupo *Sporothrix*.

Tabela 1. Fragmentos previstos (pb) por digestão *in silico* da região ITS com enzimas de restrição comerciais (HaeIII, MspI, HinfI e DdeI) em cinco espécies fúngicas de importância médica: *Sporothrix brasiliensis* NR 147565.1, *Sporothrix schenckii* NR 147566.1, *Sporothrix globosa* NR 189348.1, *Aspergillus niger* NR 111348.1 e *Candida albicans* NR 125332.1. As análises foram realizadas com a ferramenta NEBcutter V3.0 a partir das sequências ITS amplificadas, e os fragmentos estão expressos em pares de bases (pb), visando a diferenciação de espécies por PCR-RFLP.

Enzima	<i>Sporothrix brasiliensis</i> NR 147565.1	<i>Sporothrix schenckii</i> NR 147566.1	<i>Sporothrix globosa</i> NR 189348.1	<i>Aspergillus niger</i> NR 111348.1	<i>Candida albicans</i> NR 125332.1
HaeIII (GG CC)	82, 33, 276, 21, 116	81, 33, 276, 21, 114	97, 33, 277, 21, 113	47, 45, 15, 29, 291, 73, 76	69, 426
MspI (C CGG)	463, 65	462, 63	479, 62	111, 21, 15, 93, 101, 42, 32, 86, 75	276, 219
HinfI (G ANTC)	130, 60, 16, 64, 258	129, 61, 16, 64, 255	145, 63, 16, 64, 253	19, 208, 16, 56, 248, 29	162, 16, 56, 8, 137, 116
DdeI (C TNAG)	154, 374	153, 372	169, 372	187, 389	397, 98
RsaI (GT AC)	22, 415, 91	22, 414, 89	41, 412, 88	73, 503	495

Com o objetivo de confirmar a identidade molecular dos isolados regionais de *Sporothrix*, foi realizada uma análise filogenética baseada na região ITS com cinco isolados aleatórios de cada espécie de referência (*S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*) e quatro isolados regionais provenientes da Amazônia. Na figura 4 – Análise filogenética com base na região ITS utilizando o método neighbor-joining com suporte de bootstrap, observou-se que todos os isolados regionais se agruparam de forma consistente no mesmo clado de *Sporothrix brasiliensis*, junto às cepas tipo NR 147565.1 e demais isolados depositados no GenBank.

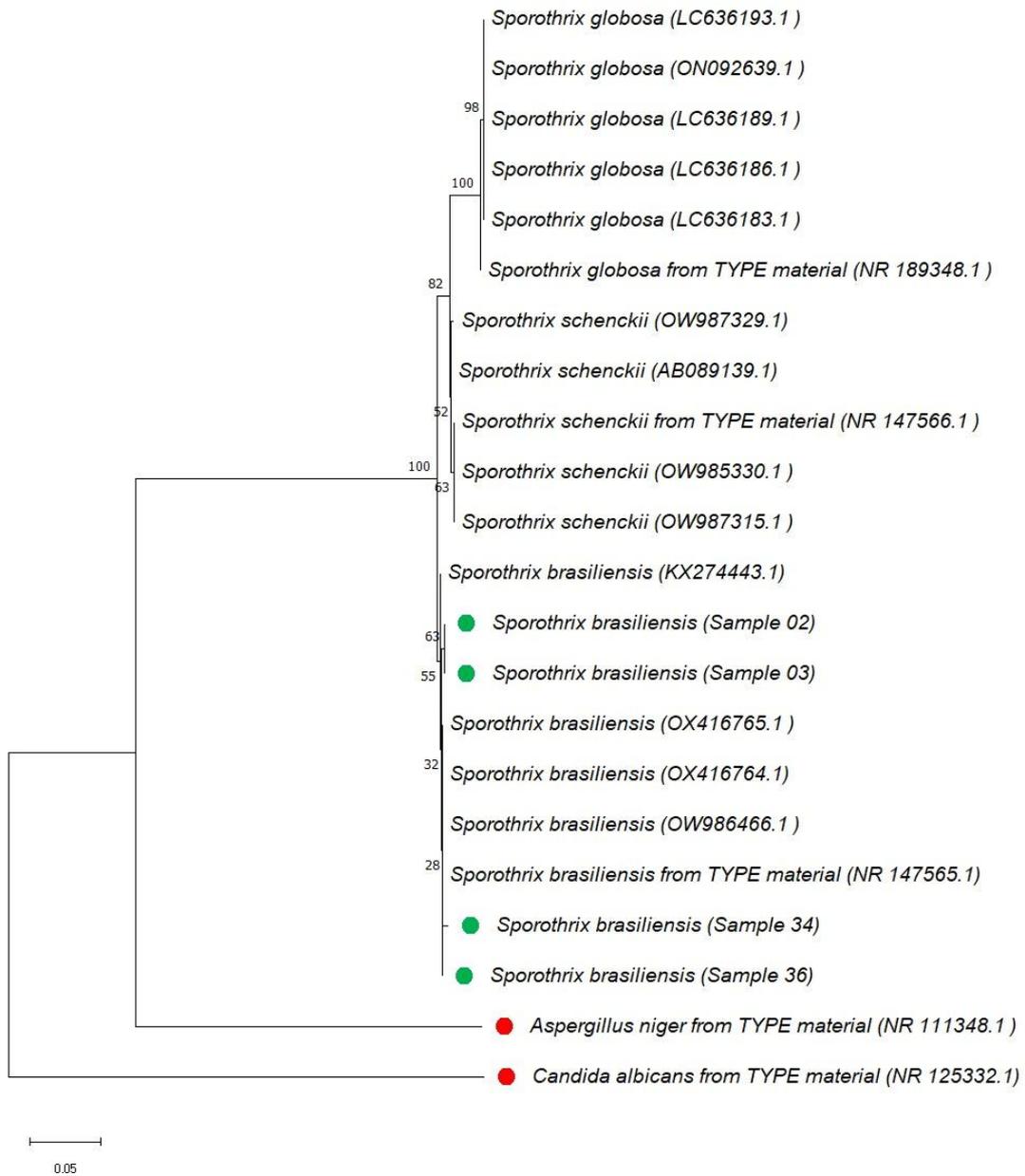


Figura 4 - Análise filogenética com base na região ITS utilizando o método neighbor-joining com suporte de bootstrap no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), construída para o marcador molecular espaçador transcrito interno (ITS). A árvore foi construída a partir do alinhamento das sequências de espécies do gênero *Sporothrix* disponíveis na base de dados NCBI e sequências de amostras de isolados regionais da Amazônia utilizadas no estudo estão em verde. Os isolados *Aspergillus niger* e *Candida albicans* foram utilizados como grupo externo estão em vermelho, as sequências estão disponíveis no banco de dados NCBI.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram identificados avanços significativos na metodologia de diagnóstico molecular da esporotricose. Os principais achados incluem: (1) a superioridade do método Fenol-Clorofórmio na extração de DNA, que apresentou as maiores concentrações e pureza para diferentes espécies fúngicas; (2) a alta sensibilidade dos primers ITS1–ITS4 e NL1–NL4 na PCR, permitindo amplificação mesmo em concentrações extremamente baixas de DNA; (3) a limitação da técnica de PCR-RFLP na diferenciação de espécies de *Sporothrix*, devido às semelhanças nos padrões de restrição gerados pelas enzimas; e (4) a identidade molecular dos isolados regionais do Amazonas, que foram agrupados com *Sporothrix brasiliensis*, reforçando a predominância desta espécie na região. Esses resultados contribuem diretamente para aprimorar a identificação molecular e a vigilância epidemiológica da esporotricose.

O método Fenol-Clorofórmio foi identificado como a técnica mais eficaz para extração de DNA, apresentando as maiores concentrações médias, como observado para *S. schenckii* ($86,81 \pm 81,61$ ng/ μ L) e *C. albicans* ($44,55 \pm 21,35$ ng/ μ L). A pureza do DNA obtido foi consistente, com valores entre 1,6 e 2,25 na razão de absorvância 260/280 nm, indicando qualidade satisfatória. Comparado ao método de Coluna, que gerou menores concentrações, e ao método de Precipitação por Acetato, cujas concentrações foram intermediárias, o Fenol-Clorofórmio demonstrou ser a escolha mais adequada para trabalhos com *Sporothrix*. Estudos anteriores corroboram esse achado. Kumar e Mugunthan (2018) destacam que a extração por Fenol-Clorofórmio é altamente eficiente devido à sua capacidade de remover contaminantes e proteínas. Fernandes et al. (2023) também observaram que este método produz DNA de melhor qualidade para análises moleculares, sendo preferível para PCR. No entanto, a manipulação de reagentes tóxicos pode ser uma limitação prática. Em comparação, o estudo de Fernandes et al. (2023) sugere que o uso de colunas de sílica pode ser mais seguro, ainda que gere menor rendimento. A elevada eficácia do Fenol-Clorofórmio pode ser atribuída à sua habilidade de fracionar proteínas e polissacarídeos, garantindo recuperação seletiva do DNA. Futuras adaptações poderiam mitigar a toxicidade sem comprometer a eficiência.

Os primers ITS1–ITS4 foram os mais sensíveis, amplificando DNA desde concentrações de 20 ng até 0,0002 ng, seguido pelos primers NL1–NL4, que foram eficientes até 0,002 ng. Já os primers ITS5–NL4 amplificaram bem até 0,02 ng, demonstrando menor sensibilidade em relação aos outros. Estes resultados sugerem que ITS1–ITS4 e NL1–NL4 são os melhores candidatos para diagnóstico molecular de *Sporothrix brasiliensis* em amostras

clínicas. Esses achados são consistentes com White et al. (1990) que indicaram ITS como o marcador de referência para identificação de fungos. Tekpinar e Kalmer, (2019) confirmaram que ITS é biologicamente relevante e altamente específico, tornando-se um marcador universal em estudos genéticos de fungos. Cheng et al. (2020) também demonstraram que regiões ITS são essenciais na amplificação por PCR devido à sua conservação estrutural. A elevada sensibilidade encontrada aqui reforça o papel de ITS no diagnóstico clínico. A vantagem desses primers sobre outros pode ser explicada pelo alto grau de conservação das regiões ITS combinada com sua variabilidade específica para *Sporothrix brasiliensis*. Em contrapartida, marcadores como Calmodulina e mtDNA requerem maiores concentrações para amplificação, o que pode dificultar a detecção precoce de DNA fúngico em amostras clínicas.

A análise *in silico* da digestão de produtos de PCR revelou que as enzimas de restrição HaeIII, MspI, HinfI, DdeI e RsaI produziram padrões de fragmentação semelhantes entre espécies do gênero *Sporothrix*, com variações inferiores a 20 pb. Isso sugere que a diferenciação molecular entre *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e outras espécies pode ser desafiadora utilizando PCR-RFLP. Por outro lado, *A. niger* e *C. albicans* apresentaram perfis distintos, permitindo sua clara diferenciação. Estudos de Rodrigues et al. (2015) já haviam relatado que a técnica de PCR-RFLP enfrenta dificuldades na diferenciação de *Sporothrix* devido à similaridade genética entre as espécies. Estudos como os de Etchecopaz et al. (2021) também indicam que o polimorfismo de restrição pode ser pouco informativo para espécies do clado patogênico de *Sporothrix*. Além disso, Nava-Pérez et al. (2022) apontam que variações menores que 20 pb podem não ser suficientes para caracterizar uma espécie em análises laboratoriais práticas. A dificuldade na diferenciação por PCR-RFLP pode estar relacionada à alta conservação genética entre as espécies de *Sporothrix*, especialmente *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. Isso indica que, para aplicações clínicas, métodos alternativos como sequenciamento completo ou PCR com primers específicos podem ser mais eficazes para a identificação de espécies. No entanto, a PCR-RFLP continua sendo uma opção viável para estudos epidemiológicos devido ao seu custo reduzido e facilidade de implementação em laboratórios de rotina.

Os isolados regionais do Amazonas foram agrupados filogeneticamente com *Sporothrix brasiliensis*, sugerindo que essa é a principal espécie presente na região. A análise filogenética mostrou que os isolados amazônicos compartilham alta identidade com cepas do GenBank, incluindo a referência NR 147565.1. Essa descoberta reforça a hipótese de que surtos de esporotricose na Amazônia são predominantemente causados por *S. brasiliensis*. Esses achados se alinham com estudos anteriores, como os de Gremião et al. (2021), que identificaram *S.*

brasiliensis como a principal espécie responsável por surtos zoonóticos no Brasil. Além disso, Lima Barros et al. (2011) demonstraram que *S. brasiliensis* possui maior capacidade de transmissão em gatos, o que pode explicar sua prevalência na Amazônia, dada a alta incidência da doença em felinos na região. A identificação molecular precisa dos isolados regionais pode facilitar o monitoramento epidemiológico e auxiliar na formulação de estratégias de controle da doença. A predominância de *S. brasiliensis* na Amazônia pode estar associada à sua elevada virulência e adaptabilidade ao clima quente e úmido da região. Esses fatores favorecem sua disseminação, especialmente em populações de gatos e humanos em áreas urbanas com condições sanitárias precárias. Estudos futuros podem explorar variações genéticas dentro das populações de *S. brasiliensis*, buscando identificar fatores de resistência antifúngica ou mutações relacionadas à sua virulência.

Apesar dos avanços apresentados, algumas limitações devem ser consideradas. Primeiramente, o tamanho da amostra de isolados foi relativamente pequeno, o que pode restringir a generalização dos resultados. Para fortalecer a validade estatística, estudos futuros devem incluir uma amostragem mais ampla e diversificada, abrangendo diferentes regiões do Brasil. Outra limitação refere-se ao método de extração de DNA por Fenol-Clorofórmio, que, apesar de altamente eficiente, envolve reagentes tóxicos e exige cuidados na manipulação. Para aplicações clínicas de rotina, alternativas mais seguras, como kits comerciais de purificação de DNA, devem ser avaliadas. Além disso, a validação em amostras clínicas humanas ainda não foi realizada, sendo essencial expandir o estudo para amostras de pacientes diagnosticados com esporotricose. Isso permitiria uma avaliação mais precisa da aplicabilidade dos métodos de PCR e RFLP-PCR em contextos reais de diagnóstico. Por fim, embora a PCR-RFLP tenha sido investigada como ferramenta de diferenciação molecular, seu poder discriminatório entre espécies do gênero *Sporothrix* mostrou-se limitado, indicando a necessidade de metodologias complementares, como sequenciamento de nova geração.

Este estudo apresenta avanços significativos no diagnóstico molecular da esporotricose, propondo uma metodologia mais rápida e acessível para identificação de espécies de *Sporothrix*. A validação do marcador ITS e da técnica de PCR-RFLP fornece uma alternativa confiável para diagnósticos laboratoriais, reduzindo a dependência de métodos convencionais como cultura micológica, que demandam semanas para resultados conclusivos. Além disso, a confirmação da predominância de *S. brasiliensis* na Amazônia contribui para o entendimento epidemiológico da esporotricose na região, auxiliando no desenvolvimento de políticas de controle e prevenção. A identificação precisa dos isolados pode impactar estratégias de

tratamento e manejo clínico, permitindo intervenções mais eficazes no combate à doença. No futuro, a integração de sequenciamento molecular e PCR quantitativa pode proporcionar diagnósticos ainda mais sensíveis e específicos. A aplicação dessa metodologia em programas de vigilância epidemiológica pode acelerar o reconhecimento de surtos e facilitar o monitoramento da propagação da doença.

CONCLUSÃO

Este estudo apresentou avanços significativos na otimização da PCR para o diagnóstico de esporotricose, permitindo uma detecção mais rápida e precisa das espécies *Sporothrix* spp.. Os principais achados incluem a superioridade do método Fenol-Clorofórmio na extração de DNA, garantindo maior rendimento e pureza para análises moleculares. Além disso, os primers ITS1–ITS4 e NL1–NL4 demonstraram alta sensibilidade, sendo eficazes na amplificação de *Sporothrix brasiliensis* mesmo em concentrações extremamente baixas, tornando-se excelentes ferramentas para diagnóstico molecular.

A análise *in silico* da PCR-RFLP evidenciou desafios na diferenciação molecular das espécies patogênicas do gênero *Sporothrix*, devido às semelhanças nos padrões de fragmentação gerados pelas enzimas de restrição. No entanto, a técnica permitiu uma distinção clara de *A. niger* e *C. albicans*, demonstrando sua aplicabilidade para certos gêneros fúngicos. Além disso, os isolados amazônicos foram identificados como pertencentes ao clado de *S. brasiliensis*, reforçando sua predominância na região e contribuindo para o entendimento epidemiológico da esporotricose no Brasil.

REFERÊNCIAS

BRUNS, T. D. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/223397588>>.

CHENG, Yi *et al.* Molecular diagnostics and pathogenesis of fungal pathogens on bast fiber crops. PathogensMDPI AG, , 1 mar. 2020.

DE LIMA BARROS, Mônica Bastos; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, out. 2011.

ETCHECOPAZ, Alejandro *et al.* *Sporothrix brasiliensis*: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. *Journal of Fungi* MDPI AG, , 1 mar. 2021.

EZEONUEGBU, Blessing Amaka *et al.* Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 2094, 8 fev. 2022.

FERNANDES, Blenda *et al.* Sporotrichosis: In silico design of new molecular markers for the *Sporothrix* genus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 56, 2023.

FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.

GONÇALVES, Nelson Veiga *et al.* Occurrence of sporotrichosis in Belém, Pará, Brazil: a metaphor for unsustainable socioeconomic development. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 28, n. 5, p. 103872, set. 2024.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 mar. 2021.

HONG, Seung Beom *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, v. 97, n. 6, p. 1316–1329, nov. 2005.

KUMAR, Mahadevan; MUGUNTHAN, M. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical Journal Armed Forces India*, v. 74, n. 4, p. 333–336, 1 out. 2018.

MACHADO, Thiago Costa *et al.* Insights from Cutting-edge Diagnostics and Epidemiology of Sporotrichosis and Taxonomic Shifts in *Sporothrix*. *Current Fungal Infection Reports*, v. 19, n. 1, p. 3, 18 dez. 2025.

MESQUITA, Viviany Araujo *et al.* Zoonotic Sporotrichosis outbreak: Emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 7, p. e0012328, 22 jul. 2024.

MORGADO, Debora Salgado *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 3, p. 100140, 2022.

NAVA-PÉREZ, Nallely *et al.* Biological and Clinical Attributes of *Sporothrix globosa*, a Causative Agent of Sporotrichosis. *Infection and Drug Resistance* Dove Medical Press Ltd, , 2022.

O'DONNELL, K. *Fusarium and its near relatives. [S.l.: S.n.]*. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/224900762>>.

RODRIGUES, A. M. ; Gonçalves, S. S. ; de Carvalho, J. A. ; Borba-Santos, L. P. ; Rozental, S. ; Camargo, Z. P. d. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. 2022.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 8, p. 776, 26 jul. 2022.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. 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, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 12, 1 dez. 2015a.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 12, p. e0004190, 1 dez. 2015b.

Sample to Insight DNeasy® Blood & Tissue Handbook. . [S.l.: S.n.].

SANTOS, M. S. *et al.* Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 43, n. 8, p. 712–716, ago. 2010.

SUH, S. O. *et al.* Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. Mycologia, v. 98, n. 6, p. 1006–1017, 1 nov. 2006.

TEKPINAR, Ayten Dizkirici; KALMER, Aysenur. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. Nova Hedwigia, v. 109, n. 1, p. 187–224, 2019a.

TEKPINAR, Ayten Dizkirici; KALMER, Aysenur. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. Nova Hedwigia, v. 109, n. 1–2, p. 187–224, 17 ago. 2019b.

WHITE, John Taylor; LEE, Steven B. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/262687766>>.

7 CONCLUSÃO

Este estudo testou metodologias e verificou-se qual obteve o melhor desempenho na otimização da PCR para o diagnóstico de esporotricose, permitindo uma detecção mais rápida e precisa das espécies *Sporothrix* spp. Os principais achados incluem a superioridade do método Fenol-Clorofórmio na extração de DNA, garantindo maior rendimento e pureza para análises moleculares. Além disso, os primers ITS1–ITS4 e NL1–NL4 demonstraram alta sensibilidade, sendo eficazes na amplificação de *Sporothrix brasiliensis* mesmo em concentrações extremamente baixas, tornando-se excelentes ferramentas para diagnóstico molecular.

A análise *in silico* da PCR-RFLP evidenciou desafios na diferenciação molecular das espécies patogênicas do gênero *Sporothrix*, devido às semelhanças nos padrões de fragmentação gerados pelas enzimas de restrição. No entanto, a técnica permitiu uma distinção clara de *A. niger* e *C. albicans*, demonstrando sua aplicabilidade para certos gêneros fúngicos. Além disso, os isolados amazônicos foram identificados como pertencentes ao clado de *S. brasiliensis*, e essas sequências das amostras regionais serão depositadas na base de dados NCBI, reforçando sua predominância na região e contribuindo para o entendimento epidemiológico da esporotricose no Brasil.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-PAES, Rodrigo *et al.* Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3094, 1 set. 2014.

ALMEIDA-SILVA, Fernando *et al.* Beyond Domestic Cats: Environmental Detection of *Sporothrix brasiliensis* DNA in a Hyperendemic Area of Sporotrichosis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 604, 1 jun. 2022.

ALVAREZ, Carmen Magaly; OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; PIRES, Regina Helena. Sporotrichosis: A Review of a Neglected Disease in the Last 50 Years in Brazil. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2152, 1 nov. 2022.

ANGELO, Débora Ferreira Dos Santos *et al.* *Sporothrix brasiliensis* infecting cats in northeastern Brazil: New emerging areas in Paraíba state. **Ciencia Rural**, v. 53, n. 10, 2023.

BARROS, Gabriele; ANDRÉA, Mothé; DE SOUZA BAPTISTA, Regina. **Felino versus Fungo: o enigma da relação dos gatos com a esporotricose**. [S.l.: S.n.].

BENEDICT, Kaitlin; JACKSON, Brendan R. Sporotrichosis Cases in Commercial Insurance Data, United States, 2012–2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 11, p. 2783, 1 nov. 2020.

BHUNJUN, Chitrabhanu S. *et al.* Importance of Molecular Data to Identify Fungal Plant Pathogens and Guidelines for Pathogenicity Testing Based on Koch's Postulates. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1096, 1 set. 2021.

BOECHAT, Jéssica Sepulveda *et al.* Feline sporotrichosis: Associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 185–196, 1 mar. 2018.

BOECHAT, Jéssica Sepulveda *et al.* Sporothrix brasiliensis and Feline Sporotrichosis in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil (1998–2018). **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, 1 jul. 2022.

BRITO SOUZA RABELLO, Vanessa *et al.* Environmental Isolation of Sporothrix brasiliensis in an Area With Recurrent Feline Sporotrichosis Cases. **Article**, v. 12, p. 1, 2022.

BRUNS, T. D. *et al.* **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/223397588>>.

CABEZA, Elisa *et al.* Clinical and Epidemiological Characteristics of Sporotrichosis in a Reference Center of Uruguay. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 3, p. 322, 1 mar. 2022.

CHENG, Yi *et al.* **Molecular diagnostics and pathogenesis of fungal pathogens on bast fiber crops.** **Pathogens** MDPI AG, , 1 mar. 2020a.

CHENG, Yi *et al.* Molecular Diagnostics and Pathogenesis of Fungal Pathogens on Bast Fiber Crops. **Pathogens** 2020, Vol. 9, Page 223, v. 9, n. 3, p. 223, 18 mar. 2020b.

CORRÊA-JUNIOR, Dario *et al.* Metabolic Plasticity and Virulence-Associated Factors of Sporothrix brasiliensis Strains Related to Familiar Outbreaks of Cat-to-Human Transmitted Sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, 1 jul. 2023.

DA CRUZ BAHIENSE ROCHA, Isabela *et al.* Molecular-based assessment of diversity and population structure of Sporothrix spp. clinical isolates from Espírito Santo-Brazil. **Mycoses**, v. 64, n. 4, p. 420–427, 1 abr. 2021.

DE CARVALHO, J. A. *et al.* Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging Sporothrix species. **Studies in Mycology**, v. 100, p. 100129, 1 set. 2021.

DE CARVALHO, Jamile Ambrósio *et al.* Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic sporothrix species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1–26, 1 jul. 2020.

DE CARVALHO, Jamile Ambrósio *et al.* **Trends in Molecular Diagnostics and Genotyping Tools Applied for Emerging Sporothrix Species.** **Journal of FungiMDPI**, , 1 ago. 2022.

DE LIMA BARROS, Mônica Bastos; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 354–633, out. 2011a.

DE LIMA BARROS, Mônica Bastos; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. **Sporothrix schenckii and sporotrichosis.** **Clinical Microbiology Reviews**, out. 2011b.

DELLA TERRA, Paula Portella *et al.* Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen Sporothrix brasiliensis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2017a.

DELLA TERRA, Paula Portella *et al.* Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen Sporothrix brasiliensis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2017b.

ETCHECOPAZ, A. N. *et al.* Sporotrichosis caused by Sporothrix brasiliensis in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 1, p. 100908, 1 abr. 2020.

ETCHECOPAZ, Alejandro *et al.* **Sporothrix brasiliensis: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina.** **Journal of FungiMDPI AG**, , 1 mar. 2021.

EZEONUEGBU, Blessing Amaka *et al.* Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2094, 8 fev. 2022.

FERNANDES, Blenda *et al.* Sporotrichosis: In silico design of new molecular markers for the Sporothrix genus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 56, 2023a.

FERNANDES, Blenda *et al.* Short Communication doi Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical Sporotrichosis: In silico design of new molecular markers for the Sporothrix genus. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, p. 2023, 6 mar. 2023b.

FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.

FVS - AM. **Situação Epidemiológica da Esporotriocose Humana no Estado do Amazonas, 2022 a 2023**. Manaus: [S.n.]. Disponível em: <www.fvs.am.gov.br>.

FVS - AM. **Informe Epidemiológico da Esporotricose em Humanos e Gatos no Amazonas**. Manaus, 2025.

FVS - RCP/AM. **Informe Epidemiológico da Esporotricose em Humanos e Animais do Estado do Amazonas**. [S.l.: S.n.].

GALLO, Simon *et al.* First three cases of cat-associated zoonotic cutaneous sporotrichosis in Colombia. **International Journal of Dermatology**, v. 61, n. 10, p. 1276–1279, 1 out. 2022.

GARRE, Alberto *et al.* On the use of in-silico simulations to support experimental design: A case study in microbial inactivation of foods. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220683, 1 ago. 2019.

GHANNAM, Mousa G.; VARACALLO, Matthew A. Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. **StatPearls**, 30 jul. 2023.

GOMEZ, Oscar M. *et al.* Draft Genome Sequences of Two *Sporothrix schenckii* Clinical Isolates Associated with Human Sporotrichosis in Colombia. **Genome announcements**, v. 6, n. 24, 14 jun. 2018.

GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, José A.; MORA-MONTES, Héctor M. **Current Progress in Sporothrix brasiliensis Basic Aspects. Journal of FungiMDPI**, , 1 maio 2023.

GONÇALVES, Nelson Veiga *et al.* Occurrence of sporotrichosis in Belém, Pará, Brazil: a metaphor for unsustainable socioeconomic development. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 103872, set. 2024a.

GONÇALVES, Nelson Veiga *et al.* Occurrence of sporotrichosis in Belém, Pará, Brazil: a metaphor for unsustainable socioeconomic development. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, 1 set. 2024b.

GREMIÃO, Isabella D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2015.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 1 jan. 2017.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira *et al.* Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621, 2020.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **VETERINARY MICROBIOLOGY-REVIEW**, v. 52, p. 107–124, 2021a.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira *et al.* **Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. Brazilian Journal of Microbiology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 mar. 2021b.

HERNÁNDEZ-CASTRO, Rigoberto *et al.* **Epidemiology of Clinical Sporotrichosis in the Americas in the Last Ten Years. Journal of Fungi** MDPI, , 1 jun. 2022.

HONG, Seung Beom *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316–1329, nov. 2005.

HU, Sindy *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.

JIANG, Guo-Liang; JIANG, Guo-Liang. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. **Plant Breeding from Laboratories to Fields**, 22 maio 2013.

KADRI, Karim; KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. **Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science**, 7 jun. 2019.

KANO, R. *et al.* Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**, v. 44, n. 7–8, p. 261–265, 9 out. 2001.

KAUSERUD, Håvard. ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. **Fungal Ecology**, v. 65, p. 101274, 1 out. 2023a.

KAUSERUD, Håvard. **ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. Fungal Ecology** Elsevier Ltd, , 1 out. 2023b.

KHEHRA, Nimrat; PADDA, Inderbir S.; SWIFT, Cathi J. Polymerase Chain Reaction (PCR). **StatPearls**, 6 mar. 2023.

KIDD, Sarah E. *et al.* *Sporothrix davidellisii* : A new pathogenic species belonging to the *Sporothrix pallida* complex. **Medical Mycology**, v. 63, n. 4, 1 abr. 2025.

KÖSER, Claudio U.; ELLINGTON, Matthew J.; PEACOCK, Sharon J. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 401, 2014.

KUMAR, Mahadevan; MUGUNTHAN, M. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 74, n. 4, p. 333–336, 1 out. 2018.

LACAZ, Carlos da Silva. **Tratado de micologia médica Lacaz**. [S.l.]: Sarvier, 2002.

LIU, Wen Qi *et al.* Comparison of ancient and modern *Clonorchis sinensis* based on ITS1 and ITS2 sequences. **Acta Tropica**, v. 101, n. 2, p. 91–94, 1 fev. 2007.

LLORET, Albert *et al.* Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619–623, 27 jul. 2013.

LOPES-BEZERRA, Leila M. *et al.* **Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents**. **Medical Mycology**Oxford University Press, , 1 abr. 2018.

LUIZ, Raul Leal Faria *et al.* Nested PCR for the Diagnosis of Feline Sporotrichosis From Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples Using Different DNA Extraction Protocols. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 5 jan. 2022.

MACHADO, Thiago Costa *et al.* Insights from Cutting-edge Diagnostics and Epidemiology of Sporotrichosis and Taxonomic Shifts in *Sporothrix*. **Current Fungal Infection Reports**, v. 19, n. 1, p. 3, 18 dez. 2025.

MAHAJAN, Vikram K. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, p. 272376, 28 dez. 2014.

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

MARTIN, Kendall J.; RYGIEWICZ, Paul T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, v. 5, p. 28, 18 maio 2005.

MCDONALD, Jessica; LEHMAN, Donald C. **FOCUS: FORENSIC SCIENCE Forensic DNA Analysis** **CLINICAL LABORATORY SCIENCE**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://hwmaint.clsjournal.ascls.org/>>.

MESQUITA, Viviany Araujo *et al.* Zoonotic Sporotrichosis outbreak: Emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 7, p. e0012328, 1 jul. 2024a.

MESQUITA, Viviany Araujo *et al.* Zoonotic Sporotrichosis outbreak: Emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 7, p. e0012328, 1 jul. 2024b.

MESQUITA, Viviany Araujo *et al.* Zoonotic Sporotrichosis outbreak: Emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 7, p. e0012328, 22 jul. 2024c.

MIRANDA, L. H. M. *et al.* Zoonotic feline sporotrichosis: a small case cluster in Perth, Western Australia, and a review of previous feline cases from Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 102, n. 12, p. 638–645, 1 dez. 2024.

MORGADO, Debora Salgado *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100140, 2022.

NAVA-PÉREZ, Nallely *et al.* **Biological and Clinical Attributes of *Sporothrix globosa*, a Causative Agent of Sporotrichosis. Infection and Drug Resistance** Dove Medical Press Ltd, , 2022.

O'DONNELL, K. **Fusarium and its near relatives**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/224900762>>.

OROFINO-COSTA, Rosane *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 1 set. 2017.

RABELLO, Vanessa Brito Souza *et al.* The Historical Burden of Sporotrichosis in Brazil: a Systematic Review of Cases Reported from 1907 to 2020. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 231–244, 1 mar. 2022.

RACHMAN, Raissa *et al.* Zoonotic acquisition of cutaneous *Sporothrix brasiliensis* infection in the UK. **BMJ Case Reports**, v. 15, n. 5, p. e248418, 24 maio 2022.

RAJA, Huzefa A. *et al.* Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756–770, 24 mar. 2017.

RODRIGUES, A. M. ; Gonçalves, S. S. ; de Carvalho, J. A. ; Borba-Santos, L. P. ; Rozental, S. ; Camargo, Z. P. d. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. 2022.

RODRIGUES, Anderson Messias *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, Anderson Messias *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia 2020 185:5**, v. 185, n. 5, p. 813–842, 12 fev. 2020.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 776, 26 jul. 2022a.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* **Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends.** *Journal of Fungi*MDPI, , 1 ago. 2022b.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. 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. 2014a.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, 1 abr. 2014b.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 1 dez. 2015a.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2015b.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 1 dez. 2015c.

RODRÍGUEZ-BRITO, Sabrina *et al.* Differential identification of *Sporothrix* spp. and *Leishmania* spp. by conventional PCR and qPCR in multiplex format. **Medical Mycology**, v. 53, p. 22–27, 2015.

ROHIT, Anusha *et al.* Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 143, n. 1, p. 72, 1 jan. 2016.

SAKAI, Yuka *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporotrix globosa* in an elderly male farmer at the site of a cat scratch. **Medical Mycology Case Reports**, v. 46, p. 100667, 1 dez. 2024.

Sample to Insight DNeasy® Blood & Tissue Handbook. . [S.l.: S.n.].

SANTOS, M. S. *et al.* Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 712–716, 2010a.

SANTOS, M. S. *et al.* Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 712–716, ago. 2010b.

SANTOS, Mariana Tibúrcio *et al.* The rising incidence of feline and cat-transmitted sporotrichosis in Latin America. **Zoonoses and Public Health**, v. 71, n. 6, p. 609–619, 1 set. 2024.

SHARMA, Loknandini; AGARWAL, Reetu; NACHIKETA, Nachiketa. Sporotrichosis from a tertiary care hospital in the Eastern State of India. **Indian Journal of Case Reports**, v. 9, n. 12, p. 353–356, 1 fev. 2024.

SILVA, Francine S. *et al.* Refractory feline sporotrichosis: A comparative analysis on the clinical, histopathological, and cytopathological aspects. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 42, 2022.

SILVERO, Mirtha Gabriela Santacruz *et al.* The first autochthonous human case of sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis* in Paraguay. **Journal of Medical Mycology**, v. 35, n. 1, p. 101536, 1 mar. 2025.

SUH, S. O. *et al.* Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006–1017, 1 nov. 2006.

TEKPINAR, Aytan Dizkirici; KALMER, Aysenur. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n. 1, p. 187–224, 2019a.

TEKPINAR, Aytan Dizkirici; KALMER, Aysenur. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n. 1–2, p. 187–224, 17 ago. 2019b.

THOMPSON, George R. *et al.* **Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology**. **The Lancet Infectious Diseases** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2021.

THOMPSON, Pamela *et al.* Sporotrichosis Outbreak Due to *Sporothrix brasiliensis* in Domestic Cats in Magallanes, Chile: A One-Health-Approach Study. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.

VALONES, Marcela Agne Alves *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2009.

VINCZE, T. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3688–3691, 1 jul. 2003.

VU, D. *et al.* Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 135–154, 1 mar. 2019.

WHITE, John Taylor; LEE, Steven B. **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/262687766>>.

XU, Jianping. Fungal DNA barcoding1. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 913–932, 2016.

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

ZHANG, Lei *et al.* Comparison Analysis of Different DNA Extraction Methods on Suitability for Long-Read Metagenomic Nanopore Sequencing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 28 jun. 2022.

ZHOU, Xun *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 153–165, 2014.