



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

## **Pesquisa ambiental de agentes de esporotricose em Portugal**

**Ana Mafalda da Silva Grilo Carreteiro Dançante**

Dissertação para obtenção do  
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

**Dezembro 2017**



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

## **Pesquisa ambiental de agentes de esporotricose em Portugal**

**Ana Mafalda da Silva Grilo Carreteiro Dançante**

Dissertação para obtenção do  
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientador: Professor Doutor João Inácio Silva, Instituto de Higiene e Medicina  
Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Professora Doutora Paula Sampaio, Universidade do Minho

**Unidade de Micologia Médica, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto  
de Higiene e Medicina Tropical**

**Dezembro 2017**

## **Agradecimentos**

O presente trabalho não poderia ter sido concretizado sem a ajuda preciosa e o apoio de várias pessoas.

Ao meu orientador, o Professor Doutor João Inácio Silva, pela valiosa orientação e conhecimento transmitido, paciência e sempre disponibilidade para me ajudar quer com críticas valiosas ou amáveis palavras de motivação.

À minha co-orientadora a Professora Doutora Paula Sampaio por toda a simpatia e amabilidade, conselhos e ajuda prestada.

À técnica Ana Paula Maduro, pelo carinho com que me acolheu na Unidade de Micologia Médica, transmissão de conhecimento, companheirismo e amizade.

À Bruna Balau, por todo o carinho, apoio, conselhos, momentos de convívio e especialmente pela valiosa amizade.

À Joana Pereira da Universidade do Minho pela simpatia e sempre disponibilidade para me ajudar.

Às Dras Conceição Peleteiro e Madalena Pinto Coelho, da VetPat, Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária, pela ajuda e amabilidade em disponibilizar as amostras clínicas.

À Dra Luísa Rodrigues do ICNF (Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas) pelas colheitas enviadas.

Ao Sr. José Manuel da Unidade de Parasitologia do IHMT pela ajuda prestada e disponibilidade na obtenção do azoto líquido.

Aos colegas espeleólogos Sérgio Barbosa e Pedro Alves e aos colegas Bruno Silva e Sílvia Barreiro da Unidade de Biologia da Conservação/CIBIO-Évora, pelas visitas aos abrigos cavernícolas e colheita de amostras.

Às senhoras voluntárias da organização sem fins lucrativos, a Animais de Rua, Maria Manuela Antunes e Isabel Costa pela captura dos animais suspeitos e pela boa vontade e disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho.

À Kátia Rebosa e ao Drº Cláudio Cabral da Pontovet pela captura dos animais e recolha de amostras clínicas, pela amabilidade e toda a ajuda prestada.

Às clínicas veterinárias Animais e Cãopanhia e Andicap pela colheita e envio de amostra de casos suspeitos de esporotricose.

A todos os meus amigos, demasiados para mencionar, pela amizade e palavras de conforto.

Finalmente, com muito amor, aos meus Pais e à minha Irmã Diana, a quem tudo devo! Pelo apoio incondicional, por acreditarem nos meus sonhos, por mais loucos que sejam, pelo amor e carinho. A eles dedico esta tese.

## Resumo

A esporotricose é uma das principais micoses subcutâneas reportadas mundialmente. O agente etiológico é um complexo de espécies dimórficas relacionadas conhecido como complexo *Sporothrix schenckii*. Considerada uma doença rara na Europa, foi recentemente identificado um caso autóctone em Portugal. Este trabalho teve como principal objetivo, desenvolver um ensaio baseado em PCR para detetar e identificar membros do complexo *S. schenckii* em amostras ambientais, e realizar uma pesquisa ambiental destas espécies em várias regiões de Portugal.

O ensaio de PCR foi implementado, o qual amplifica especificamente um fragmento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dos membros do complexo *S. schenckii*. O ensaio foi otimizado e posteriormente utilizado para avaliar a presença de espécies do complexo em 95 amostras ambientais e em 7 amostras clínicas de gatos suspeitos de terem esporotricose. Os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados, permitindo a diferenciação de espécies do complexo *S. schenckii* com base nos polimorfismos existentes na região ITS.

Não foram isolados quaisquer membros do complexo *S. schenckii* a partir das amostras analisadas. No entanto, as mesmas amostras analisadas com os ensaios de PCR desenvolvidos, um resultado de amplificação por PCR positivo foi obtido a partir de uma amostra clínica. O fragmento ITS gerado foi sequenciado e a sequência nucleotídica correspondeu à espécie *Sporothrix mexicana*, um raro agente de infeção. A cuidadora do animal, que sofreu arranhadelas do mesmo, relatou o desenvolvimento posterior de uma lesão na pele, a qual foi diagnosticada como esporotricose.

Dada a negatividade das amostras ambientais analisadas, pode-se concluir que o complexo *S. schenckii* aparenta ter uma expressão rara em Portugal. Contudo, o aparecimento de alguns casos confirmados e suspeitos de esporotricose em felinos em Lisboa, poderá ser indicativo que, à semelhança do que acontece noutras regiões do mundo, os gatos podem ser reservatórios importantes para a propagação destes agentes na comunidade.

**Palavras-chave:** Complexo *Sporothrix*, esporotricose, identificação molecular, região ITS.

## **Abstract**

Sporotrichosis is one of the main subcutaneous mycoses reported worldwide. The etiological agents are a complex of closely related dimorphic species known as *Sporothrix schenckii* complex. Considered a rare disease in Europe, recently it was reported an autochthonous case in Portugal. This work aimed to develop a PCR-based assay to detect and identify *S. schenckii* complex members in environmental samples, and to perform an environmental screening of these species in several regions of Portugal.

A PCR assay was implemented, which specifically amplify a fragment of the Internal Transcribed Spacer (ITS) of *S. schenckii* complex members. The assay was optimised and subsequently used to assess the presence of *S. schenckii* complex in 95 environmental samples, and in 7 clinical samples from cats suspected of sporotrichosis. Amplified DNA fragments were sequenced using standard methods, allowing the differentiation of *S. schenckii* complex species based on polymorphisms existent in the ITS region.

No members of the *S. schenckii* complex were isolated from the environmental and clinical samples. However, when the same samples were analysed with the PCR assays developed in this work, a proven positive PCR amplification result was obtained from a clinical sample. The ITS amplicon generated was sequenced and the nucleotide sequence was identical to the species *Sporothrix mexicana*, a rare agent of infection. The animal's handler, who suffered a scratch from the same animal, stated she previously developed a skin lesion that was diagnosed as sporotrichosis.

Given the negativity of the environmental samples analysed, it can be concluded that the *S. schenckii* complex appears to have a rare expression in Portugal. However, the appearance of a few confirmed and suspected cases of sporotrichosis in cats in the Lisbon area may suggest that, as in other regions of the world, abandoned cats may be important reservoirs for the propagation of these agents in the community.

**Keywords:** *Sporothrix* sp, sporotrichosis, molecular identification, ITS region.

## ÍNDICE

### 1 INTRODUÇÃO

1.1 Primeiros relatos de esporotricose .....	1
1.2 Taxonomia do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> . .....	1
1.3 Epidemiologia da esporotricose e distribuição geográfica das espécies clinicamente relevantes de <i>Sporothrix</i> .....	5
1.4 Ecologia .....	9
1.5 Características fenotípicas .....	12
1.6 Patogenia e formas clínicas.....	13
1.7 Fatores de virulência.....	16
1.8 Diagnóstico da esporotricose .....	18
1.9 Tratamento da esporotricose .....	19
1.10 Identificação molecular.....	22
1.11 Objetivos do trabalho de dissertação .....	26

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção dos Locais de Amostragem .....	28
2.2 Tratamento das Amostras .....	30
2.3 Identificação dos isolados de fungos .....	31
2.4 Identificação molecular.....	32
2.4.1 Extração de DNA de culturas e amostras ambientais pelo método do azoto líquido .....	33
2.4.2 Lise e Extração de DNA a partir de amostras clínicas .....	34
2.4.3 Purificação dos extratos de DNA das amostras de guano de morcego.....	35

2.4.4 Primers utilizados na reação PCR.....	35
2.4.5 Detecção do complexo <i>S. schenckii</i> a partir de amostras ambientais e clínicas .....	38
2.4.6 Identificação dos membros do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> a partir de culturas.....	39
2.4.7 Sensibilidade Analítica dos ensaios de PCR.....	41
2.4.8 Especificidade Analítica dos ensaios de PCR.....	41
<b>3. RESULTADOS</b>	
3.1 Observação Morfológica dos Isolados.....	42
3.2 Pesquisa de <i>Sporothrix</i> sp em amostras ambientais e clínicas usando métodos baseados em cultura .....	43
3.3 Design e avaliação da especificidade <i>in silico</i> dos <i>primers</i> .....	44
3.3.1 Especificidade do ensaio de PCR .....	44
3.4 Sensibilidade do ensaio de PCR .....	46
3.4.1 Análise da sensibilidade do ensaio de PCR com estratos de amostras artificialmente contaminadas com DNA de <i>Sporothrix</i> sp .....	47
3.5 Resultados da análise das amostras ambientais e clínicas com os ensaios de PCR....	49
<b>4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	61
<b>6. ANEXOS</b> .....	71



## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Árvore filogenética baseada na análise dos genes da quitina sintetase (CHS), da $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -t2) e da calmodulina (CAL) de várias espécies de <i>Sporothrix</i> .....	4
<b>Figura 2-</b> Distribuição mundial de esporotricose.....	5
<b>Figura 3</b> – Distribuição global das espécies <i>S. brasiliensis</i> , <i>S. globosa</i> , <i>S. schenckii</i> (clados IIa e IIb).....	9
<b>Figura 4-</b> Possíveis vias de transmissão da esporotricose humana e animal. ....	11
<b>Figura 5-</b> Preparação com azul de lactofenol de hifa de <i>Sporothrix schenckii</i> com conidióforos tipicamente dispostos em forma de roseta.....	13
<b>Figura 6-</b> Esporotricose cutânea fixa. Placa verrucosa no local da inoculação na face de uma criança (adaptado de Mahajan, 2014).....	14
<b>Figura 7-</b> (A) Úlceras cutâneas com 2 meses de evolução, com crosta verrucosa no abdómen e na fossa antecubital do braço esquerdo, característico da forma cutânea disseminada da esporotricose; (B) Úlcera eritematosa no dedo indicador esquerdo e nódulos eritematosos subcutâneos ao longo do circuito linfático, correspondente à apresentação clássica da forma linfocutânea da esporotricose; (C) Lesões noduloulcerativas ao longo da corrente linfática na perna.....	15
<b>Figura 8-</b> (A) Gato com lesões ulcerativas, crostas hemorrágicas e alopecia, característica de esporotricose felídea. (B) Gato com múltiplas lesões ulcerativas nos membros anteriores.....	16
<b>Figura 9-</b> Localização das amostragens realizadas. A informação relativa a cada número encontra-se na Tabela 4.....	28
<b>Figura 10-</b> Exemplos de locais onde foram realizadas as amostragens ambientais neste trabalho. À esquerda, local de alimentação de uma das colónias de gatos de rua na Idanha, Lisboa. À direita, colónia de morcegos ( <i>Myotis myotis</i> ) na Gruta do Almonda, Torres Novas (foto gentilmente cedida por Sérgio Barbosa).....	29

<b>Figura 11-</b> Esquema mostrando a localização da região ITS, que compreende as regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2, entre os genes codificantes do 18S e 28S rRNA. São também mostradas as regiões alvo dos <i>primers</i> desenhados neste trabalho.....	37
<b>Figura 12-</b> Algoritmo para a detecção do complexo <i>S. schenckii</i> a partir de amostras ambientais e clínicas com base em ensaios de PCR.....	39
<b>Figura 13-</b> Culturas de várias espécies de <i>Sporothrix schenckii sensu lato</i> , com 13 dias de incubação a 25°C: A) <i>Sporothrix schenckii sensu strictum</i> (MUM 17.25); B) <i>Sporothrix brasiliensis</i> (MUM 17.05) C) <i>Sporothrix pallida</i> (MUM 17.04); D) <i>Spororhtix ghanensis</i> (MUM 17.03); E) <i>Sporothrix globosa</i> (MUM 17.23); F) <i>Sporothrix mexicana</i> (MUM 17.07); G) <i>Sporothrix inflata</i> (MUM 17.01); H) <i>Sporothrix fungorum</i> (MUM 17.02).....	43
<b>Figura 14.</b> Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias espécies de <i>Sporothrix</i> e de outras espécies fúngicas habitualmente encontradas no ambiente, utilizando o conjunto de primers ITS3+SSP1/SSP2.....	45
<b>Figura 15-</b> Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias espécies de <i>Sporothrix</i> e de outras espécies fúngicas habitualmente encontradas no ambiente, utilizando o conjunto de primers ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2...	45
<b>Figura 16.</b> Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de <i>Sporothrix schenckii</i> para o teste de sensibilidade analítica com o par de primers ITS3+SSP1/SSP243.....	46
<b>Figura 17-</b> Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de <i>Sporothrix schenckii</i> para o teste de sensibilidade analítica com o par de primers ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2.....	47
<b>Figura 18-</b> Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de <i>Sporothrix schenckii</i> adicionado artificialmente a extratos de amostras ambientais, para o teste de sensibilidade analítica com o conjunto de primers ITS3+SSP1/SSP2.....	48
<b>Figura 19-</b> Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de <i>Sporothrix schenckii</i> adicionado artificialmente a extratos de	

amostras ambientais, para o teste de sensibilidade analítica com o par de primer ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2.....	48
<b>Figura 20-</b> Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias amostras clínicas, utilizando o conjunto de primers ITS3+SSP1/SSP2.....	50
<b>Figura 21-</b> Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias amostras clínicas, utilizando o conjunto de primers ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2+SSP1/SSP2.....	50
<b>Figura 22-</b> Filograma derivado da análise de todas as sequências tipo ITS das espécies clinicamente importantes de <i>Sporothrix</i> sp depositadas no Genbank.....	51
<b>Figura 23-</b> Imagens dos casos suspeitos de esporotricose de dois gatos pertencentes a colónias de rua da zona de Lisboa. ....	53
<b>Figura 24-</b> Locais em Portugal onde foi detetada a presença de <i>Sporothrix</i> .....	59

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Recomendações das opções terapêuticas pela Sociedade Americana de Doenças Infeciosas no tratamento de esporotricose .....	21
<b>Tabela 2-</b> Recomendações das opções terapêuticas no tratamento da esporotricose felina.....	22
<b>Tabela 3-</b> Métodos moleculares e respectivos genes alvo usados em vários estudos visando identificar membros do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	24
<b>Tabela 4-</b> Listagem dos locais de amostragem ambientais e clínicas, datas em que esses locais foram visitados e número de amostras colhidas em cada local.....	30
<b>Tabela 5-</b> Estirpes representativas das principais espécies do complexo <i>Sporothrix</i> e de outras espécies <i>Sporothrix</i> usadas neste trabalho.....	32
<b>Tabela 6-</b> Sequências oligonucleotídicas dos primers utilizados neste trabalho.....	36
<b>Tabela 7-</b> Polimorfismos nucleótidos presentes na região ITS que permitem a diferenciação entre os membros do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	37
<b>Tabela 8-</b> Mistura reacional utilizada na reação de PCR para a amplificação da região ITS das espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Primeiros relatos da esporotricose

Descrições proporcionadas por Linck em 1809, indicam o que poderá ter sido o primeiro caso de esporotricose humana relatado na literatura. Também Lutz, em 1889, discutiu a possibilidade de um caso de esporotricose, contudo nenhum dos autores conseguiu isolar o organismo (Barros et al., 2011). Foi Benjamin Schenck, quem isolou com sucesso pela primeira vez, em 1896 o fungo causador da esporotricose, hoje conhecido como *Sporothrix schenckii*, a partir de secreções purulentas de um dos abscessos da mão e braço direito de um paciente de 36 anos, do sexo masculino (Schenck, 1896 citado em Barros et al., 2011). Na altura um estudante de medicina no prestigiado Hospital Universitário John Hopkins, em Baltimore, Schenck enviou o isolado ao micologista Erwin Smith, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos em Washington, que concluiu que o organismo pertencia ao género *Sporotrichum* (Hektoen & Perkins, 1900).

Em 1900 Hektoen e Perkins, descreveram o segundo caso indiscutível de esporotricose numa criança de 5 anos, a qual apresentava ulceração crónica no dedo indicador e linfangite associada no antebraço esquerdo, resultante de traumatismo ao manejar um martelo. Com base numa exaustiva observação das características morfológicas e culturais do agente, e posterior comparação com o fungo isolado por Schenck, os autores concluíram que se encontravam perante o mesmo organismo (Hektoen & Perkins, 1900).

A primeira descrição de um caso de infeção em animais foi feita por Adolpho Lutz e Alfonso Splendore em 1907 no rato comum (*Mus decumanus*) no Brasil. Nos seus relatos foi ainda proposta a possibilidade de inoculação do agente no homem através da mordedura de animais (Lutz & Alfonso, 1907 citado em Lopes-Bezerra, 2006).

### 1.2 Taxonomia do complexo *Sporothrix schenckii*

A classificação taxonómica dos organismos, nomeadamente dos fungos, não é uma ciência fixa e imutável. Com o advento das técnicas de identificação molecular, novas

espécies têm sido descritas e a conformação taxonômica de muitos grupos de organismos tem vindo a ser atualizada.

Formalmente, as espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii*, pertencem ao Reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophiostomales* e família *Ophiostomaceae* (Guarro et al., 1999).

Até muito recentemente, atribuía-se a esporotricose a uma única espécie, *S. schenckii*, contudo, ao longo dos anos e através de vários estudos moleculares, baseados em diversas metodologias e análise de diferentes sequências de genes alvo, foi possível aferir a existência de um elevado grau de heterogeneidade intraespecífica entre isolados clínicos estudados, o que indicaria que estes não pertenceriam a uma mesma espécie (Oliveira et al., 2014a). Através da utilização da técnica de tipagem *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), Liu e colaboradores foram dos primeiros a relatar a existência de uma elevada variabilidade genética dentro desta espécie. Adicionalmente, estes autores sugeriram também que a variabilidade característica de cada isolado estaria relacionada com a sua região geográfica de origem (Liu et al., 2003 citado em Almeida-Paes et al, 2015). Posteriormente, Marimon e colaboradores vieram corroborar estas indagações, onde através da análise do gene da calmodulina de 127 isolados, concluíram que as diferenças entre alguns isolados eram significativas ao ponto de os considerar representantes de espécies distintas. Estes autores descreveram, em 2007, três novas espécies dentro do complexo *Sporothrix schenckii*: *S. brasiliensis*, *S. mexicana* e *S. globosa*. Para além da análise do gene da calmodulina, foram utilizados critérios de classificação baseados nas características fenotípicas dos isolados como a presença ou ausência de conídios sésseis, a sua morfologia, o diâmetro das colónias após incubação a diferentes temperaturas 20, 30, 35 e 37° C por 21 dias em meio PDA (potato dextrose agar), o termodimorfismo e os testes de assimilação de algumas fontes de carbono tais como a sacarose, rafinose e o ribitol (Marimon et al., 2007). Posteriormente, com base nas características fenotípicas e análise de sequências de outros genes, os mesmos autores propuseram a elevação da variedade *S. schenckii* var. *luriei* a uma espécie distinta denominada *S. luriei*, também caracterizada pela ausência de conídios sésseis pigmentados e a inaptidão para assimilar sacarose e rafinose (Marimon et al., 2008). A espécie *S. mexicana* encontra-se filogeneticamente distante do grupo das principais espécies patogénicas de *Sporothrix*, nomeadamente

contendo *S. schenckii sensu strictu*, *S. globosa* e *S. brasiliensis* (Zhang et al., 2015). Dos escassos casos descritos na literatura sobre esporotricose relacionada com infecção por *S. mexicana*, foi descrito um caso de doença disseminada em 2011 num paciente imunocompetente em Vila Nova de Famalicão, Portugal (Dias et al., 2011).

Várias espécies de *Sporothrix* são consideradas estritamente ambientais, tais como *S. pallida*. Estudos filogenéticos recentes, baseados na análise das sequências da região espaçadora intergénica (ITS), verificaram também que outras espécies ambientais, como *S. albicans* e *S. nivea*, eram sinónimos de *S. pallida*. Apesar de estarem essencialmente associados ao ambiente, têm sido relatados alguns casos de infecção causados por isolados de *S. pallida*. Recentemente, foi reportado um caso de queratite, causado por *S. pallida*, num paciente recetor de transplante da córnea (Morisson et al., 2013). Por outro lado, num estudo com 26 isolados ambientais e 2 isolados clínicos em Itália, os autores puderam concluir que os isolados ambientais se encontravam erroneamente classificados como *S. schenckii*, e reidentificaram-nos como *S. pallida* com base na análise de sequências do gene da calmodulina (Romeo et al., 2011). Embora não existam descritos casos de esporotricose causados por *S. pallida*, não será então prudente eliminar a possibilidade de que alguns casos possam ter sido efetivamente causados por esta espécie, mas que os isolados tenham sido erradamente identificados como outras espécies do complexo clinicamente relevante (Morisson et al., 2013).

O grande avanço na compreensão da taxonomia do género *Sporothrix* deve-se à combinação da análise filogenética e das características morfológicas e fisiológicas exibidas pelos seus isolados (Rodrigues et al., 2016). Os principais agentes etiológicos da esporotricose encontram-se essencialmente agrupados num mesmo grupo filogenético, incluindo *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*. *Sporothrix mexicana* pode também causar raros episódios de infecção em mamíferos e encontra-se filogeneticamente mais distante das restantes espécies, como é possível apreciar através da análise da Figura 1, que representa uma árvore filogenética baseada na análise dos genes da quitina sintetase (CHS), da  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -t2) e da calmodulina (CAL) de várias estirpes de *Sporothrix* (Marimon et al., 2008). Para efeitos de estudos taxonómicos do género *Sporothrix*, um dos genes mais amplamente estudados é o da calmodulina, uma vez que possibilita a distinção entre as várias espécies do complexo *S. schenckii*. Vários estudos demonstraram também que *S. schenckii* sofre recombinação





*stenoceras* (Barbee & Taylor, 1992 citado em Almeida-Paes et al., 2015). Contudo, trabalhos posteriores, através da análise da região ITS, revelaram que esta assunção estaria incorreta (De Beer et al., 2003). Estas conclusões foram também posteriormente confirmadas pela análise do gene da calmodulina (Rodrigues et al., 2013). Contudo, a existência de um estado sexuado nos representantes de *Sporothrix* é evidenciada pela identificação do locus MAT no genoma destas espécies, necessário para a reprodução sexuada em fungos filamentosos heterotáticos. Por exemplo, foi recentemente identificada a presença do gene MAT1-2 em *S. globosa* (Kano et al., 2013).

### 1.3 Epidemiologia da esporotricose e distribuição geográfica das espécies clinicamente relevantes de *Sporothrix*

A esporotricose é uma micose subcutânea aguda ou crônica que afeta humanos e outros mamíferos (Télliez et al., 2014). Embora esta micose apresente uma distribuição global em zonas tropicais e subtropicais, existem regiões endêmicas onde são encontrados a grande maioria dos isolados clínicos, como é possível apreciar na Figura 2: China, África do Sul e Brasil (Zhang et al., 2015). Embora tenham sido reportados casos de esporotricose um pouco por todo o mundo, dado que não é uma doença de notificação obrigatória, a sua prevalência exata é ainda desconhecida (Chakrabarti et al., 2015).



**Figura 2-** Distribuição mundial de esporotricose (adaptado de Chakrabarti et al., 2015).

A esporotricose é a micose subcutânea mais prevalente na América do Sul, cuja incidência varia consoante a região. No Brasil é endêmica e foram reportados surtos importantes, em especial no Estado do Rio de Janeiro, onde as epidemias estão relacionadas com transmissão zoonótica de gatos para humanos (Oliveira et al., 2011). De facto, mais de 80% dos casos de esporotricose humana no Brasil estão associados a contacto prévio com felinos com esporotricose (Schubach et al., 2005). Segundo o Serviço de Epidemiologia e Avaliação da Universidade Federal do Rio de Janeiro, entre 1997 e 2007, foram reportados 1848 casos de esporotricose humana. De acordo com os dados do boletim epidemiológico de 2013/2014 da Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, foram confirmados 830 casos. O incremento acentuado de casos de esporotricose levou à inclusão desta micose, em Julho de 2013, na lista de doenças de notificação compulsória estadual. Este aumento de casos no Brasil está muitas vezes associado às baixas condições sócio-económicas da população, a falta de saneamento, falta de acesso aos serviços de saúde e habitação precária (Rodrigues et al., 2013). Pappas e colaboradores (1999), descreveram na região de Abancay, uma zona hiperendêmica de esporotricose na região centro-sul do Peru, 238 casos de doença num período de 3 anos (1995-1997). Contrariamente a dados epidemiológicos de outras regiões do mundo, encontrados noutros trabalhos, 60% dos pacientes apresentavam menos de 15 anos de idade e em apenas 7% dos casos de esporotricose os pacientes dedicavam-se à agricultura. A incidência geral, na região, é de 48-60 casos por cada 100,000 habitantes (Pappas et al., 1999).

Nos Estados Unidos a esporotricose é uma micose de baixa prevalência. Contudo, em 1988, um surto de esporotricose acometeu cerca de 84 pacientes de 15 estados. A fonte de infecção revelou ser a exposição dos doentes a musgo obtido no Estado do Wisconsin (Handlers, 1988).

Na China, a quase totalidade das infeções, é provocada por *S. globosa* (Liu et al., 2014). Num estudo onde foram examinados 74 isolados clínicos originários do Nordeste da China, através de análise filogenética concluiu-se que todos os isolados pertenciam à espécie *S. globosa* (Yu et al., 2013). Nesta região do país, a esporotricose acomete sobretudo trabalhadores agrícolas, os quais durante a época de colheita, são expostos a detritos de milho (Zhang et al., 2015).

No Japão, à semelhança de outros países asiáticos, o principal agente etiológico da esporotricose é *S. globosa*. Em 300 isolados clínicos, 291 foram identificados como *S. globosa* enquanto que 9 seriam *S. schenckii* sensu stricto (Suzuki et al., 2016).

Na Austrália têm vindo a ser reportados um número de casos crescente de esporotricose. Entre o ano de 2000 e 2003, foram confirmados microbiologicamente 41 casos em humanos, comparativamente com 8 casos entre 1997 e 1999 (Feeney et al., 2007).

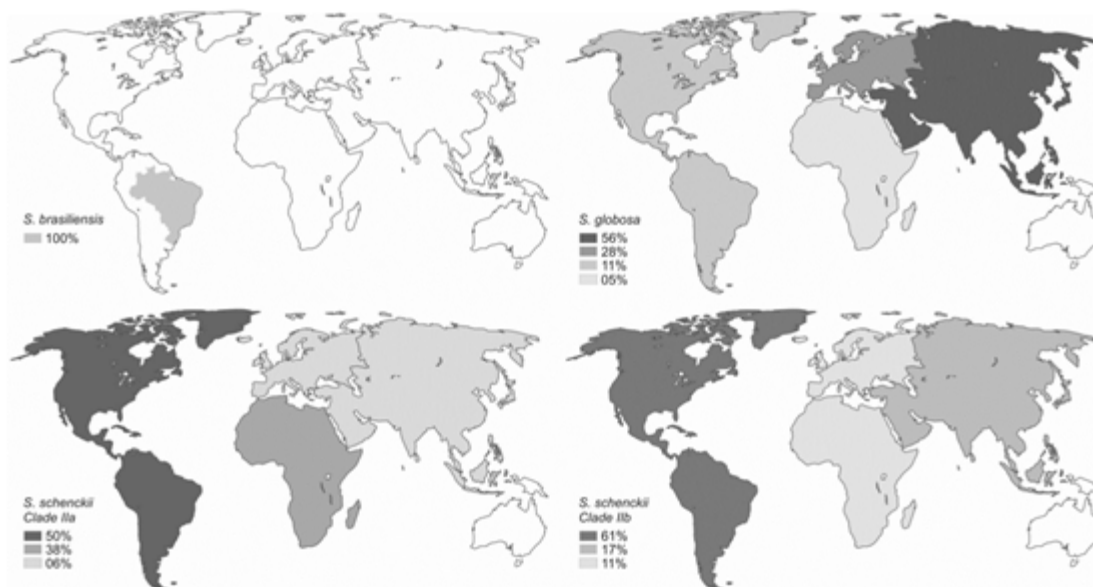
Desde a Primeira Grande Guerra que a esporotricose se considera uma micose rara na Europa, sendo que a sua prevalência diminuiu drasticamente, aparecendo excepcionalmente alguns casos (Symmers, 1968). Os escassos episódios de esporotricose na Europa são causados, provavelmente, por agentes etiológicos importados, o que pode explicar a relativa diversidade de espécies que ocorre nesta região do globo (Zhang et al., 2015). Em Itália, nomeadamente em Bari, na região de Apulia, foram descritos entre 1978 e 1992 cerca de 58 casos de esporotricose (Barile et al., 1993). Em França foram descritos cerca de 200 casos, entre 1903 e 1911. Magand e colaboradores descreveram, em 2009, um caso autóctone de esporotricose cutânea num paciente imunocompetente em França (Magand et al., 2009). Na localidade de Virgen Macarena, na província de Sevilha, foram reportados 8 casos de esporotricose cutânea em homens adultos imunocompetentes, entre Junho de 2006 e Janeiro de 2010 (Ojeda et al., 2011). Na província de Barcelona, em 1986, foram reportados dois casos de esporotricose num paciente do sexo masculino de 68 anos, residente em Terrasa, e numa jovem de 17 de Premiá de Mar. Foi realizado posteriormente um estudo na área geográfica descrita e isolado do ambiente uma estirpe de *S. schenckii* (Ventin et al., 1987). Em Portugal o primeiro caso reportado de esporotricose aconteceu em 2009, num paciente de 34 anos com múltiplas erupções e úlceras em ambos os pés, em Vila Nova de Famalicão. O organismo, isolado em cultura e posteriormente sujeito a testes bioquímicos e técnicas de amplificação de DNA (ácido desoxirribonucleico), foi identificado como *S. mexicana*. O paciente recordou uma viagem realizada em 2003 à Malásia onde utilizou calçado aberto, o que poderia explicar o aparecimento das lesões nas extremidades inferiores. Já em Portugal, em 2004, apareceram nódulos subcutâneos em ambos os pés, que sararam espontaneamente. No entanto, em 2005, voltaram a aparecer lesões e a infeção tornou-se crónica (Dias et al., 2011). Em 2014, foi descrito o primeiro caso de esporotricose autóctone em Portugal, na cidade de Lisboa, num paciente

imunocompetente com lesões na mão direita, apresentando esporotricose linfocutânea localizada. O agente etiológico, identificado como *S. globosa*, foi identificado através de análises fenotípicas e moleculares (Oliveira et al., 2014b).

Embora a esporotricose ocorra de forma esporádica no ser humano, principalmente relacionada com atividades laborais e ocupacionais que impliquem a exposição a matéria vegetal, desde a identificação do agente etiológico até aos dias de hoje, foram reportadas algumas epidemias importantes. A maior epidemia ocorreu na África do Sul entre 1941 e 1944, que acometeu cerca de 3000 mineiros e cuja fonte de contaminação seriam as madeiras utilizadas na sustentação dos telhados das minas (Helm et al., 1947 citado em Chakrabarti et al., 2015). O perfil epidemiológico da esporotricose mudou nos últimos 20 anos, de uma micose rara com baixa prevalência, para um problema de saúde pública a considerar em algumas zonas do globo, podendo alcançar proporções epidêmicas. Especialmente em zonas hiperendêmicas, como acontece por exemplo na zona do Rio de Janeiro, no Brasil, medidas preventivas de saúde pública devem ser implementadas por forma a controlar a ocorrência de novos casos, como por exemplo: a sua inclusão na lista de doenças de notificação obrigatória; implementação de programas de controle da esporotricose; criação de ações informativas de prevenção entre veterinários, tratadores e donos de gatos domésticos e implementação de normas standardizadas de diagnóstico e de tratamento da esporotricose nos laboratórios e unidades de saúde (Barros et al., 2010).

As diferentes espécies que compreendem o complexo *Sporothrix schenckii* diferem na sua distribuição geográfica (Figura 3). *S. brasiliensis*, com um elevado grau de patogenia para o homem, é o agente etiológico da esporotricose felina e encontra-se, aparentemente, restrito ao Brasil (Rodrigues et al., 2013). As restantes espécies do complexo foram isoladas praticamente em todo o globo. *S. globosa* apresenta uma distribuição cosmopolita, e podem ser encontrados isolados clínicos desde a Europa (Itália, Inglaterra, Espanha, Portugal), Estados Unidos, América do Sul (México, Guatemala, Colômbia) e Ásia (Índia, China, Japão) (Chakrabarti et al., 2015). Da espécie *S. luriei* conhecem-se isolados de África, Itália, Índia e um caso de esporotricose canina no Brasil. *S. schenckii* sensu stricto, à semelhança de *S. globosa*, é uma espécie cosmopolita, tendo sido isolada em todo o continente Americano (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Estados Unidos, Guatemala, México, Peru,

Venezuela), Europa (França, Itália, Reino Unido), África (África do Sul) e Ásia (Japão). *Sporothrix mexicana*, uma espécie com baixo potencial patogénico para o homem, foi isolada do ambiente no México, Austrália e conhece-se um caso clínico em Portugal, provavelmente importado da Malásia (Chakrabarti et al., 2015; Oliveira et al., 2014b).



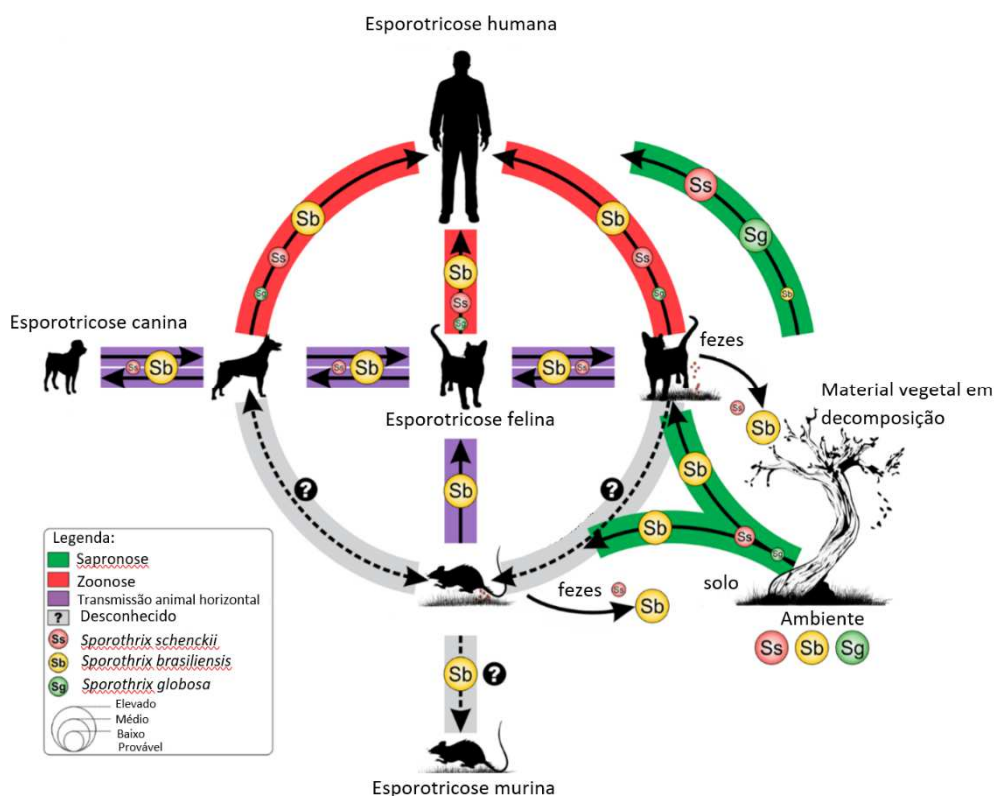
**Figura 3** – Distribuição global das espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. schenckii* (clados IIa e IIb). O clado IIa corresponde a um grupo homogéneo que inclui isolados da América do Sul como Bolívia, Argentina, Colômbia e Peru e da América do Norte; no clado IIb encontram-se agrupados isolados provenientes do Peru e Argentina). As percentagens indicadas na figura para cada espécie correspondem à proporção dos isolados obtidos a partir de cada região geográfica (adaptado de Zhou et al., 2013 e de Chakrabarti et al., 2015).

#### 1.4 Ecologia

Na natureza, as espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii* são fungos ubiquitários encontrados em matéria orgânica e solos ricos em húmus (Bravo, 2012). Da biomassa preferencialmente contaminada pelo fungo, encontramos o musgo em decomposição, o feno e os espinhos de roseiras (Barros et al., 2011). O agente no ambiente já foi isolado do solo (Mehta et al., 2007; Rodrigues et al., 2014), do milho (Mehta et al. 2007) e de material orgânico como musgo (Handlers, 1988) ou feno (Feenery et al., 2007; O'Reilly et al., 2006). As espécies pertencentes a este grupo têm a

capacidade de crescer em solos com valores de pH a variar entre 3,5 e 9,4, temperatura média de 31°C e humidades relativas não inferiores a 92% (Kazanas et al, 1983 citado em Barros et al., 2011).

A infecção causada por algumas das espécies do complexo *S. schenckii* pode afetar, para além do ser humano, outros mamíferos, incluindo gatos, ratos, cavalos, roedores e cães (Barros et al., 2011). A infecção resulta da inoculação dos conídeos, ou das formas leveduriformes (caso o agente de transmissão seja o gato), deste agente no hospedeiro, através de um processo traumático transcutâneo, normalmente associado a ocupações profissionais ou recreativas que envolvam o manejo de matéria vegetal, tais como a agricultura, jardinagem e silvicultura. As vias de transmissão da esporotricose humana e animal variam consoante a espécie (Figura 4). As espécies *S. schenckii* e *S. globosa* encontram-se presentes no substrato abiótico como o solo, ou material biótico em decomposição. A transmissão zoonótica é a via eleita por *S. brasiliensis* e está associada a mordeduras e arranhões de gatos e tatus (Chakrabarti et al., 2015). Este último animal não é infetado, mas é um potencial reservatório do fungo (Conti-Diaz, 1989 ; Rodriguez et al., 2014b). Nos gatos, os locais das lesões como a cabeça, membros e cauda, refletem zonas preferenciais a mordeduras e arranhadelas durante as lutas. (Lloret et al., 2015). Num estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2013), foi demonstrado que o agente etiológico da esporotricose felídea mais prevalente no Brasil é *S. brasiliensis* (em 96,9% das amostras) o que pode explicar a prevalência de casos de esporotricose humana por *S. brasiliensis* neste estado e no resto do país. Possivelmente as garras dos felídeos são o primeiro local de aquisição de propágulos fúngicos, presentes no solo, sendo posteriormente transportados para a cavidade oral. A inoculação das células leveduriformes, forma mais virulenta do agente, do gato para o homem ocorre através de mordeduras e arranhões (Rodrigues et al., 2013). A esporotricose felina nos últimos anos teve um impacto importante na epidemiologia da esporotricose humana, com a ocorrência de surtos em grandes áreas geográficas como acontece por exemplo na região do Rio de Janeiro no Brasil. Raramente, outra possível rota de transmissão é a inalação dos esporos do fungo (López- Romero et al., 2011). Casos pulmonares de esporotricose foram reportados em pacientes imunodeprimidos, em especial pacientes VIH positivos (Chakrabarti et al., 2015).



**Figura 4-** Possíveis vias de transmissão da esporotricose humana e animal. Na via de transmissão saprofítica (rota verde), os agentes etiológicos *S. schenckii* ou *S. globosa*, encontram-se presentes no solo e em material vegetal e podem infectar diretamente mamíferos que entrem em contacto com material (a)biótico. No caso da via zoonótica, associada maioritariamente à infecção por *S. brasiliensis* (embora tanto *S. schenckii* quanto *S. globosa* possam tomar esta via) os microorganismos presentes no ambiente infectam animais como o gato, e este acaba por servir como reservatório da infecção e veículo de propagação, podendo transmitir a outros animais, particularmente o homem (adaptado de Rodrigues et al., 2016).

A distribuição restrita de *S. brasiliensis* tem que ver com o carácter sedentário do hospedeiro que infeta, o gato (Rodrigues et al., 2016). Já nas espécies *S. schenckii* e *S. globosa*, outro mecanismo de propagação poderá explicar a sua distribuição global, como a dispersão de propágulos ou conídios pelo vento, insetos e outros materiais como as misturas de solo para a agricultura. *S. mexicana*, raramente agente causador de esporotricose, é uma espécie ambiental, isolada em diferentes regiões do mundo e, portanto, os mecanismos de propagação poderão ser os mesmos que os citados para *S.*

*schenckii* e *S. globosa*. Atualmente só se conhece um isolado ambiental de *S. brasiliensis*, isolado de pó doméstico no Brasil (Marimon et al., 2007).

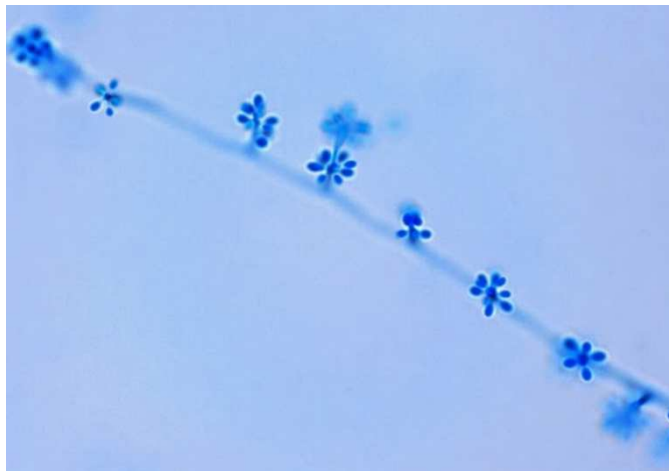
A esporotricose pode afetar qualquer sexo e faixa etária, contudo parece existir uma predominância sexual que varia de acordo com a espécie (Moussa et al., 2017).

### 1.5 Características fenotípicas

Os membros do complexo *Sporothrix schenckii* são fungos dimórficos. Quando cultivados a temperaturas entre os 25 e 28°C assumem a forma filamentosa, saprófita, que consiste em hifas estreitas (1 a 2 µm), septadas e hialinas. As culturas filamentosas possuem uma superfície membranosa rugosa, inicialmente de cor branca que adquire, gradualmente, cerca de 10 a 14 dias após cultura, uma coloração mais escura, acastanhada (Larone, 1994). As colônias, quando incubadas a 25-28°C em meio de Sabouraud, levam até cerca de duas semanas a crescer (Pappas et al., 2011). A partir das hifas surgem células conidiogênicas denticuladas, de onde se formam os conídios unicelulares (2×3 µm a 3×6 µm) em aglomerados por conidiogênese (blástica) simpodial em esterigmas ou dispostos em forma de roseta, como é possível observar na Figura 5. Os conídios podem ser hialinos, os quais surgem de dentículos distintos na porção apical dos conidióforos, pequenos e ovóides e que podem medir entre 2 a 8 µm de comprimento e 1,5 a 2,5 µm de largura; e/ou demáceos, maiores do que os primeiros, com parede celular espessa, de coloração castanho escuro, surgem habitualmente individualizados em dentículos curtos, ao longo das laterais das hifas vegetativas (St-Germain & Summerbell, 1996 citado em Barros et al., 2011). Estes últimos, também denominados de conídios sésseis, são uma ferramenta importante para a distinção das diferentes espécies do complexo. De acordo com o estudo realizado por Marimon e colegas (2007), as espécies *S. brasiliensis* e *S. globosa* apresentam conídios sésseis globosos a subglobosos; *S. schenckii* (clado IIb) apresenta conídios com forma triangular a cuneiforme; *S. mexicana* apresenta conídios com forma subglobosa obovoide a elipsoidal; e *S. schenckii* (clado IIa) e *S. albicans* não produzem conídios sésseis pigmentados. Também *S. luriei* não produz este tipo de conídios pigmentados, no entanto uma característica morfológica particular desta espécie é a presença de conídios alongados (Marimon et al., 2008).



Quanto à forma parasitária, encontrada após inoculação traumática do agente em tecido humano e animal, consiste na apresentação de células leveduriformes de tamanhos variados, com forma ovalada ou alongada. Esta forma, raramente observada em exame histopatológico, pode ser obtida através da cultura do micélio ou dos conídios em meio rico, Brain Heart Infusion (BHI) ou gelose de sangue a 35-37°C. Esta característica dimórfica do fungo pode servir como auxílio para diagnóstico. Não se conhece nenhuma forma teleomórfica associada a estas espécies (Barros et al., 2011).



**Figura 5-** Preparação em azul de lactofenol de hifa de *Sporothrix schenckii* com conidióforos tipicamente dispostos em forma de roseta (foto gentilmente cedida por Yuri Amatnieks).

## 1.6 Patogenia e formas clínicas

A esporotricose pode apresentar várias formas clínicas. Em humanos, inicialmente, as lesões apresentam-se como pequenos nódulos verrucosos, eritematosos que podem ulcerar, ou não, no local da inoculação, e podem acometer somente a pele e os tecidos subcutâneos circunscritos à zona do trauma (Murray, 2010). Esta apresentação, forma cutânea fixa (Figura 6) tem um maior envolvimento facial do que a forma linfocutânea (Mahajan, 2014). Este tipo de apresentação clínica, embora globalmente não seja a forma mais comum, é a dominante na China (Zhang et al., 2015). A forma multifocal ou cutânea disseminada (Figura 7A) implica a presença de mais do que três lesões envolvendo dois locais anatómicos distintos, com disseminação cutânea após

implantação traumática do fungo (Mahajan, 2014). A forma linfocutânea (Fig. 7B e 7C) é a mais frequente, representando cerca de 75% dos casos (Carlos, 2015). As extremidades são habitualmente as regiões mais afetadas. Esta manifestação consiste no aparecimento de lesões nodulares em cadeia, que se estendem ao longo do circuito linfático, a partir da lesão primária no local de inoculação, e que podem ulcerar, libertando material purulento (Murray, 2010).



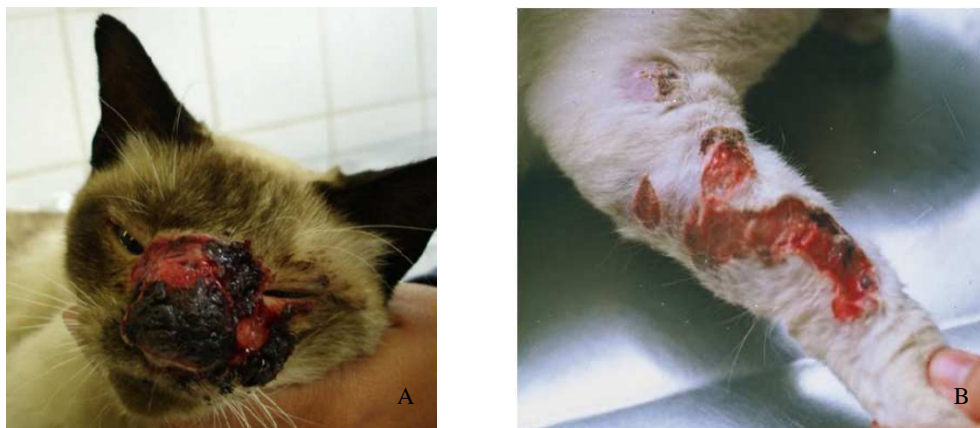
**Figura 6-** Esporotricose cutânea fixa com apresentação de placa verrucosa no local da inoculação do fungo na face de uma criança (adaptado de Mahajan, 2014).

Habitualmente as lesões são indolores, podendo posteriormente causar prurido ou dor (Mahajan, 2014). A disseminação hematogénica do fungo pode causar infeção noutras órgãos, constituindo a forma disseminada ou extracutânea da doença. Os casos de doença disseminada ocorrem quase exclusivamente em pacientes com imunossupressão causada por HIV, diabetes ou alcoolismo, e pode afetar órgãos como os pulmões, o sistema nervoso central, os ossos e as articulações (Moreno, 2002). Contudo, foi documentado um caso de doença disseminada causada por *S. schenckii*, com envolvimento de medula, num paciente de 25 anos com linfocitopenia idiopática de CD4, onde o paciente acabou por falecer devido ao atraso no reconhecimento do agente causal e na administração de tratamento apropriado (Yagnik et al., 2017).



**Figura 7** (A) Úlceras cutâneas com 2 meses de evolução, com crosta verrucosa no abdômen e na fossa antecubital do braço esquerdo, característico da forma cutânea disseminada da esporotricose (adaptado de Nassif et al., 2012); (B) Úlcera eritematosa no dedo indicador esquerdo e nódulos eritematosos subcutâneos ao longo do circuito linfático, correspondente à apresentação clássica da forma linfocutânea da esporotricose (adaptado de Xavier et al., 2008); (C) Lesões noduloulcerativas ao longo da corrente linfática na perna (adaptado de Mahajan, 2014).

No caso dos felinos, um dos mamíferos mais afetados por esta micose, e à semelhança dos humanos, a infecção pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas. Contudo, as formas mais frequentemente encontradas são a forma linfocutânea e cutânea localizada, com múltiplas lesões ulcerativas na pele e, muitas vezes, com comprometimento das mucosas nasal e oral (Figura 8). No caso dos gatos, a esporotricose é especialmente difícil de tratar uma vez que o tratamento é demorado e afeta maioritariamente gatos de rua, com os quais é difícil manter uma monitorização adequada (Gremião et al., 2015). O período exato de incubação da infecção permanece incerto, sendo que pode demorar de alguns dias a poucos meses até ao aparecimento dos primeiros sintomas (Mahajan, 2014).



**Figura 8-** (A) Gato com lesões ulcerativas, crostas hemorrágicas e alopecia, característica de esporotricose felídea (adaptado de Borges et al., 2013). (B) Gato com múltiplas lesões ulcerativas nos membros anteriores (adaptado de Lloret et al., 2013).

O potencial patogénico dos agentes da esporotricose está relacionado não só com características extrínsecas inerentes ao hospedeiro, como a imunidade do mesmo, o modo de inoculação, a dose infectante, como também com a termotolerância das espécies fúngicas. Algumas estirpes, aparentemente, parecem crescer melhor a 35 °C, como no caso de *S. globosa*, o que poderá explicar a predisposição para a forma clínica maioritariamente cutânea no caso de infeções causadas por esta espécie. Por outro lado, estirpes que crescem preferencialmente a temperaturas entre os 35 °C e os 37°C, nomeadamente *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, parecem estar intimamente ligadas às formas disseminadas e sistémicas da infeção (Mahajan, 2014).

### **1.7 Fatores de virulência**

Ainda pouco se conhece sobre os fatores de virulência e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da esporotricose. Contudo, sabe-se atualmente que algumas características inerentes ao agente, como a sua termotolerância, a produção de melanina, a secreção de certas proteínas e outros componentes da parede celular, podem influenciar as manifestações clínicas desta micose (Barros et al., 2011). Estas características e moléculas permitem ao fungo colonizar com maior eficácia o hospedeiro e evadir-se com certa facilidade do sistema imunitário. Em estudos

anteriores ao reconhecimento das seis espécies do complexo clinicamente importantes, já se havia percebido deste grau de heterogeneidade com respeito às manifestações clínicas da esporotricose, que aparentemente se relacionava não só com a dose infectante, o sistema imunitário do hospedeiro ou a profundidade da inoculação, mas também com a origem geográfica, a termotolerância da estirpe e o modo de inoculação do agente no hospedeiro (Almeida-Paes et al., 2015). Após a identificação das seis espécies crípticas do complexo, as diferenças tornaram-se ainda mais evidentes. Estudos experimentais realizados posteriormente, utilizando modelos animais, revelaram diferenças na virulência entre as diferentes espécies, demonstrando *S. brasiliensis* como sendo a espécie mais virulenta, isolada de órgãos como os pulmões e o fígado, os rins e os testículos, e causadora de maior dano tecidual e taxas de mortalidade mais elevadas com menor dose infectante (Arrillaga- Moncrieff et al., 2009). *S. schenckii* sensu stricto aparenta ser a segunda espécie mais virulenta, enquanto *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. albicans* (formalmente sinónimo de *S. pallida*) demonstram menor, ou nenhum grau de virulência no modelo animal utilizado (Arrillaga- Moncrieff et al., 2009).

Uma característica curiosa ligada à virulência deste grupo de organismos é a produção de melanina. Muitas espécies de fungos, patogénicas ou não, produzem melanina (Hensen et al, 1999 citado em Almeida-Paes et al., 2017). Este é um composto pigmentado, localizado na parede celular, importante na sobrevivência do fungo no ambiente e em que, no caso dos fungos patogénicos, a sua expressão está relacionada com a virulência (Almeida-Paes et al., 2017). Em *Sporothrix*, tanto a forma filamentosa quanto a forma leveduriforme são melanizadas e pensa-se que o processo de melanização esteja relacionado com fatores como a temperatura, o pH e condições nutricionais (Almeida-Paes et al., 2009). De acordo com um estudo realizado por Madrid e colaboradores (2010), a melanina apresenta também um papel importante na patogénese da esporotricose cutânea. Segundo estes autores, isolados pigmentados têm uma maior capacidade invasiva do que estirpes albinas mutantes num modelo animal experimental. A melanina, no caso dos fungos patogénicos, para além de inibir o sistema imune inato, impede a ação de alguns antifúngicos de alcançarem os seus alvos dentro das células fúngicas (Almeida-Paes et al., 2017).

Com respeito à termotolerância, como já foi referido anteriormente, alguns isolados aparentemente não conseguem crescer a temperaturas superiores a 37 °C, o que

impossibilita a capacidade destas estirpes em causar as formas linfáticas da infecção (Kwon-Chung et al., 1992 citado em Barros et al., 2011). Num estudo realizado onde se pretendia associar as características fenotípicas de *S. schenckii* com as diferentes origens geográficas, os autores demonstraram que os isolados provenientes do México e da Guatemala conseguiam crescer a temperaturas de 37 °C, o que poderia explicar a maior prevalência de casos de esporotricose linfática nestes países. Em contraste, nos isolados provenientes da Colômbia o crescimento foi inibido a temperaturas acima dos 35 °C, o que por sua vez explica a maior ocorrência de casos da forma cutânea de esporotricose (Mesa-Arango et al., 2002).

A adesão é outra das características importantes para a eficiência da disseminação da infecção. Em *S. schenckii*, as células fúngicas têm a capacidade de reconhecer glicoproteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, sendo que esta interação é mediada por adesinas presentes na superfície das células fúngicas (Lima et al., 2001).

Também a presença de peróxido de ergosterol terá uma função protetora no caso de *S. schenckii*, uma vez que estimula a evasão à fagocitose (Sgarbi et al., 1997 citado em Barros et al., 2011).

### **1.8 Diagnóstico da esporotricose**

O diagnóstico diferencial da esporotricose é um desafio, dado que esta micose mimetiza uma série de outras doenças do foro dermatológico, como por exemplo a leishmaniose cutânea, a cromoblastomicose ou a tuberculose verrucosa, podendo desta forma induzir o clínico em erro (Echevarría & Ramos, 2002).

O exame microscópico direto, embora seja uma das ferramentas de diagnóstico utilizadas, possui baixa sensibilidade e especificidade dada a escassez ou até mesmo ausência de células leveduriformes em material histopatológico. A cultura torna-se, neste caso, o método de referência para a deteção e identificação do agente patogénico (Mahajan, 2014). No entanto, os métodos baseados na cultura do organismo e na sua identificação através da análise de características fenotípicas são pouco fiáveis, dada a semelhança morfológica entre as várias espécies do complexo *S. schenckii*, patogénicas ou não (Rodrigues, 2015). Uma vez que as espécies que compõem o complexo são

dimórficas, um dos critérios fisiológicos de identificação destes agentes é a apreciação da passagem das culturas para as duas formas, leveduriforme e micelial, em meio nutricionais diferentes, suplementados com cloranfenicol e cicloheximida (uma vez que as espécies clinicamente importantes apresentam resistência a este antifúngico) a diferentes temperaturas de incubação. Por isso mesmo, aquando do cultivo do material biológico, torna-se necessário inocular as amostras em meios de cultura distintos: BHI a 37°C, o qual permitirá apreciar a forma leveduriforme; e em meio de Sabouraud ou PDA (potato dextrose agar) a 25°C, que permite visualizar a fase micelial. Microscopicamente, a partir da fase filamentosa, é possível observar hifas septadas e conídeos deamáceos, originados a partir de estruturas denominadas conidióforos, presentes nas extremidades ou ao longo da hifa. Estes conidióforos apresentam uma morfologia muito característica em forma de “margarida”. É possível discriminar as diferentes espécies, com base nas características morfológicas e fisiológicas deste microorganismo, baseando-se na chave dicotómica desenvolvida por Marimon e colaboradores (2007). Contudo, dado que as espécies que compõem o complexo apresentam diferenças na sua distribuição geográfica, virulência e resistência aos antifúngicos, torna-se imperativa a sua identificação correta. Um diagnóstico incorreto pode conduzir a um tratamento inadequado, com um impacto importante no decurso da doença. O desenvolvimento de métodos moleculares para o diagnóstico da esporotricose torna-se deste modo indispensável, uma vez que permite uma discriminação mais correta e uma redução no tempo de diagnóstico.

### **1.9 Tratamento da esporotricose**

Dado que a regressão espontânea da infeção ocorre muito excecionalmente, a administração de um tratamento adequado torna-se imperativo para a esporotricose. A escolha da terapêutica mais adequada prende-se com fatores tais como: a acessibilidade ao medicamento, a forma de administração, o perfil de segurança, e a forma clínica que a infeção apresenta (Mahajan, 2014), como é possível apreciar na Tabela 1. São várias as terapêuticas que podem ser administradas, sendo que a mais utilizada mundialmente é a solução de iodeto de potássio, dado que, de todas as opções, é a mais acessível. É aconselhada a sua administração no caso de pacientes que apresentam casos não

complicados de esporotricose cutânea ou linfocutânea (Yamada et al., 2011; Costa et al., 2013). Uma alternativa a esta terapêutica, melhor tolerada e com igual taxa de sucesso, no caso das formas cutânea e linfocutânea, é o itraconazol. Já o fluconazol deve ser considerado como segunda linha de tratamento, uma vez que apresenta menor eficiência de resolução mesmo quando administrado em doses crescentes (Kauffman et al., 2007). As formas mais agressivas da infecção, no caso da forma disseminada de esporotricose, ou no caso de pacientes imunodeprimidos, requerem a utilização de outra classe de fármacos. A anfotericina B, antifúngico da classe dos polienos, é o medicamento de eleição para este tipo de pacientes e em caso de gravidez. O mecanismo de ação desta molécula não está completamente elucidado no caso da esporotricose. Contudo, este antifúngico pode causar a morte celular, seja ao promover a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ligar-se ao ergosterol, ou através da sua capacidade em causar autooxidação da membrana celular (Mahajan, 2014). A terbinafina pode ser uma boa opção terapêutica no caso da forma linfocutânea da doença, uma vez que é bem tolerada e apresenta elevada atividade antifúngica (Kauffman et al., 2007).

O perfil de resistência aos antimicóticos mais comumente administrados no tratamento da esporotricose varia consoante a espécie. Isto acarreta implicações na escolha de uma potencial terapia antifúngica, principalmente nos grupos de risco, como as gestantes e os pacientes imunodeprimidos. Estudos recentes sugerem variabilidade entre estirpes na sensibilidade aos antifúngicos, nomeadamente na classe dos azoles, como é o caso do itraconazol, um dos fármacos mais utilizados, posaconazol e voriconazol (Rodrigues et al., 2014c). Segundo os autores, tanto as estirpes de *S. schenckii* sensu stricto como *S. brasiliensis*, demonstraram valores baixos de Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) para o itraconazol e posaconazol, embora *S. brasiliensis* apresente valores ligeiramente inferiores. Dada a elevada heterogeneidade genética evidenciada por *Sporothrix schenckii* sensu stricto, é possível perceber uma ampla gama nos valores das CMIs para os vários fármacos. Quanto à anfotericina B, *Sporothrix schenckii* sensu stricto apresentou valores mais elevados nas CMIs comparativamente com *S. brasiliensis*. Os mesmos antifúngicos analisados, apresentaram pouca atividade para os isolados de *S. globosa* e *S. mexicana* estudados (Rodrigues et al., 2014c). Estudos sobre o perfil de resistência aos antifúngicos para *S. globosa* são escassos. Num estudo realizado no



Japão, os autores determinaram o perfil para 38 isolados de *S. globosa*, onde 11% dos isolados revelaram elevados valores de CMI (>16 µg/mL) para o itraconazol, e em que todas as estirpes exibiram baixa sensibilidade para anfotericina (1-4 µg/mL) (Suzuki et al., 2016).

**Tabela 1-** Recomendações das opções terapêuticas pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas no tratamento de esporotricose (adaptado de Mahajan, 2014)

<b>Manifestações Clínicas</b>	<b>Tratamento (dose)</b>	<b>Tratamento alternativo</b>	<b>Observações</b>
<b>Esporotricose cutânea não complicada</b>	Itraconazol (200 mg/dia)	Itraconazol (200 mg 2x por dia) ou terbinafina (500 mg 2x por dia) ou iodeto de potássio (doses crescentes) ou fluconazol (400-800 mg/dia) ou hipertermia local	Tratamento para 2-4 semanas após resolução das lesões.
<b>Esporotricose osteoarticular</b>	Itraconazol (200 mg 2× dia)	Anfotericina B Lipossomal (3-5 mg/kg/dia) ou anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg/dia) até resolução	Mudar para itraconazol após resolução e tratamento para um total de 12 meses.
<b>Esporotricose pulmonar</b>	Anfotericina B lipossomal (3-5mg/kg/dia) e depois itraconazol (200 mg 2×/dia)	Anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg/dia) até recuperação e depois itraconazol (200 mg 2× por dia)	Tratamento de doença não severa com itraconazol pelo menos 12 meses.
<b>Esporotricose meníngea</b>	Anfotericina B Liposomal (3-5 mg/kg/dia) e depois Itraconazol (200 mg 2× dia)	Anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg/dia) até recuperação e depois Itraconazol (200 mg 2× por dia)	A duração do tratamento com anfotericina B não está estabelecido. De 4-6 semanas e total de 12 meses. Terapia supressora com itraconazole necessária
<b>Esporotricose disseminada</b>	Anfotericina B Lipossomal (3-5 mg/kg/dia) e depois itraconazole (200 mg 2× ao dia)	Anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg/dia) até recuperação e depois Itraconazol (200 mg 2× por dia)	Preferencialmente, adiar tratamentos para casos não complicados
<b>Esporotricose em gestantes</b>	Tratar apenas esporotricose severa com anfotericina B lipossomal (3-5 mg/kg/dia) ou anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg/dia). Tratamento com hipertermia local (aproximadamente 45°C) para esporotricose cutânea não complicada		
<b>Esporotricose em crianças</b>	Itraconazol (6-10 mg/kg/dia).Anfotericina B desoxicolato (0.7-1 mg/kg/dia) em caso de doença severa.	Iodeto de potássio em doses crescentes equivalente a metade da dose do adulto com uma duração igual à de um adulto	

No caso dos felinos o itraconazol é o tratamento de eleição, sendo que deve ser continuado 1 mês após a cura clínica. Contudo sendo um composto hepatotóxico de ve ser realizada uma monitorização adequado do animal (Lloret et al., 2013). Outras terapêuticas podem ser administradas, contudo as taxas de eficácia na resolução da infecção são mais baixas, para além do potencial efeito hepatotóxico associado para este animal (Tabela 2).

**Tabela 2-** Recomendações das opções terapêuticas no tratamento da esporotricose felina (adaptado de Lloret et al., 2013)

<b>Medicamento</b>	<b>Dose e frequência</b>	<b>Comentários</b>
Itraconazol	10 mg/kg, 1x por dia, posologia oral.	Continuado por 2-3 meses ou 1 mês após a cura clínica
Iodeto de Potássio	Solução Supersaturada 2.5-20 mg/kg 1x por dia, posologia oral	Efeitos clínicos adversos, hepatotoxicidade pode ocorrer em alguns animais. Alternativa na presença de efeitos adversos ou ineficácia do itraconazol.
Terbinafina	30 mg/gato 1x por dia, posologia oral.	Pode ser utilizado em combinação com itraconazol. Considerar em caso de efeitos adversos ou ineficácia do intrazonazol.
Fluconazol	50 mg/gato, 1 x por dia, posologia oral	Considerar no caso de infecção disseminada. Pode ser utilizado concomitantemente com itraconazol.

### 1.10 Identificação molecular de espécies de *Sporothrix*

Porque a correta identificação das espécies através das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas depende da presença de determinado número de células no

material histopatológico, ou do crescimento do agente em meio de cultura laboratorial, nem sempre os resultados são conclusivos. O desenvolvimento de métodos moleculares para a identificação de isolados fúngicos torna-se deste modo indispensável. No caso do complexo *Sporothrix schenckii*., uma vez que só muito recentemente se compreendeu a diversidade genética que caracteriza este complexo, são escassos os trabalhos baseados em métodos de detecção e identificação moleculares para o diagnóstico da esporotricose.

Entre as primeiras metodologias moleculares aplicadas à identificação dos isolados de *Sporothrix schenckii*, foi utilizado como alvo o gene da quitina sintetase 1 (Kano et al., 2001). Posteriormente, foi desenvolvido um PCR *nested* para identificar *S. schenckii*, também a partir de amostras clínicas, utilizando o gene 18S rRNA (ácido ribonucleico ribossomal) como alvo, com elevada especificidade e sensibilidade (Hu et al., 2003). Contudo, este método não permitia a identificação dos isolados ao nível da espécie, mas sim do complexo (Oliveira et al., 2014a). Utilizando a técnica de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism* PCR), tendo como alvo o gene da calmodulina e utilizando a enzima de digestão HhaI, os vários padrões electroforéticos originados permitem a identificação de algumas das espécies como *S. brasiliensis*, *S. schenckii* sensu stricto, *S. globosa* e *S. luriei* (Rodrigues et al., 2014a). Contudo, esta técnica não consegue diferenciar entre as espécies *S. mexicana* e *S. pallida*, dado que os padrões electroforéticos obtidos são semelhantes. Muitas outras técnicas e variadíssimos alvos moleculares foram utilizados ao longo do tempo, contudo são escassas aquelas que conseguem identificar com precisão os isolados ao nível da espécie (Tabela 3).

Analisando loci como a calmodulina,  $\beta$ -tubulina ou a quitina sintetase, é possível identificar corretamente as espécies do complexo *S. schenckii* (Marimon et al., 2007). Outra metodologia, envolvendo a tipificação por PCR utilizando o *primer* universal T3B, permite a identificação ao nível da espécie dos isolados, tornando-se esta metodologia uma forte candidata ao método ideal para a identificação de rotina nos hospitais e laboratórios com carências de estruturas, tecnologia e humanas, uma vez que é rápida, simples de operar e barata (Oliveira et al., 2012). De acordo com alguns autores, todas as espécies do complexo *S. schenckii* clinicamente relevantes podem também ser identificadas através da análise das sequências da região ITS. Zhou e colaboradores, concluem no seu trabalho que através do estudo de polimorfismos presentes na região ITS, seria possível discriminar as quatro espécies do complexo: *S.*

*schenkii* sensu stricto, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* (Zhou et al., 2014). Contudo, são escassos os trabalhos na literatura que relatam a utilização desta região para fins de identificação neste grupo de espécies. Uma análise paralela utilizando como alvo a região ITS e o gene da  $\beta$ -tubulina, demonstrou que 64 isolados clínicos anteriormente classificados como *S. schenkii* seriam, na realidade, *S. globosa* (Liu et al., 2014). No entanto, Estrada-Bárceñas e colaboradores concluíram que a análise da região ITS, embora permita distinguir espécies de *Sporothrix* de diferentes regiões geográficas, o marcador não consegue distinguir entre as diferentes espécies dentro do complexo (Estrada-Bárceñas et al., 2014).

**Tabela 3-** Métodos moleculares e respectivos genes alvo usados em vários estudos visando identificar membros do complexo *Sporothrix schenkii* (adaptado de Oliveira et al., 2014a)

Método	Gene Alvo	Diferenciação ao nível da espécie	Referência
RFLP	mt DNA(ácido desoxirribonucleico mitocondrial)	Não	Arenas et al., 2007 Ishizaki et al., 2004 Kawazaki et al., 2012 (em Oliveira et al., 2014a) Lin et al., 1999 (em Oliveira et al., 2014a) Mora-Cabrera et al., 2001 Suzuki et al., 1988 Takeda et al., 1991
Sequenciação PCR	28S rDNA	Não	Sandhu et al., 1995
PCR	Quitina sintetase	Não	Kano et al., 2003 Liu et al., 2013
RAPD	Sequências 10mer	Não	Mesa-Arango et al., 2002
Sequenciação PCR	ITS	Não	Beer et al., 2003
Nested PCR	18SrRNA	Não	Hu et al., 2003
PCR	Topoisomerase II	Não	Kanbe et al., 2005
RFLP	ITS, 5.8S rDNA	Não	Watanabe et al., 2004

**Tabela 3-** (cont.)

<b>Método</b>	<b>Gene Alvo</b>	<b>Diferenciação ao nível da espécie</b>	<b>Referência</b>
AFLP ( <i>amplified fragment length polymorphism</i> )	ITS	Não	Neyra et al., 2005
RFLP	ITS, 18S	Não	Zhang et al., 2006
Sequenciação PCR	CAL(calmodulina); $\beta$ -tubulina; quitina sintetase	Não	Marimon et al., 2006
Sequenciação PCR	CAL, $\beta$ -tubulina, quitina sintetase	Sim	Marimon et al., 2007
PCR fingerprinting e sequenciação PCR	M13, ITS	Não	Gutierrez-Galhardo et al., 2008 (em Oliveira et al., 2014a)
Sequenciação PCR	ITS, LSU (large subunit), $\beta$ -tubulina	Sim	De Meyer et al., 2008
Sequenciação PCR	CAL	Sim	Madrid et al., 2009 Oliveira et al., 2012 Romeo et al., 2011
PCR fingerprinting	M13	Não	Reis et al., 2009
Nested PCR	18SrRNA	Não	Mendonza et al., 2012 (em Oliveira et al., 2014a)  Xu et al, 2010 (em Oliveira et al., 2014a)
Sequenciação PCR	ITS, $\beta$ -tubulina, CHS	Sim	Zhang et al., 2011
PCR fingerprinting	T3B	Sim	Oliveira et al., 2012

Há uma necessidade crescente de desenvolvimento de novas metodologias que sejam precisas, sensíveis e específicas no que diz respeito à identificação de *Sporothrix schenckii*, não só para fins de diagnóstico como também para a compreensão da variabilidade intraespecífica, epidemiologia e da posição filogenética que este complexo ocupa no contexto dos organismos fúngicos (Almeida-Paes et al., 2015). Uma vez que já se conhece a sequência completa do genoma de *Sporothrix schenckii* (ATCC 58251), com um tamanho de aproximadamente 32.23 Mb, já seriam esperados maiores avanços na compreensão deste complexo grupo de fungos (Cuomo et al., 2014).

### 1.11 Objetivos do Trabalho

Os fungos, como agentes causadores de infecção no homem, continuam a pertencer a um Reino amplamente menosprezado no âmbito da Microbiologia Médica. Contudo, a emergência de infecções micóticas, em determinadas regiões do planeta onde anteriormente eram desconhecidas, fruto das alterações climáticas, fluxos migratórios de pessoas, alteração dos padrões de doença e da própria demografia, tornam estes agentes um problema de saúde pública crescente. Em parte, a grande maioria das infecções fúngicas atuais, associadas a grandes taxas de mortalidade e morbidade, são um fenómeno recente. O aparecimento de uma população no séc. XX, com um sistema imunitário vulnerável, incapacitado para proteger o hospedeiro contra agentes infecciosos, é o resultado da utilização massiva de fármacos imunossupressores, o aparecimento de doenças como o VIH (vírus da imunodeficiência adquirida), o aumento de transplantados, doenças autoimunes e o envelhecimento da população, as quais vieram contribuir para um aumento acentuado na prevalência de casos.

A esporotricose, embora seja uma micose com uma carga de morbidade importante e responsável por diversos surtos recentes em diversas partes do globo, é ainda relativamente pouco estudada. Só muito recentemente se elucidou quais as espécies fúngicas causadoras da infecção, existindo ainda muitas questões em aberto acerca da sua ecologia, gama de hospedeiros e perfis de resistência às terapias antifúngicas. Recentemente têm sido desenvolvidos alguns métodos para a deteção de *S. schenckii* diretamente a partir de amostras clínicas, contudo o mesmo não acontece para as amostras ambientais, reservatórios dos agentes fúngicos. Por outro lado, a maioria dos métodos desenvolvidos não permite a diferenciação entre as espécies do complexo *S. schenckii*. Na grande maioria dos trabalhos, os genes mais frequentemente utilizados para a deteção e identificação das espécies do complexo são também de cópia única, como os genes que codificam para a calmodulina, a beta-tubulina ou a quitina sintetase. Neste contexto, um método que permita a deteção destas espécies no ambiente poderia beneficiar da utilização da região ITS como alvo molecular, dada a sua natureza multicópia no genoma, sendo que em *Sporothrix* parecem existir mais de 20 cópias dos genes codificantes do rRNA (Cuomo et al., 2014). Isto sugere uma maior probabilidade de detetar DNA ambiental, mesmo quando este apresenta um elevado estado de degradação ou se apresente em pequenas quantidades. A descrição recente de um caso

clínico autóctone de esporotricose humana, em 2014, reforça também a necessidade em elucidar a possível existência, e a distribuição geográfica, das várias espécies que compreendem o complexo *Sporothrix schenckii* em Portugal.

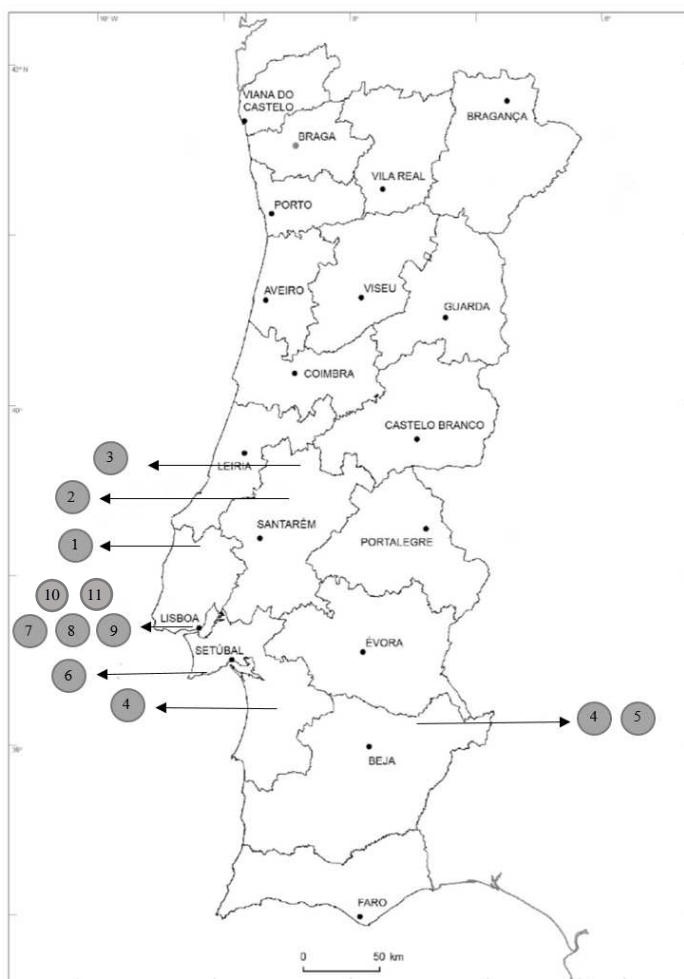
No contexto anterior, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- Desenvolver e validar um método molecular para detetar e identificar espécies patogénicas do complexo *Sporothrix schenckii* diretamente de amostras ambientais, utilizando a região ITS como alvo molecular;
- Estudar a ocorrência destes agentes no ambiente, comparando o método desenvolvido com os métodos tradicionais baseados na cultura deste microrganismo;

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Seleção dos locais de amostragem

Para a realização deste trabalho, os locais de amostragem nas várias zonas do país foram seleccionados com base nos seguintes critérios: 1) são regiões onde foi previamente detetado DNA, ou de onde foram obtidos isolados ambientais de *Sporothrix* sp. (do Vale, 2012); e 2) são regiões que apresentam, aparentemente, as condições ideais à presença deste fungo no ambiente (de acordo com as características ambientais citadas na Introdução, na secção sobre a Ecologia). Na Figura 9 são identificados os vários locais seleccionados para a recolha de amostras no país e, na Figura 10, dois exemplos do tipo de ecossistema onde foram realizadas as recolhas.



**Figura 9-** Localização geográfica dos locais de amostragem seleccionados para este trabalho. A informação relativa a cada número do local de amostragem encontra-se na Tabela 4.





**Figura 10-** Exemplos de locais onde foram realizadas as amostragens ambientais neste trabalho. À esquerda, local de alimentação de uma das colónias de gatos de rua em Idanha. À direita, colónia de morcegos (*Myotis myotis*) na Gruta do Almonda, Torres Novas (foto gentilmente cedida por Sérgio Barbosa).

Inicialmente, os locais escolhidos para as amostragens neste estudo basearam-se num estudo anterior, realizado na Universidade do Minho, onde foi possível a identificação e o isolamento de *Sporothrix schenckii* e de outras espécies de *Sporothrix* em amostras de guano de morcego (do Vale, 2012). As amostras recolhidas nestes locais foram essencialmente amostras de solo, de material vegetal em decomposição e de guano de morcego (Tabela 4). No decorrer do trabalho, a amostragem foi posteriormente concentrada na região de Lisboa, onde foi reportado o aparecimento de casos suspeitos de esporotricose em felinos pertencentes a colónias de rua (ver Anexo I). A identificação dos presumíveis casos, captura dos animais e recolha do material biológico foi possível através do contacto com voluntários da organização sem-fins-lucrativos e de apoio a animais abandonados, a “Animais de Rua”. Foram então realizadas amostragens em algumas colónias nas zonas de Colaride, Idanha, Mira-Sintra e Queluz. Os animais foram capturados pelas voluntárias e enviados para várias clínicas veterinárias da região de Lisboa, que colaboraram com este estudo, para a realização de colheita de material biológico nas devidas condições sanitárias e tendo em conta o bem-estar do animal.

**Tabela 4-** Listagem dos locais de amostragem (ambientais e clínicas), datas em que esses locais foram visitados, e número de amostras colhidas em cada local.

Número	Localização	Nº de Amostras	Dia da colheita
1	Cadaval	30	21/04/2017
2	Além-da-Ribeira	11	29/04/2017
2	Almonda	17	09/05/2017
3	Mina da Preguiça	5	19/05/2017
4	Alqueva	3	19/05/2017
5	Grândola	1	10/05/2017
6	Sesimbra	1	16/05/2017
7	Colaride	5	25/05/2017
8	Idanha	9	2/06/2017
9	Mira-Sintra	13	28/06/2017
10	Belém	5	25/04/2017
11	Queluz	2	8/06/2017

## 2.2 Tratamento das amostras

As amostras de solo, de material vegetal em decomposição e de guano de morcego foram recolhidas para tubos Falcon estéreis de 15 mL, devidamente numerados, e mantidas refrigeradas até processamento no laboratório. No laboratório, cerca de 1 gr de cada amostra foi transferida para um novo tubo Falcon, à qual foi adicionada 5 mL de tampão fosfato salino (PBS, Sigma: 0,01 M tampão fosfato, 0,0027M cloreto de potássio e 0,137 M de cloreto de sódio, pH= 7.4 a 25°C). A suspensão foi agitada no vórtex durante 3 min, sendo deixada em seguida repousar cerca de 20 min. Posteriormente, foram extraídos 100 µL do sobrenadante resultante, que foram depois

inoculados em meio de cultura PDA com cicloheximida (0,5 mg/mL) e cloranfenicol (0,5 mg/mL). As placas inoculadas foram incubadas a 25 °C. O sobrenadante restante foi transferido para microtubos de 2 mL. Os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos, a 6000 rpm (rotações por minuto), a - 4°C, e o sedimento obtido foi armazenado a - 20 °C para posterior análise.

Para as amostras de espinhos de várias espécies de plantas, ou de material vegetal cortante, foi simulada uma “picada” utilizando placas de Petri com meio PDA com cicloheximida (0,5 mg/mL) e cloranfenicol (0,5 mg/mL). As placas foram depois incubadas a 25 °C.

Em relação às amostras recolhidas a partir de felinos, nos locais onde estes se encontravam, foram simuladas arranhadelas, em que as garras dos animais foram pressionadas contra meio de cultura PDA (com cicloheximida e cloranfenicol) em placas de Petri, e recolhidas amostras das mucosas oral e nasal com zaragatoas estéreis com carvão ativo. As zaragatoas foram depois usadas para inocular meio de cultura PDA com cicloheximida e cloranfenicol, em duplicado, incubadas depois a 25 °C e a 36 °C. Quando o animal apresentava cicatrização de lesões, foram também recolhidas amostras das crostas dessas lesões. Após alguns dias de incubação, as colónias sugestivas de *Sporothrix* sp foram repicadas em Agar de Sabouraud e PDA com cloranfenicol (0,5 mg/mL), e incubadas a 25 °C. As placas foram incubadas por um período de cerca de 21 dias.

### **2.3 Identificação dos isolados de fungos**

As culturas de fungos foram analisadas através de métodos convencionais e moleculares de diagnóstico (desenvolvidos neste trabalho) em paralelo. A morfologia das colónias dos isolados ambientais foi rigorosamente documentada (p.e. cor, textura, relevo e margem das colónias). Para a observação das estruturas reprodutoras, foram preparadas lâminas a fresco a partir das culturas, coradas com azul de lactofenol. A porção de colónia filamentosa foi homogeneizada na gota do corante, colocada uma lamela e em seguida procedeu-se à observação da preparação ao microscópio ótico.

## 2.4 Identificação molecular

Foram desenvolvidas neste trabalho abordagens moleculares baseadas em PCR para a identificação das espécies patogénicas de *Sporothrix*, possibilitando também a sua deteção e diferenciação rápidas diretamente a partir das amostras ambientais e clínicas. Durante a otimização destas técnicas foram utilizadas estirpes de referência bem caracterizadas de várias espécies de *Sporothrix* e de outras espécies usadas como controlos de especificidade das reações (Tabela 5). A maioria das estirpes foi obtida a partir da micoteca da Universidade do Minho.

**Tabela 5-** Estirpes representativas das principais espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, e de outras espécies de *Sporothrix*, usadas neste trabalho.

Espécie	Estirpe <sup>1</sup>	Origem Geográfica	Outras coleções <sup>2</sup>
<i>S. schenckii</i>	MUM 17.25	E.U.A.	UdeA4023
<i>S. globosa</i>	MUM 17.06	Zaragoza, Espanha	IHEM 22010
<i>S. brasiliensis</i>	MUM 17.05	Rio de Janeiro, Brasil	IHEM22009, FMR8309, CBS120339, IMI394469
<i>S. mexicana</i>	MUM17.07	Puebla, México	IHEM22011
<i>S. ghanensis</i>	MUM17.03	–	IHEM5623 CBS755.73 MUCL19332
<i>S. fungorum</i>	MUM17.02	Arberseeward, Bayerischer Ward, Alemanha	CBS259.70, MUCL19331, IHEM5620

**Tabela 5-** (cont.)

<b>Espécie</b>	<b>Estirpe<sup>1</sup></b>	<b>Origem Geográfica</b>	<b>Outras coleções<sup>2</sup></b>
<i>S. pallida</i>	MUM17.04	Cambridge, Reino Unido	IHEM5626, MUCL 19327, CBS302,73, CECT2799, IMI80677
<i>S. inflata</i>	MUM17.01	Louvain-la-Neuve, Bélgica	IHEM2014

<sup>1</sup>MUM – Micoteca da Universidade do Minho. <sup>2</sup> UdeA- Universidad de Antioquia; IHEM- Institute of Hygiene and Epidemiology; FMR- Facultat de Medicina i Ciències de la Salu, Reus, Spaint; CBS- Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; IMI- Insituto de Medicina Integrada, São Paulo, Brasil; MUCL- Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain, Belgium; CECT- Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, València, España.

As estirpes utilizadas como controlo negativo neste trabalho, *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum* e *Cladosporium* sp., foram obtidas a partir da coleção de fungos filamentosos do laboratório de Micologia Médica, do departamento de Microbiologia Médica no IHMT.

#### **2.4.1 Extração de DNA de culturas e amostras ambientais pelo método do azoto líquido**

O DNA das culturas, guano de morcego e de solo, foi extraído de acordo com o método do azoto líquido, que consiste no congelamento das células através da imersão em azoto líquido e posterior disrupção mecânica da parede celular. Cerca de 500 µL de biomassa foram adicionados a um microtudo de 2 mL, com o auxílio de um fio reto esterilizado. Seguidamente, o microtubo foi submerso em azoto líquido e a biomassa foi depois macerada com o auxílio de um bastão de plástico descartável, até adquirir uma consistência pastosa. Após maceração, foi adicionado 200 µL de tampão TES (0,05 M EDTA, 20% sucrose, 1 M Tris base, pH = 8), sendo a mistura depois macerada. Este procedimento foi repetido duas vezes, com a adição de mais 200 µL de TES seguido de

maceração. Seguidamente, a mistura foi aquecida a 95 – 100 °C durante 5 minutos num termobloco. Posteriormente, a mistura foi agitada no vórtex e, após arrefecimento à temperatura ambiente, os tubos foram sujeitos a centrifugação a 3000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente uma nova centrifugação a 13000 rpm, a 4° durante 3 minutos foi realizada. Adicionou-se em seguida 600 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), e a mistura foi novamente agitada no vórtex e centrifugada a 14000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o DNA foi cuidadosamente removida e transferida para um novo microtubo de 1,5 µL. Este processo foi repetido duas vezes. Seguidamente adicionou-se 1/10 do volume total de acetato de sódio 3M e 2,5 vezes de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada, invertendo os tubos cerca de 50 a 60 vezes e novamente sujeita a centrifugação a 14000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi lavado em 500 µL de etanol a 70%, seguido de uma última centrifugação a 14000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. O passo de lavagem anterior foi repetido, e o sedimento deixado secar à temperatura ambiente durante cerca de 12 horas. O sedimento foi resuspenso em 50 µL de ddH<sub>2</sub>O e aquecido a 65 °C durante 45 minutos por forma a solubilizar totalmente. Aos extratos de DNA obtidos das amostras ambientais, foi adicionado ddH<sub>2</sub>O na diluição de 1:100 por forma a diluir inibidores e ácidos húmicos que possam interferir na reação de amplificação. Finalmente, o DNA foi quantificado no NanoDrop e armazenado a - 20°C.

#### **2.4.2 Lise e extração de DNA a partir de amostras clínicas**

O DNA das amostras clínicas (crostas de lesões cicatrizadas de gatos), foi extraído utilizando o sistema QuickGene DNA tissue kit S (Kurabo). Numa primeira fase o tecido foi sujeito a lise, onde foi pesado num tubo de 2 mL, cerca de 5 mg do material biológico. Adicionou-se 180 µL de tampão MDT (*tissue lysis buffer*) e, subsequentemente, 20 µL de tampão EDT (proteínase K), e colocado a incubar a 55°C num misturador rotativo durante a noite, por forma a lisar o tecido completamente. Seguidamente a amostra foi sujeita a centrifugação, a 10000 rpm e à temperatura ambiente, durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1.5 mL e adicionou-se 20 µL de RNase A, e sujeito posteriormente a agitação no vórtex

durante 5 segundos. Em seguida, sujeitou-se o tubo a uma incubação à temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 180 µL de tampão LDT (*lysis buffer*) à amostra, que foi agitada no vórtex à velocidade máxima durante 15 segundos. A amostra foi em seguida incubada a 70°C durante 10 min e adicionou-se posteriormente 240 µL de etanol a 99% e sujeitou-se a amostra a mais uma agitação vigorosa no vórtex à velocidade máxima durante 15 segundos. Os lisados resultantes foram sujeitos a um processo de extração através da tecnologia de filtração por pressurização, segundo as instruções do fabricante (QG-Mini80, Kurabo). Finalmente, o DNA foi quantificado no NanoDrop e armazenado a - 20°C.

### **2.4.3 Purificação dos extratos de DNA das amostras de guano de morcego**

Aquando da extração de DNA das amostras de guano de morcego, tornou-se claro que a reação de PCR estaria de alguma forma a ser inibida pela presença de inibidores nos extratos. Deste modo, os extratos de DNA destas amostras foram adicionalmente purificados utilizando o sistema QG-Mini80 (Kurabo), de acordo com as instruções do fabricante. Este processo de purificação baseia-se na utilização de uma membrana porosa numa coluna, a qual imobiliza os ácidos nucleicos após sucessivas lavagens dos extratos, eliminando grande parte dos contaminantes. Este método utiliza uma tecnologia de filtração por pressurização, a qual garante a obtenção de DNA purificado adequado para reações de PCR.

### **2.4.4 Primers utilizados na reação PCR**

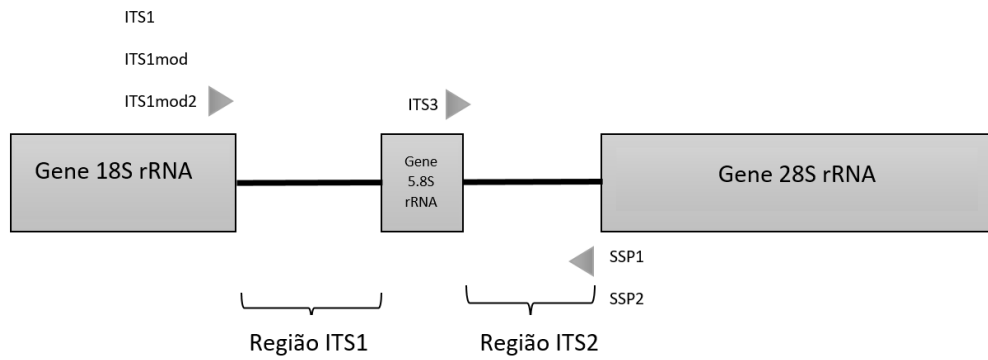
A região espaçadora intergénica (ITS) (Figura 11) foi selecionada como alvo molecular neste trabalho, para a deteção e identificação das espécies patogénicas de *Sporothrix*. Foram desenvolvidos *primers* específicos para os membros do complexo *S. schenckii* e desenhadas versões melhoradas de *primers* previamente descritos, e implementados sistemas de PCR que possibilitam a amplificação de DNA destes agentes a partir de diferentes tipos de amostras. Os *primers* utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6-** Sequências oligonucleotídicas dos *primers* utilizados neste trabalho.

Primers	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Referência
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990
ITS1mod1	TCCGTTGGTGAACCAGCGG	Este trabalho
ITS1mod2	TCCGTTGGTGAACCTGCGG	Este trabalho
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al., 1990
SSP1	CGTCATGCGCGTTTTAC	Este trabalho
SSP2	CGTCATGCGCGTTTTGAC	Este trabalho

Várias centenas de sequências da região ITS de estirpes de referência do complexo *Sporothrix schenckii*, depositadas no Genbank, foram alinhadas através do software Clustal Omega. Após esta análise, foram obtidas 13 sequências distintas, representantes de toda a variabilidade genética da região ITS neste complexo (ver Anexo II). Estas sequências foram analisadas por forma a identificar regiões que permitissem o desenho de primers específicos para o complexo *S. schenckii*. Foram também pesquisados polimorfismos na região ITS que permitissem a diferenciação entre os membros do complexo (Tabela 7). A especificidade dos *primers* desenhados neste trabalho foi confirmada *in silico* através de uma pesquisa BLAST no GenBank. Não foram encontradas homologias significativas com outras espécies fora do género *Sporothrix*. Os primers desenhados foram posteriormente avaliados através de ensaios de PCR convencional para aferir a sua sensibilidade e especificidade.





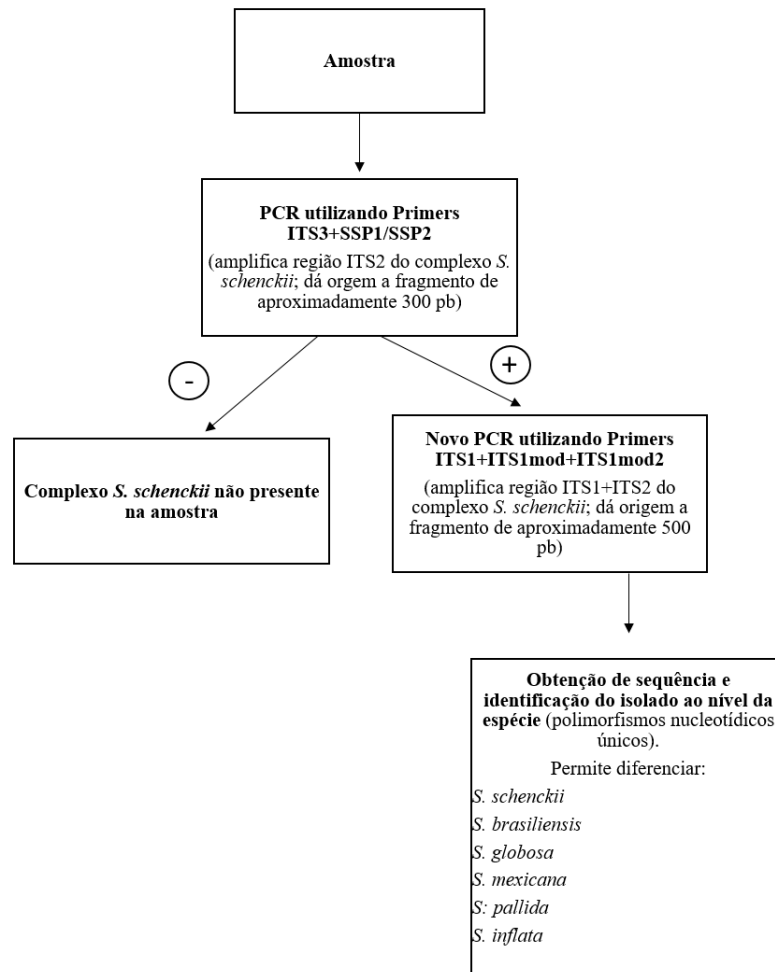
**Figura 11-** Esquema mostrando a localização da região ITS, que compreende as regiões ITS1, 5.8S rDNA e ITS2, entre os genes codificantes do 18S e 28S rRNA. São também mostradas as regiões alvo dos *primers* desenhados neste trabalho.

**Tabela 7-** Polimorfismos nucleotídicos presentes na região ITS, que permitem a diferenciação entre os membros do complexo *Sporothrix schenckii*. Os números assinalados na tabela correspondem a posições no alinhamento da região ITS, ilustrado no Anexo II.

Polimorfismos nucleotídicos únicos																			
Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>S. schenckii</i>	A	T	G	C	A	C	G	G	T	A	C	A	T	G	T	T	T	G	C
<i>S. globosa</i>	A	T	G	C	A	C	G	A	T	A	C	A	A	C	G	T	T	G	T
<i>S. brasiliensis</i>	G	T	G	C	G	C	G	G	T	A	C	A	T	G	T	T	T	G	C
<i>S. pallida</i>	A	C	A	A	A	T	T	A	G	T	T	G	A	G	T	C	G	A	C
<i>S. mexicana</i>	A	T	A	C	A	T	T	A	G	T	T	G	A	G	T	C	G	A	C
<b>ITS region</b>	ITS1			5.8S			ITS2												

#### **2.4.5 Detecção do complexo *S. schenckii* a partir de amostras ambientais e clínicas**

Numa primeira reação de PCR, usando como molde extratos de DNA das amostras ambientais e clínicas, é utilizada a mistura de *primers* ITS3 + SSP1/SSP2, que amplifica parte da região ITS2 e dá origem a um fragmento de aproximadamente 300 pares de bases (pb). Os *primers* SSP1/SSP2 são específicos para os membros do complexo *S. schenckii* e a maioria das espécies do complexo é depois diferenciada pela sequenciação do fragmento amplificado (usando os mesmos *primers* para as reações de sequenciação). Contudo, a sequência nucleotídica da região ITS2 amplificada não permite discriminar entre algumas das espécies do complexo. Deste modo, se for verificada tal ocorrência, é realizada uma segunda reação de PCR usando a mistura de *primers* ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2 + SSP1/SSP2. Esta reação permite a amplificação de um fragmento com aproximadamente 500 pb, que inclui a região ITS1 e cujos polimorfismos permitem diferenciar todos membros do complexo (Figura 12). Os *primers* usados neste trabalho foram adquiridos à empresa STABvida Lda. Os serviços de sequenciação dos fragmentos amplificados foram também adquiridos à mesma empresa.



**Figura 12** Algoritmo para a detecção do complexo *S. schenckii* a partir de amostras ambientais e clínicas com base em ensaios de PCR. A amostra é sujeita a um primeiro ensaio de PCR utilizando os primers ITS3+SSP1/SSP2. Caso não exista amplificação neste primeiro ensaio, a amostra será considerada negativa para a presença de membros do complexo. Se ocorrer amplificação com estes *primers*, o fragmento resultante, de aproximadamente 300 pb, permite a diferenciação de algumas espécies do complexo, contudo não permite diferenciar entre *S. schenckii* e *S. brasiliensis* ou *S. mexicana* e *S. pallida*. A amostra é sujeita a um segundo ensaio de PCR utilizando o par de primers ITS/ITS1mod/ITS1mod2 + SSP1/SSP2, o qual origina um fragmento de aproximadamente 500 pb, que inclui a região ITS1, permitindo desta forma a discriminação de todas as espécies do complexo.

#### 2.4.6 Identificação dos membros do complexo *S. schenckii* a partir de culturas

Para a identificação dos isolados do complexo *S. schenckii*, foi amplificada e sequenciada a região ITS usando os primers universais ITS1/ITS4 (Tabela 6) ou, alternativamente, na ausência de funcionamento destes, as misturas de *primers* mencionadas em cima.

A mistura reacional utilizada para a amplificação da região ITS do rDNA, como método discriminatório entre as diferentes espécies do complexo, encontra-se descrita na Tabela 8.

**Tabela 8-** Mistura reacional utilizada nas reações de PCR para a amplificação da região ITS das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*

Solução Stock	Concentração final	Volume por tubo (µL)
Água bidestilada Braun	-	8,8
Tampão 10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,5 µM	1,5
dNTP's 1,25 mM cada	250 µM cada	5
Mix Primers Forward	0,4 µM	1
Mix Primers Reverse	0,4 µM	1
Taq polymerase	1U/µL	0,2
DNA 1:750	1:750	5

O programa de PCR utilizado inicia com um pré-aquecimento a 95°C, o qual permite a desnaturação da dupla cadeia do DNA, durante 6 minutos. Seguem-se 35 ciclos, incluindo um período de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, a hibridação dos primers a 54°C durante 30 segundos, e uma extensão a 72°C durante 45 segundos. Finalmente, um último passo da extensão ocorreu a 72°C durante seis minutos. Todo o processo foi realizado num termociclador Biometra Tpersonal. Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram detetados por electroforese em gel de 1,5% de agarose, em tampão TBE, utilizando o corante fluorescente Green Safe para visualizar as bandas correspondentes ao DNA amplificado.

#### **2.4.7 Sensibilidade analítica dos ensaios de PCR**

A sensibilidade analítica das reações de PCR usando as misturas de primers ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2 + SSP1/SSP2 e ITS3 + SSP1/SSP2 foi avaliada por forma a garantir uma amplificação fidedigna mesmo na presença de reduzidas quantidades de DNA. Foram realizadas diluições seriadas 1:10 de extratos de DNA da estirpe de referência *S. schenckii* (MUM17.25), a começar com uma quantidade de DNA de 100 ng/μl até 1 fg/μl. Posteriormente foram também realizados os testes de sensibilidade analítica dos ensaios de PCR com extratos de amostras do ambiente contendo quantidades decrescentes de DNA de *Sporothrix*, adicionado artificialmente. As condições dos ensaios de PCR e da electroforese foram as mesmas descritas acima.

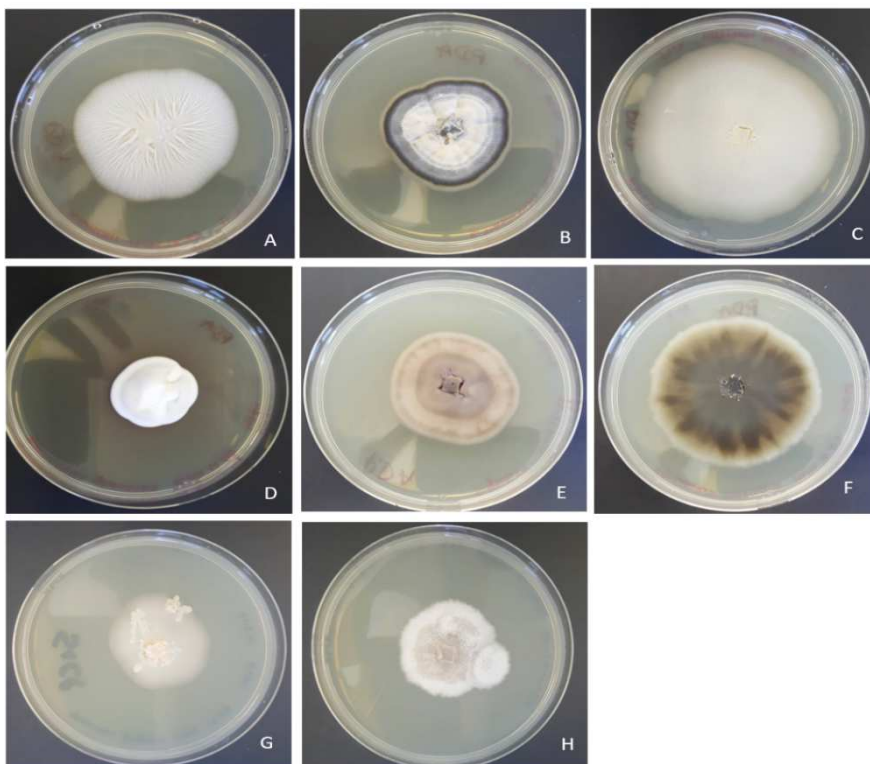
#### **2.4.8 Especificidade analítica dos ensaios de PCR**

Com o objetivo de testar a especificidade para cada par de *primers*, foram realizados ensaios de PCR usando como molde extratos de DNA de várias espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, provenientes da micoteca da Universidade do Minho, e de outros fungos fora do complexo: *Aspergillus flavus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Penicillium chrysogenum* (como controlo negativo). As condições dos ensaios de PCR e da electroforese foram as mesmas descritas acima.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Observação morfológica dos isolados

Um dos objetivos deste trabalho envolvia a pesquisa de isolados de *Sporothrix* a partir de amostras ambientais. De modo a melhor identificar as colônias destes organismos, que pudessem estar presentes nos meios de cultura inoculados com suspensões dessas amostras, foi realizado um estudo prévio com culturas de referência representantes das principais espécies de *Sporothrix*. As colônias foram crescidas em meio de Sabouraud e em PDA, a 27 °C e a sua morfologia foi registrada. Nestes meios de cultura, as colônias de *Sporothrix* apresentaram-se inicialmente com uma aparência filamentosa, de cor branca, e escureceram em poucos dias, tornando-se castanhas ou negras. As colônias de *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana* e *S. pallida* subcultivadas em meio BHI a 37 °C alteraram a sua morfologia para colônias leveduriformes de cor branca e textura cremosa. Contudo, *S. globosa* só conseguiu alterar a sua morfologia para a forma leveduriforme a 35 °C, sendo inibido o crescimento a 37 °C. Na Figura 13 é possível apreciar a morfologia de estirpes representantes de cada uma das espécies de *Sporothrix* analisadas neste trabalho.



**Figura 13-** Culturas de várias espécies de *Sporothrix* com 13 dias de incubação a 25°C: A) *Sporothrix schenckii* sensu stricto (MUM 17.25); B) *Sporothrix brasiliensis* (MUM 17.05); C) *Sporothrix pallida* (MUM 17.04); D) *Sporothrix ghanensis* (MUM 17.03); E) *Sporothrix globosa* (MUM 17.23); F) *Sporothrix mexicana* (MUM 17.07); G) *Sporothrix inflata* (MUM 17.01); H) *Sporothrix fungorum* (MUM 17.02).

A análise das culturas de referência permitiu inferir que a identificação das espécies do complexo *S. schenckii* com base em apenas características macromorfológicas é difícil. A análise das características micromorfológicas das culturas, através da observação em lâmina das estruturas miceliares e reprodutoras da fase filamentosa deste fungo, permite uma melhor diferenciação entre as espécies que compreendem o complexo.

### **3.2. Pesquisa de *Sporothrix* sp. em amostras ambientais e clínicas usando métodos baseados em cultura**

Foram analisadas 102 amostras no total: 95 amostras ambientais e 7 amostras clínicas de casos suspeitos de esporotricose em gatos (Tabela 4). Não foram isoladas culturas suspeitas de representarem espécies de *Sporothrix* a partir de nenhuma destas amostras.

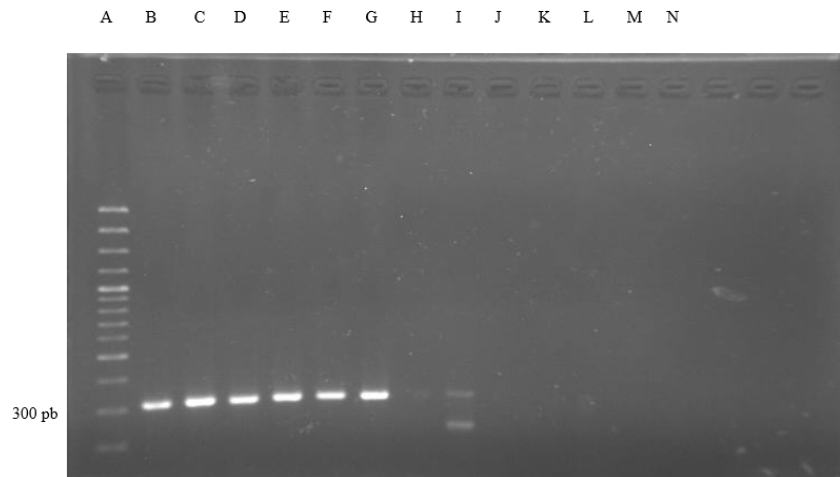
### 3.3 Design e avaliação da especificidade *in silico* dos primers

Em paralelo com a pesquisa de *Sporothrix* sp. usando métodos convencionais baseados em cultura, as amostras ambientais e clínicas foram também analisadas com os ensaios de PCR desenvolvidos neste trabalho. Previamente à realização destas análises, os ensaios de PCR foram devidamente otimizados. Foram assim redesenhados alguns *primers*, nomeadamente os primers SSP1 e SSP2, com alvos complementares na região ITS2 dos membros do complexo *S. schenckii*, e que permitem a amplificação específica de parte da região ITS destes organismos quando usados em conjunto com os primers universais para fungos ITS1 ou ITS3. O *primer* ITS1 foi também modificado de modo a torna-lo 100% complementar do respetivo alvo em várias espécies de *Sporothrix* (criando as versões ITS1mod1 e ITS1mod2). Foram assim otimizadas reações de PCR usando as misturas de *primers* ITS3 + SSP1/SSP2, originando um fragmento de aproximadamente 300 pb a partir de extratos de DNA de membros do complexo *S. schenckii*, e ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2 + SSP1/SSP2, originando um fragmento de aproximadamente 500 pb a partir dos mesmos extratos de DNA.

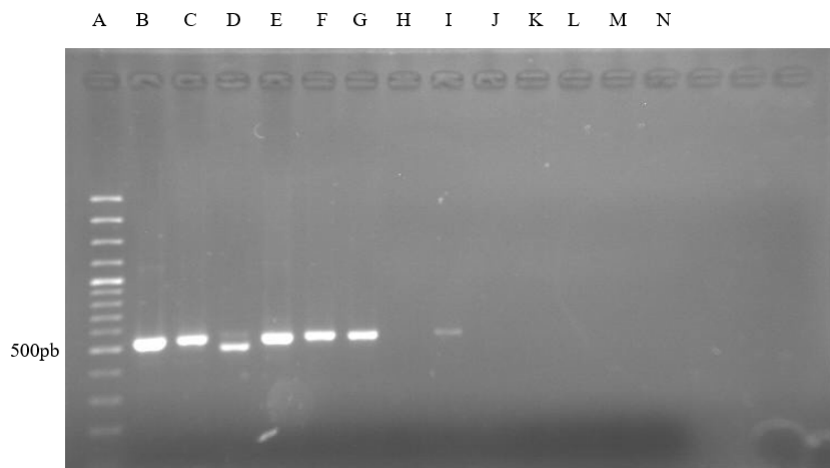
#### 3.3.1 Especificidade do ensaio de PCR

A especificidade dos ensaios de PCR foi avaliada usando como moldes extratos de DNA de várias espécies de *Sporothrix* (*S. schenckii* sensu strito, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. inflata*, *S. ghanensis*, e *S. fungorum*), e de outras espécies ubíquas no ambiente pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Penicilium*, *Cladosporium* e *Tricophyton*. Ambos os conjuntos de *primers* amplificaram as respetivas regiões alvo com sucesso a partir dos membros do complexo *S. schenckii* (Fig. 14 e Fig. 15). Estes *primers* amplificaram também fragmentos com a dimensão esperada a partir das espécies *S. inflata* e *S. fungorum*. Em ambos os ensaios de PCR, não foram detetados sinais de amplificação de DNA a partir de espécies de outros géneros de fungos.





**Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias espécies de *Sporothrix* e de outras espécies fúngicas habitualmente encontradas no ambiente, utilizando o conjunto de *primers* ITS3+SSP1/SSP2: A) Marcador de pesos molecular (GeneRuler 100 bp DNA ladder); B) *S. schenckii*; C) *S. brasiliensis*; D) *S. globosa*; E) *S. mexicana*; F) *S. pallida*; G) *S. inflata*; H) *S. ghanensis*; I) *S. fungorum*; J) *Aspergillus* sp.; K) *Penicillium* sp.; L) *Cladosporium* sp.; M) *Tricophyton* sp.; N) Controlo negativo.

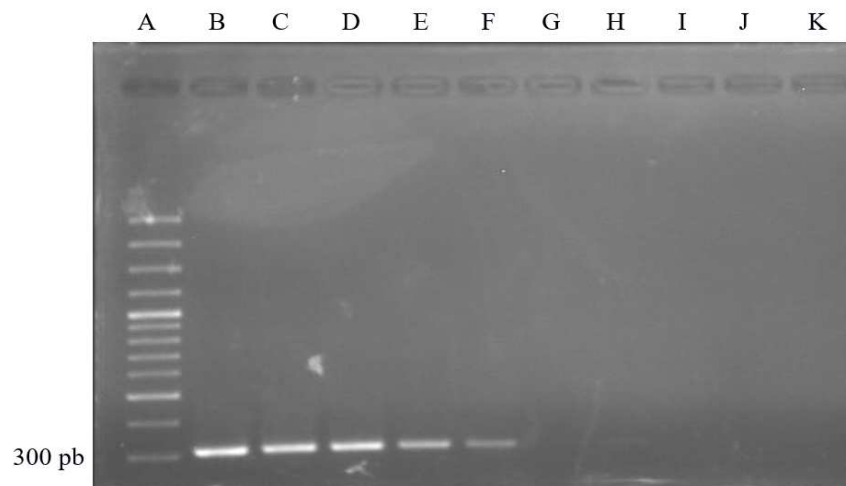


**Figura 15-** Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias espécies de *Sporothrix* e de outras espécies fúngicas habitualmente encontradas no ambiente, utilizando o conjunto de *primers* ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2: A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA ladder); B) *S. schenckii*; C) *S. brasiliensis*; D) *S. globosa*; E) *S. mexicana*; F) *S. pallida*; G) *S. inflata*; H) *S. ghanensis*; I) *S. fungorum*; J) *Aspergillus* sp.; K) *Penicillium* sp.; L) *Cladosporium* sp.; M) *Tricophyton* sp.; N) Controlo negativo.

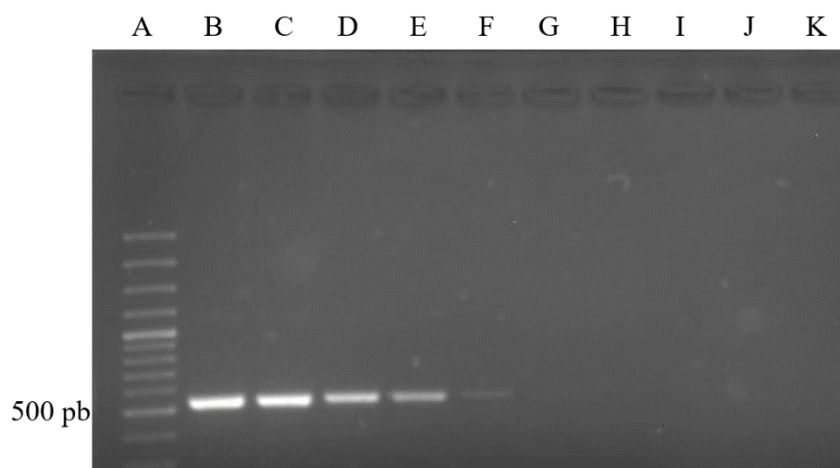
### 3.4 Sensibilidade do ensaio de PCR

A sensibilidade analítica dos ensaios de PCR, com ambas as misturas de *primers*, foi determinada usando como molde extratos de DNA de culturas de *Sporothrix schenckii* com diluições crescentes.

Através da leitura do transiluminador UV, o limite de detecção de DNA para o par ITS3+SSP1/SSP2, foi de 10 pg/ $\mu$ L (Fig. 16). Quanto ao par de primers ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2, o limite de detecção de DNA foi de 10 pg/ $\mu$ L (Fig. 17).



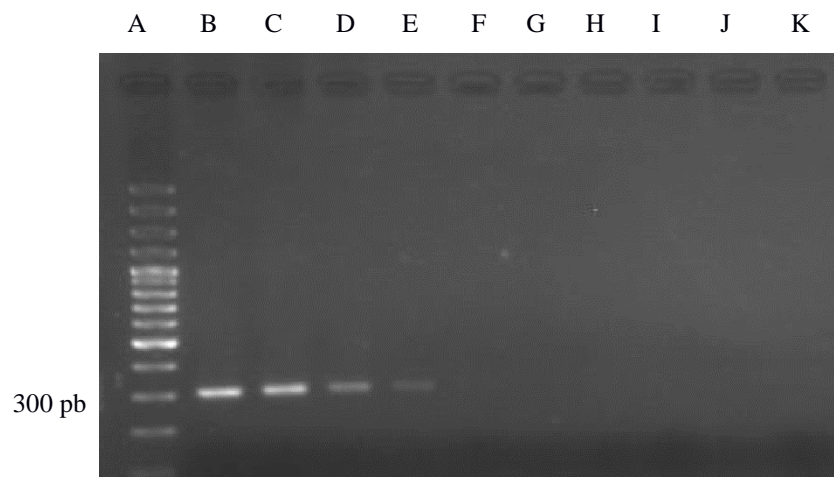
**Figura 16.** Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de *Sporothrix schenckii* para o teste de sensibilidade analítica com o par de *primers* ITS3+SSP1/SSP2. A) Marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 pb DNA ladder); B) DNA de *S. schenckii* 100 ng/ $\mu$ L; C) 10 ng/ $\mu$ L; D) 1 ng/ $\mu$ L; E) 0,1 ng/ $\mu$ L; F) 0,01 ng/ $\mu$ L; G) 1 pg/ $\mu$ L; H) 0,1 pg/ $\mu$ L; I) 10 fg/ $\mu$ L; J) 1 fg/ $\mu$ L; K) Controlo negativo.



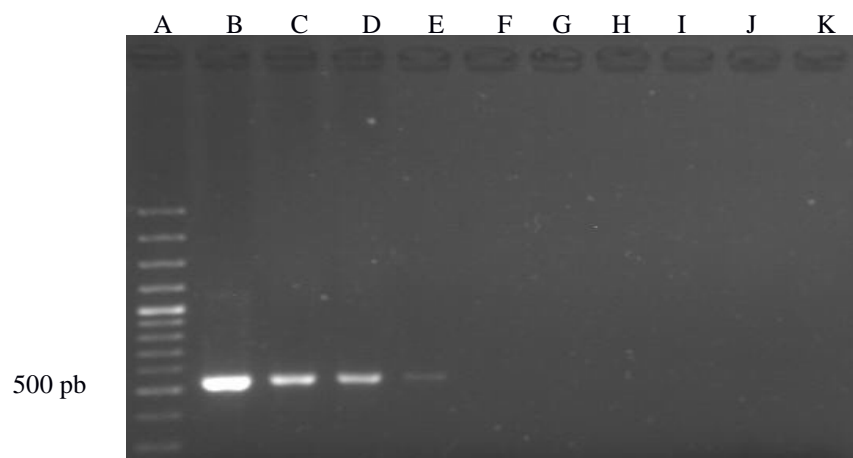
**Figura 17-** Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de *Sporothrix schenckii* para o teste de sensibilidade analítica com o par de *primers* ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2. A) Marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 pb DNA ladder); B) DNA de *S. schenckii* 100 ng/μL; C) 10 ng/μL; D) 1 ng/μL; E) 0,1 ng/μL; F) 0,01 ng/μL; G) 1 pg/μL; H) 0,1 pg/μL; I) 10 fg/μL; J) 1 fg/μL; K) Controlo negativo.

### 3.4.1 Análise da sensibilidade do ensaio de PCR com extratos de amostras artificialmente contaminadas com DNA de *Sporothrix*

A sensibilidade analítica dos ensaios de PCR com extratos de amostras ambientais, contendo quantidades decrescentes de DNA de *Sporothrix schenckii* adicionado artificialmente, foi testada para os dois conjuntos de *primers*. Na imagem do gel de electroforese resultante do ensaio, o limite de deteção de DNA para o conjunto ITS3+SSP1/SSP2 foi de 0,1 ng/μL (Fig. 18). Quanto ao conjunto de *primers* ITS1/ITS1mod/ITS1mod2+SSP1/SSP2, o limite de deteção de DNA no transiluminador UV foi de 0,1ng/μl (Fig. 19).



**Figura 18-** Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de *Sporothrix schenckii* adicionado artificialmente a extratos de amostras ambientais, para o teste de sensibilidade analítica com o conjunto de *primers* ITS3+SSP1/SSP2. A) Marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 pb DNA ladder); B) DNA de *S. schenckii* 100 ng/μL; C) 10 ng/μL; D) 1 ng/μL; E) 0,1 ng/μL; F) 0,01 ng/μL; G) 1 pg/μL; H) 0,1 pg/μL; I) 10 fg/μL; J) 1 fg/μL; K) Controlo negativo.

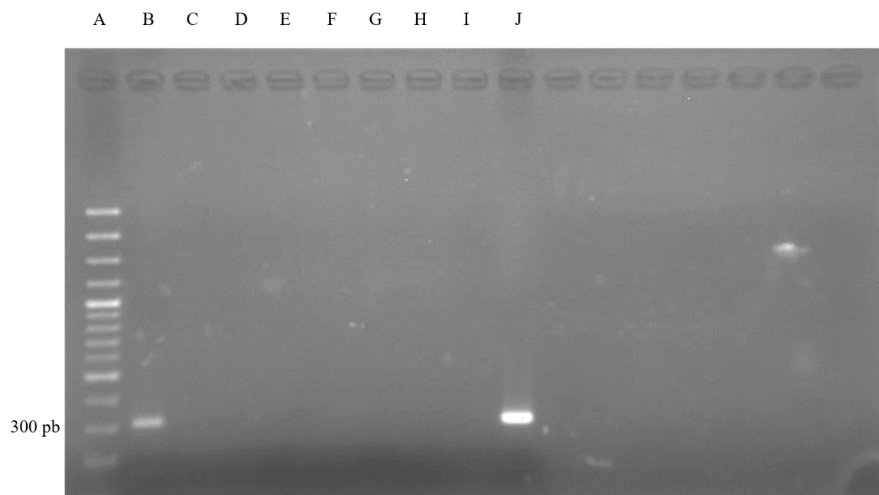


**Figura 19-** Electroforese em gel de agarose, resultante da amplificação de diluições seriadas (1:10) de DNA de *Sporothrix schenckii* adicionado artificialmente a extratos de amostras ambientais, para o teste de sensibilidade analítica com o par de *primers* ITS1/ITS1mod/IT1mod2+SSP1/SSP2. A) Marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 pb DNA ladder); B) DNA de *S. schenckii* 100 ng/μL; C) 10 ng/μL; D) 1 ng/μL; E) 0,1 ng/μL; F) 0,01 ng/μL; G) 1 pg/μL; H) 0,1 pg/μL; I) 10 fg/μL; J) 1 fg/μL; K) Controlo negativo.

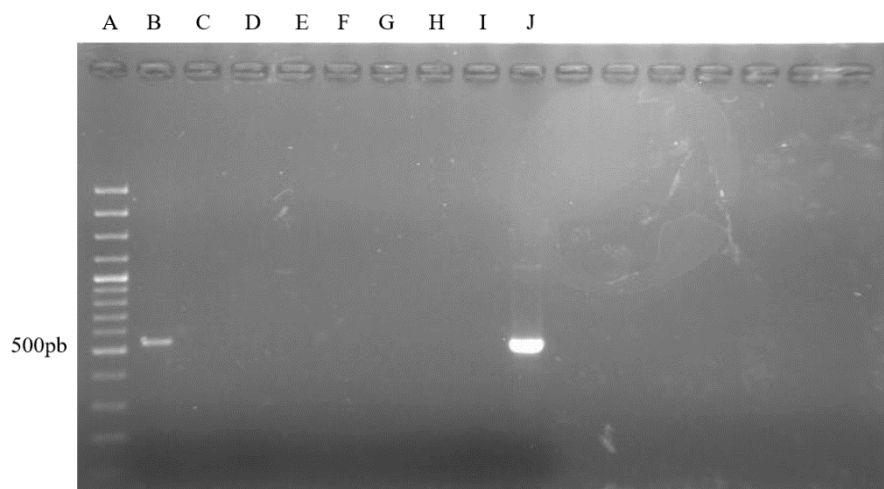
No que respeita aos extratos de amostras de guano artificialmente contaminadas com DNA de *Sporothrix schenckii*, surgiram dificuldades no que respeita à amplificação do DNA. A presença de inibidores e ácidos húmicos dificultam a amplificação. Posteriormente, as amostras de guano foram purificadas utilizando o sistema QG-Mini80 (Kurabo), onde o limite de deteção foi reduzido e variável de acordo com a amostra utilizada.

### **3.5 Resultados da análise das amostras ambientais e clínicas com os ensaios de PCR**

Todas as amostras ambientais e de guano de morcego originaram resultados negativos com o ensaio de PCR usando a mistura de *primers* ITS3 + SSP1/SSP2. Com respeito às amostras clínicas, uma das amostras (I02061) originou um resultado positivo, com a amplificação de um fragmento de DNA com cerca de 300 pb (Figura 20). A mesma amostra foi novamente testada com o segundo ensaio de PCR, usando os *primers* ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2 + SSP1/SSP2, originando um fragmento com o tamanho esperado de cerca de 500 pb (Figura 21).

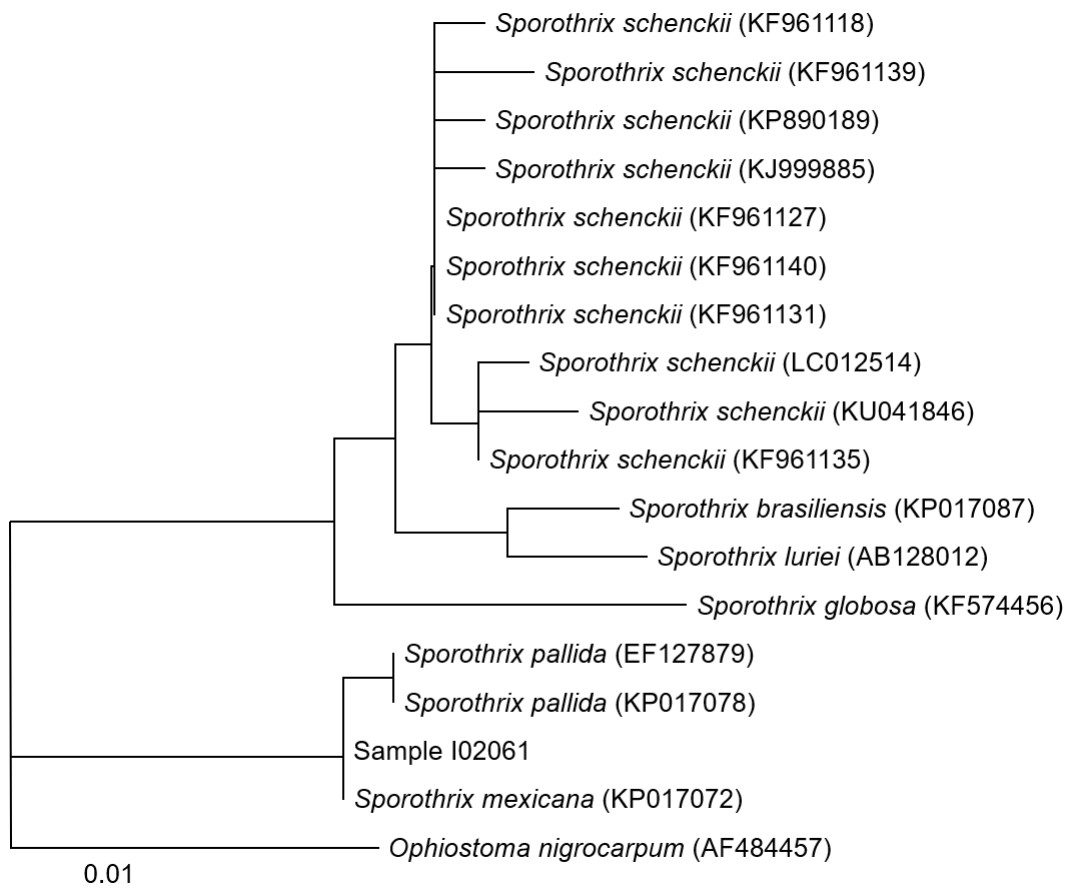


**Figura 20-** Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias amostras clínicas, utilizando o conjunto de primers ITS3+SSP1/SSP2. A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 pb DNA ladder); B) Amostra clínica I02061; C) MS26061; D) MS26062; E) MS26063; F) C25051; G) Q03071; H) Q10072; I) controlo negativo; J) controlo positivo (DNA de *Sporothrix schenckii*).



**Figura 21-** Eletroforese em gel de agarose resultante da amplificação de DNA de várias amostras clínicas, utilizando o conjunto de *primers* ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2+SSP1/SSP2. A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 pb DNA ladder); B) Amostra clínica I02061; C) MS26061; D) MS26062; E) MS26063; F) C25051; G) Q03071; H) Q10072; I) controlo negativo; J) controlo positivo (*Sporothrix schenckii*).

O produto resultante do segundo ensaio de PCR, com o conjunto de *primers* ITS1/ITS1mod1/ITS1mod2 + SSP1/SSP2, foi posteriormente sequenciado por forma a identificar a espécie. A análise dos polimorfismos nucleotídicos únicos da sequência resultante demonstrou que o agente causador da infeção teria 100% de identidade com *S. mexicana* (Figura 22).



**Figura 22-** Filograma derivado da análise de sequências ITS de espécies clinicamente importantes de *Sporothrix* depositadas no Genbank. A amostra analisada, designada como *Sample I02061*, agrupa-se num clado separado do complexo clínico, juntamente com as espécies *S. pallida* e *S. mexicana*, apresentando identidade de 100% com a espécie *S. mexicana*. A árvore foi construída com algoritmo Neighbour-joining no programa ClustalX.

A amostra com a designação I02061, pertence a um dos felinos suspeitos de esporotricose da colónia da Idanha. O animal, de aproximadamente dois anos, apresentava lesões cutâneas, evidentes desde o mês de janeiro de 2017, na zona posterior da cabeça e torso, assemelhando-se a lesões neoplásicas (Figura 23, imagem à esquerda). Durante o mês de Março foram realizadas colheitas ao material biológico, para análise utilizando métodos convencionais de diagnóstico. Não obstante ao sistemático resultado negativo da cultura, o clínico responsável indicou a administração de terbinafina durante 6 meses. Posteriormente, a terapêutica antifúngica foi interrompida, e continuada com omnimatrix (creme cicatrizante). Subsequentemente, o material recolhido foi sujeito a análise utilizando o método molecular desenvolvido neste trabalho.

Um segundo caso confirmado de esporotricose, com resultado histopatológico positivo para esporotricose foi identificado no laboratório de Anatomia Patológica VetPat, em Lisboa, num felino pertencente a uma colónia de rua em Mira-Sintra (felino MS26061) . Foi realizada colheita de material biológico neste felino, contudo, não foi possível obter resultado com a cultura dos agentes, o que pode ser explicado pela recolha das amostras após a terapia antifúngica (Figura 23, imagem à direita).





**Figura 23-** Imagens dos casos suspeitos de esporotricose de dois gatos pertencentes a colónias de rua da zona de Lisboa. Imagem à esquerda: animal com lesões cutâneas na nuca e costas, sob tratamento, pertencente à colónia de Idanha, Lisboa (amostra com a designação ID02061; foto gentilmente cedida por Isabel Costa). Imagem à direita: animal com lesão cutânea ulcerativa no pescoço, da colónia de Mira-Sintra (amostra com a designação MS26061; foto gentilmente cedida por Kátia Rebosa).

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Para confirmação de um diagnóstico clínico de infecção fúngica, a cultura é o método de eleição. Contudo, esta metodologia apresenta limitações: a sensibilidade varia de acordo com a experiência do técnico de laboratório e/ou a origem da colheita, para além do elevado consumo de tempo no caso do crescimento de alguns fungos filamentosos, sendo que muitas vezes os resultados são também inconclusivos. Também no caso da esporotricose, a detecção do fungo em cultura e a subsequente análise das características macro e micromorfológicas das formas micelares e leveduriformes representam o método preferencial de diagnóstico. No entanto, no caso desta infecção, o agente etiológico apresenta-se sob a forma de várias espécies fenotipicamente semelhantes compreendidas no chamado complexo *Sporothrix schenckii*. Estas espécies podem causar micoses com diferentes características e manifestações clínicas, e apresentar diferenças importantes no perfil de susceptibilidade aos antifúngicos disponíveis. São vários os trabalhos onde foi necessário reclassificar isolados de *Sporothrix* previamente identificados pelos métodos convencionais (Romeo et al., 2011; Liu et al., 2014; Mahmoudi et al., 2016), ou onde só foi possível a identificação ao nível da espécie através da utilização de métodos de identificação moleculares (Oliveira et al., 2012). Dada a maior sensibilidade e especificidade das ferramentas moleculares na deteção de *Sporothrix* em comparação com metodologias convencionais, como a cultura ou histologia, torna-se necessário um maior esforço no desenvolvimento destes tipos de métodos. Neste trabalho foi desenvolvido um ensaio de PCR para detetar membros do complexo *S. schenckii* a partir de extratos de DNA de amostras ambientais, permitindo também a identificação ao nível da espécie num segundo passo envolvendo a sequenciação do fragmento amplificado. Os resultados apresentados demonstraram uma boa especificidade e sensibilidade analíticas dos ensaios de PCR para a deteção das espécies alvo de *Sporothrix*, com base no teste de extratos de DNA de estirpes de referência, permitindo a posterior identificação de todas as espécies do complexo após análise das sequências parciais amplificadas da região ITS dessas estirpes. O limite de deteção dos ensaios de PCR baixou um pouco quando foram usados como molde extratos de DNA de amostras ambientais artificialmente contaminadas com DNA de *Sporothrix schenckii*. No entanto, este ensaio revelou-se útil na deteção deste agente,

como se encontra discutido mais à frente nesta discussão, num estudo de caso de esporotricose confirmado neste trabalho. Neste caso, só foi possível identificar o agente pelo método molecular desenvolvido, sendo que através dos métodos convencionais não foi possível o seu isolamento e identificação.

Genes que codificam para proteínas são amplamente utilizados em análise filogenética em micologia, particularmente para o estudo da taxonomia do género *Sporothrix*. Não obstante ao sucesso destas abordagens na correta identificação da maior parte das espécies fúngicas, não é recomendada a utilização destes marcadores para deteção de fungos em todos os tipos de amostras, nomeadamente amostras ambientais e clínicas. Entre as desvantagens destes genes encontra-se o facto de serem usualmente genes de cópia única, dificultando a sua amplificação a partir das amostras. Para além disto, estes marcadores geralmente oferecem também problemas na amplificação. A região ITS, pelo contrário, destaca-se por ser uma sequência facilmente amplificável, mesmo que o DNA esteja em pequenas quantidades nas amostras, devido ao elevado número de cópias desta região no genoma fúngico. No caso de *Sporothrix schenckii*, encontram-se no genoma 20 genes codificantes do rRNA, incluindo a região ITS (Cuomo et al., 2014). A região ITS é comumente utilizada em filogenia molecular, uma vez que apresenta regiões altamente conservadas intraespecificamente (nomeadamente a região 5.8S rRNA), e variáveis como é o caso das sequências não codificantes ITS1 e ITS2. Contudo, são escassos os trabalhos na literatura que utilizam esta região como alvo para a deteção e identificação das várias espécies que compreendem o complexo *S. schenckii*, sendo que alguns autores descartam mesmo a viabilidade desta sequência na sua correta distinção (de Meyer et al., 2008; Estrada-Bárceñas, 2014). Através de análise criteriosa de várias centenas de sequências ITS de estirpes de *Sporothrix*, depositadas no Genbank, foi possível concluir que, de facto, é possível discriminar as diferentes espécies entre si, dada a presença de alguns polimorfismos nucleotídeos (maioritariamente localizados na região ITS2). Foi então proposto neste trabalho o desenvolvimento de *primers* específicos para o complexo, denominados SSP1 e SSP2. Estes dois *primers* diferenciam-se numa única base, sendo deste modo possível abarcar todas as espécies de interesse. O fragmento amplificado resultante do ensaio de PCR com os *primers* ITS1/ITS1mod/ITS1mod2 + SSP1/SSP2, contém polimorfismos suficientes que possibilita a discriminação entre todas as espécies clinicamente

importantes de *Sporothrix*. Os resultados obtidos através deste estudo, vieram corroborar trabalhos anteriores que validavam a região ITS como um bom marcador para a identificação das espécies do complexo *S. schenckii* (Zhou et al., 2013).

As espécies do complexo *S. schenckii* têm sido isoladas do ambiente a partir de material orgânico como musgo (Handlers, 1988) ou feno (O'Reilly et al., 2006; Feenery et al. 2007), e solo (Mehta et al., 2007; Rodrigues et al., 2014). De um estudo realizado pela Universidade do Minho em 2012, baseado na caracterização da flora fúngica presente no guano de morcego em vários abrigos cavernícolas do país, foi possível identificar *Sporothrix* sp. em três amostras (Do Vale, 2012). Nesse estudo, na amostra proveniente da gruta do Almonda, Torres Novas, foi identificado DNA de *S. schenckii*. Nos isolados provenientes da Gruta das Gralhas e da Preguiça só foi possível a identificação ao nível do género. Tendo em consideração os ambientes supracitados, neste estudo foi escolhido como material para análise solo, musgo, espinhos de várias espécies de plantas e guano de morcego. Contudo, em nenhuma amostra ambiental estudada neste trabalho foi possível isolar ou detetar DNA de membros do complexo *S. schenckii*. Este resultado parece comprovar que estes agentes são raros no país. Embora não tenha sido possível isolar o agente, ou detetar o seu DNA, nas amostras de guano de morcego provenientes da Gruta do Almonda e da Mina da Preguiça, é de referir que ambos os abrigos são de grandes dimensões. A Gruta do Almonda, a maior cavidade nacional, com aproximadamente 15 km de extensão, possui uma vasta rede de galerias subterrâneas e alberga várias espécies de quirópteros. A Mina da Preguiça, por sua vez, embora de menor dimensão, possui dois níveis e várias galerias, algumas das quais de difícil acesso. As amostragens realizadas neste estudo, comparativamente com o realizado pelos investigadores da Universidade do Minho, podem ter sido efetuadas em localizações diferentes nos abrigos, e o guano recolhido poderá pertencer a diferentes espécies de morcegos. Também não podemos descartar a hipótese dos agentes se encontrarem nestas amostras em quantidades abaixo do limite de deteção dos ensaios de PCR. Na realidade as amostras de guano de morcego colocaram diversos problemas de inibição das reações de PCR. As fezes de animais, como por exemplo o guano de morcego, representam um tipo de amostra muito importante por forma a avaliar a ecologia e epidemiologia de *Sporothrix*. No entanto, devido à presença de vários inibidores, as fezes representam um tipo de amostra extremamente difícil de analisar por

métodos baseados na amplificação de DNA. Neste estudo, para além do método de extração de DNA utilizando azoto líquido para lise das células fúngicas, as amostras foram subsequentemente purificadas através de um protocolo de purificação comercial utilizando colunas e pressurização. Contudo, dado o baixo limite de deteção neste tipo de amostras, outro protocolo de purificação para este tipo de amostras deve ser considerado.

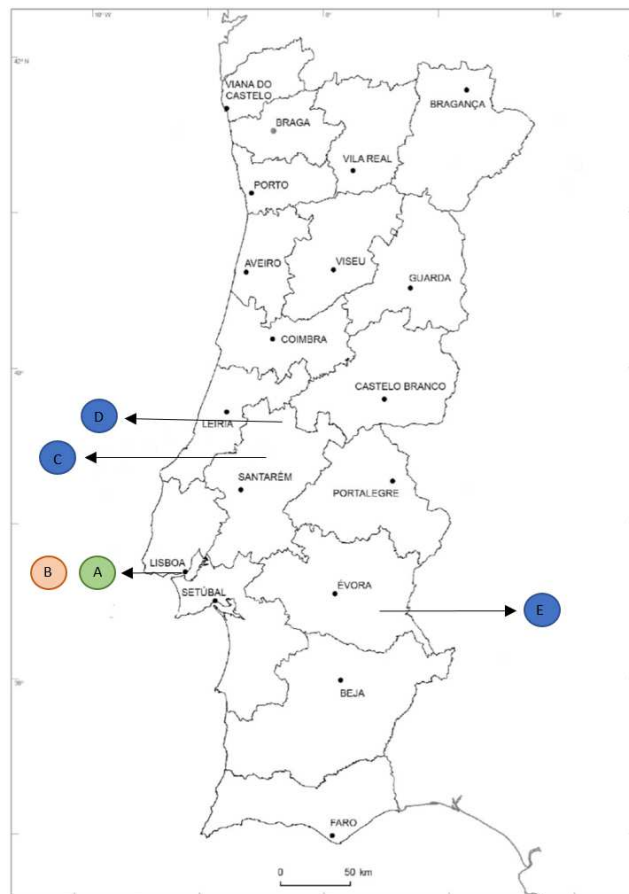
No decorrer do estudo realizado, e no seguimento do contacto com voluntários da organização sem-fins-lucrativos e de apoio a animais abandonados, a “Animais de Rua”, foram posteriormente identificados vários locais com casos suspeitos de esporotricose em felinos, pertencentes a várias colónias na região de Lisboa. Uma das voluntárias, auxiliar de medicina veterinária, proveniente do Brasil, com experiência na identificação de esporotricose, foi quem primeiro alertou para esta possibilidade. Foram então realizadas amostragens em algumas colónias nas zonas de Colaride, Idanha, Mira-Sintra e Queluz. Os animais foram capturados pelas voluntárias e enviados para várias clínicas veterinárias, onde foram colhidas amostras biológicas a partir das lesões suspeitas, assim como zaragatoas das mucosas oral e nasal, e feita a impressão das garras dos felinos em placas de agar de Sabouraud. Desta amostragem foi identificado um caso de esporotricose num dos felinos pertencentes à colónia de Idanha (amostra com a designação ID02061). Através do método molecular desenvolvido foi possível detetar DNA do complexo *S. schenckii* nesta amostra. O produto de PCR resultante do ensaio de PCR com os *primers* ITS1/ITS1mod/ITS2mod2 + SSP1/SSP2 foi sequenciado e revelou ser idêntico com *S. mexicana*. Este é assim o primeiro caso descrito de esporotricose felina autóctone em Portugal causado por esta espécie.

O aparecimento de alguns casos suspeitos de esporotricose em felinos de rua, um deles confirmado através do método de identificação molecular desenvolvido, sendo que os indivíduos pertencem a colónias distintas, geograficamente distantes, permite sugerir que esta micose poderá ter uma prevalência real superior àquela que se julga. Dada a dificuldade na captura e monitorização destes animais, o verdadeiro número de casos de esporotricose é difícil de estimar. No decorrer do estudo, um segundo caso com resultado histopatológico positivo para esporotricose foi identificado no laboratório de Anatomia Patológica VetPat, em Lisboa, num felino pertencente a uma colónia de rua

em Mira-Sintra (felino MS26061) . O animal apresentava lesões ulcerativas na zona do pescoço sem sinal de cicatrização embora se encontrasse sob cuidados. Posteriormente, desenvolveu granulomas na cavidade oral e nasal. Aquando do resultado da análise, o animal foi tratado com Nizoral (cetoconazole), sendo que o tratamento foi posteriormente interrompido e o animal sujeito a cirurgia para remoção dos granulomas.

A tratadora de um dos animais (felino ID02061), uma mulher caucasiana de cerca de 45 anos de idade, voluntária na colónia de gatos abandonados da zona da Idanha, notou o aparecimento de um pequeno nódulo avermelhado “verrucoso” na sua mão direita. Exatamente nesse mesmo local, dias antes, havia sofrido arranhadelas provocadas pelo gato que estaria aos seus cuidados. A lesão aumentou de tamanho com o passar dos dias, sendo que esta acabou por ulcerar e, a partir da fissura resultante, uma substância de aspeto purulento acabou por sair. O clínico que seguiu a paciente suspeitou de esporotricose, pelas lesões apresentadas, e pelo contexto da situação, indicando Daktarin (miconazole) duas vezes ao dia durante 15 dias, e Itraconazole 1 cápsula por dia durante 5 meses. A paciente não finalizou a terapêutica com Itraconazole, mas a lesão acabou por cicatrizar. Mundialmente, são vários os casos de esporotricose felina documentados, desde o Brasil, Estados Unidos, Argentina, Alemanha, Espanha, Japão e Índia. Contudo, não existem muitos casos documentados de transmissão zoonótica fora do Brasil, o país com maior número casos (Gremião et al., 2017). Foi reportado em 2008, no México, um caso de esporotricose humana derivado de arranhões de um gato infetado, e cujo agente etiológico seria *S. schenckii* (Bove-Sevilla et al., 2008). Entre 2011 e 2014 foram reportados quatro casos de esporotricose humana relacionada com gatos em Buenos Aires, Argentina (Fernández et al., 2015 citado em Gremião et al. 2017). Na Malásia, entre 1990 e 2010, foram documentados 12 casos (Gremião et al., 2017). Na Índia foi identificado um caso em 2009 cujo agente etiológico seria *S. schenckii* (Yegneswaran et al., 2009 citado em Gremião et al., 2017). A transmissão zoonótica gato-humano é muito comum no caso de *S. brasiliensis*. Contudo, em *S. schenckii* a transmissão é ocasional e extremamente rara em *S. globosa*. No caso de *S. mexicana* e *S. luriei*, não se conhece na literatura nenhum caso descrito (Moussa et al., 2017). Este possível caso de transmissão zoonótica, documentado neste trabalho, poderá representar a primeira descrição de esporotricose humana por *S. mexicana* nestas circunstâncias.

Embora os agentes da esporotricose pareçam ter uma expressão rara no país, de acordo com o estudo realizado, e também baseado em estudos anteriores, aparentemente são várias as espécies do complexo *S. schenckii* a circular em Portugal, como é possível ver na Figura 24. Neste trabalho foi identificado aquele que poderá ser o primeiro caso autóctone de esporotricose em Portugal, confirmado num felino e suspeito num humano, causado por *Sporothrix mexicana*. Contudo, já havia sido identificado em 2013, um caso autóctone de esporotricose num cidadão de Lisboa, cujo agente etiológico teria sido identificado como *S. globosa* (Oliveira et al., 2014b). Do Vale (2012) conseguiu também isolar e detetar DNA de *Sporothrix* em três amostras de guano de morcego de vários abrigos cavernícolas de Portugal.



**Fig. 24-** Locais em Portugal onde foi detetada a presença de *Sporothrix* sp. A) Lisboa, *Sporothrix mexicana*; B) Lisboa, *Sporothrix globosa* (Oliveira et al., 2014b); C) Gruta do Almonda, *Sporothrix schenckii*; D) Gruta das Gralhas, *Sporothrix* sp.; E) Gruta da Preguiça, *Sporothrix* sp. (Do Vale, 2012).

A esporotricose é uma das principais micoses subcutâneas reportadas mundialmente. Embora a carga de mortalidade associada no ser humano seja residual, com o advento de uma população cada vez mais vulnerável, seja pela utilização massiva de fármacos imunossupressores ou o aparecimento de doenças que comprometem o sistema imunitário, a administração de terapêutica eficaz é fundamental por forma a impossibilitar o curso da infeção. Também no caso de outras comunidades vulneráveis, como por exemplo, as gestantes, onde a conduta terapêutica é limitada devido aos efeitos teratogénicos de alguns fármacos, torna-se imprescindível a correta identificação dos agentes causadores de esporotricose, uma vez que existem diferenças quanto ao perfil de resistência aos antifúngicos e patogenia entre as espécies. A presença destes grupos de risco torna necessário reforçar a atenção da comunidade científica para esta doença emergente que, em certas zonas do globo, se tornou uma epidemia zoonótica de proporções consideráveis. Dada a escassez de conhecimento sobre esta micose entre veterinários, tratadores de animais e a população em geral, a importância deste estudo aumenta significativamente uma vez que em alguns países se trata de uma micose com um importante impacto em Saúde Pública.

Através deste estudo, dada a negatividade das amostras ambientais analisadas, pode-se concluir que o complexo *S. schenckii* aparenta ter uma expressão rara em Portugal. Contudo, o aparecimento de alguns casos confirmados e suspeitos de esporotricose em felinos de várias colónias abandonadas na zona de Lisboa, poderá ser indicativo que, à semelhança do que acontece noutras regiões do mundo, os gatos abandonados podem ser reservatórios importantes destes agentes na comunidade. Seria pertinente um estudo mais alargado de rastreio, envolvendo vários parceiros da área da saúde humana e animal em Portugal, dado o potencial zoonótico de algumas das espécies pertencentes a este curioso complexo de fungos patogénicos.



## 5. BIBLIOGRAFIA

- Almeida-Paes, R., Frases, S., Fialho Monteiro, P.C., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancopé-Oliveira, R.M. and Nosachuk, J.D. 2009. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*. **11**(5):554-62
- Almeida-Paes, R., de Oliveira, M. M. E. and Zancopé-Oliveira, R. M. 2015. *Sporothrix schenckii* Complex: Genetic Polymorphism, pp 23-35. In Zeppone Carlos, I. (ed.), *Sporothrichosis New Developments and Future Prospects*, 1ªEd. Springer International Publishing, Switzerland.
- Almeida-Paes, R., Borba-Santos, L. P., Rozantal, S., Marco, S., Zancopé-Oliveira, R.M. and Da Cunha, M.M.L. 2017. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. *Fungal Biology Reviews*. **31**: 50-59.
- .Arenas, R., Miller, D. and Campos-Macias, P. 2007. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. *International Journal of Dermatology*. **46**(2): 177-9.
- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla,J., Mayayo, E., Marimon, R. and Marine, M. 2009. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*. **15**: 651–655.
- Barile, F., Mastrolonardo, M., Loconsole, F. and Rantuccio, F., 1993. Cutaneous sporotrichosis in the period 1978-1992 in the province of Bari, Apulia, Southern Italy, *Mycosis*. **36**(5-6):181- 185.
- Barros M.B.L., Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B and Schubach A. 2010. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Pública*. **27**(6):455–60.
- Barros, M.B.deL., Almeida-Paes, R. and Schubach, A.O. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporothrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*. **24**(4): 633–654.

- Borges, T.S., Rossi, C. N., Fedullo, D. L., Taborda, J.P. and Larsson, C.E. 2013. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of Domestic cats (Indoor and Outdoor) and in Captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathologia* **176**:129-137.
- Bove-Sevilla P.M., Mayorga-Rodríguez, J. and Hernández-Hernández, O. 2008. Esporotricosis transmitida por gato doméstico. Reporte de un caso. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. **36**(1):33-35
- Bravo, T.C., 2012. Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Revista Latinoamericana Patología Clínica*. **59**(3):147-171.
- Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M.C., Mochizuki, T. and Li, S. 2015. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*. **53**(1): 3-14
- Conti Díaz, I.A. 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. **108**(2):113-6.
- Costa, R.O., De Macedo, P.M., Carvalhal, A. And Bernardes-Engemann, A.R. 2013. Use of Potassium Iodide in Dermatology: updates on an old drug. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. **88**(3): 396–402.
- Cuomo, C.A., Rodriguez-Del Valle, N., Perez-Sanchez, L., Abouelleil, A., Goldberg, J., Young, S., Zeng, Q. and Birren, B. 2014. Genome Sequence of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* (ATCC 58251). *Genome Announcements*. **2**(3):e00446.
- de Beer, Z.W., Harrington, T.C., Vismar, H.F., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*. **95**(3):434-41.
- de Meyer, E.M., de Beer, Z.W., Summerbel, R.C., Moharram, A.M., de Hoog, G.S., Vismar, H.F. and Wingfield, M.J. 2008. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*. **100**(4):647-61.
- Dias, N.M., Oliveira M. M. E., Portela, M.A., Santos, C., Zancoppe-Oliveira R. M. and Lima, N. 2011. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana* Portugal. *Emergency Infectious Diseases*, **17**(10): 1975-1976.

- Do Vale, A.F.S. 2012. Characterization of the fungal flora presente in bat guano: survey for species of clinical interest as a contribution for a public health study. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Genética Humana, Universidade do Minho.
- Echevarría, J.R.G. and Ramos, J.M.H. 2002. Dermatología Infantil en zonas rurales del Trópico- Manual para cooperantes. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat.
- Estrada-Bárceñas, D.A., Vite-Garín, T., Navarro-Barranco, H., de la Torre-Arciniega, R., Pérez-Mejía, A., Rodríguez-Arellanes, G., Ramirez, J.A., Sahaza, J.H., Taylor, M.L. and Toriello, C. 2013. Genetic Diversity of *Histoplasma* and *Sporothrix* complexes based on sequences of their ITS1-5.8S-Its2 regions from the BOLD System. *Revista Iberoamericana de Micología*. **31**(1): 90-94.
- Feenery, K.T., Arthur, I.H., Whittle, A.J., Altman, S.A. and Speers, D.J. 2007. Outbreak of Sporotrichosis, Western Australia. *Emerging Infectious Diseases*. **13**(8): 1228–1230.
- Gremião, I.D. F., Menezes, R. C., Schubach, T.M.P, Figueiredo, A. B. F., Cavalcanti, M. C. H. and Pereira, S.A. 2015. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*. **53** (1): 15-21.
- Gremião I. D. F., Miranda L.H.M., Reis E.G., Rodrigues A.M. and Pereira S.A. 2017. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens*. **13**(1):e1006077
- Guarro, J., Gené, J. and Stchigel, A. M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy, *Clinical Microbiology Reviews*. **12** (3): 454-500.
- Hektoen L. and Perkins C. F. 1900. Refractory subcutaneous caused by *Sporothrix schenckii*, A new pathogenic fungus. *Journal of Experimental Medicine*. **5**: 77-89.
- Hu, S., Chung, W.H., Hung, S.I., Ho, H.C., Wang, Z.W., Chen, C.H., Lu, S.C., Kuo, T.T., Hong, H.S. 2003. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *Journal Clinical Microbiology*. **41**(4):1414-8.
- Ishizaki, H., Kawasaki, M., Aoki, M., Wu, S., Lin, J., Kim., J.A., Won, Y.H. and Calvo, C.R. 2004. Mitochondrial DNA Analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain. *Japan Journal of Medical Mycology*. **45**:23-25.

- Kanbe, T., Natsume, L., Goto, I., Kawasaki, M., Mochizuki, T., Ishizaki, H. and Kikuchi, A. 2005. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. *Journal of Dermatological Science*. **38**(2):99-106.
- Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Tsujimoto, H. and Hasegawa, A. 2001. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses*. **44**(7-8):261-5
- Kano, R., Anzawa, K., Mochizuki, T., Nishimoto, K., Hiruma, M., Kamata, H. and Hasegawa, A. 2013. *Sporothrix schenckii* (sensu strict *S. globosa*) mating type 1-2 (MAT1-2) gene. *Journal of Dermatology*. **40**: 726-730.
- Kauffman, C.A., Bustamante, B., Chapman, S.W. and Pappas, P.G. 2007. Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. **45** (10): 1255-1265.
- Larone, D.H. 1994. *Medically Important Fungi- A Guide to Identification*, 3<sup>a</sup> Ed., American Society Microbiology. Washington, D.C.
- Lima, O.C., Figueiredo, C., Previato, J.O., Mendonça, L., Previato, A., Morandi, V. N. and Lopes Bezerra, L.M. 2001. Involvement of Fungal Cell Wall Components in Adhesion of *Sporothrix schenckii* to Human Fibronectin. *Infection and Immunity*. **69**(11): 6874-6880.
- López-Romero, E., Reye.Montes, M.del R., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J.C., Mora-Montes, H.M., Flores-Carreón, A. and Toriello, C. 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology*. **6**(1):85-102.
- Lloret, A., Hartmann, K., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U. and Horzinek, M. C. 2013. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. **15**: 619-623.

- Liu, T., Zhang, K. and Zhou X. 2013. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. *Journal of Zhejiang University- Science B (Biomedicine and Biotechnology)*, **15** (1): 100-108
- Lopes-Bezerra, L.M., Schubach, A. and Costa, R.O. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **78**(2): 293-308.
- Madrid, H., Cano, J., Gené, J., Bonifaz, A., Toriello, C. and Guarro, J. 2009. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Revista Iberoamericana de Micología*. **26**(3):218-222.
- Madrid, I.M., Xavier, M.O., Mattei, A.S., Fernandes, C.G., Guim, T.N., Santin, R., Schuch, L.F., Nobre, M. O. and Araújo Meireles, M.C. 2010. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection*. **12**(2):162-5
- Magand, F., Perrot, J.L., Cambazard, F., Raberin, M.H. and Labeille, B. 2009. Sporotrichose cutanée autochtone française. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. **136**:273-5.
- Mahajan, V.K. 2014. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options, *Dermatology Research and Practice*. Vol. **2014**, 1-13.
- Mahmoudi S., Zaini, F., Kordbacheh, P., Safara, M. and Heidari, M. 2016. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycology*. **54**: 593-599.
- Marimon R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Lazéra M. dos S. and Guarro, J. 2006. Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**(9):3251-3256
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D., Kawasaki, M. and Guarro, J. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *Journal of clinical Microbiology*. **45**(10):3198-3206.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J. and Guarro, J. 2008. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Medical Mycology*. **46**:621-625.

- Mehta, K.I.S., Sharma, N.L., Kanga, A.K., Mahajan, K. V. and Ranjan N. 2007. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: Results of a pilot study. *Mycoses*. **50**:496-501.
- Mesa-Arango, A.C., Reyes-Montes, M.R., Pérez-Mejía, A., Navarro-Barranco, H., Souza, V., Zúñigo, G., Toriello, C. 2002. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* Isolates According to Geographic Origin and Clinical Form of Sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**(8): 3004-3011.
- Mora-Cabrera, M., Alonso, R.A., Ulloa-Arvizu, R., Torres-Guerrero, H. 2001. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii*. *Medical Mycology*. **39**:439-444.
- Moreno, A.J. 2002. Chapter 8- Sporotrichosis. P.71-74. In Braga, Francisco José, H.N. (ed.), *Nuclear Medicine in Tropical and Infectious Diseases*, **1<sup>st</sup>** Ed, Springer US, New York.
- Morrison, A., Lockhart, S., Bromley, J., Kim, J. 2013. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. *Medical Mycology Case Reports*. **2**: 88-90.
- Moussa T.A., Kadasa, N.M., Al Zahrani H.S., Ahmed S.A., Feng, P., Gerrits Van den Ende A.H., Zhang Y., Kano R., Li F., Li S., Song Y., Dong B., Rossato L., Dolatabadi S., De Hoog S. 2017. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. *Journal of Medical Microbiology*. **66**: 560-569.
- Murray, P. R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M. A. 2010. *Microbiologia Médica*, Tradução da 6<sup>a</sup>Ed., Elsevier Editora Ltda., Rio de Janeiro, Brasil.
- Nassif, P. W., Granado, I. R. M. O., Ferraz, J. S., Souza, R., Nassif, A. E. 2012. Esporotricose cutânea de apresentação atípica em paciente etilista. *Dermatology Online Journal*. **18**(6) :12
- Neyra, E., Fonteyne, P.A., Swinne, D., Fauche, F., Bustamante, B., Nolard, N. 2005. Epidemiology of Human Sporotrichosis Investigated by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**(3): 1348–1352.

- O'Reilly, L.C., Altman S.A. 2006. Macrorestriction Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**(7): 2547–2552.
- Ojeda, T., Rodríguez-Pichardo, A., Suárez, A.I., Camacho, F.M. 2011. Sporotrichosis in Seville (Spain). *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. **29**:233-4.
- Oliveira, M.M.E., Almeida-Paes, R., Muniz, M.M., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancope-Oliveira, R.M. 2011. Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* Isolates from an Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil. *Mycopathology*. **172**:257-267.
- Oliveira, M.M.E., Sampaio, P., Almeida-Paes, R., Pais, C., Gutierrez-Galhardo, M.C. and Zancope-Oliveira, M. 2012. Rapid Identification of *Sporothrix* Species by T3B Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. **50** (6): 2159–2162.
- Oliveira, M.M.E., Maifrede, S.B., Ribeiro, M.A., Zancope-Oliveira, R.M., 2013. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **108** (7) :936-938
- Oliveira, M.M.E., Almeida-Paes, R., Muniz, M.M., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancope-Oliveira, R.M. 2014a. Molecular Identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Revista Iberoamericana de Micología*. **31**(1):2-6.
- Oliveira, M.M.E, Veríssimo, C., Sabino, R., Aranha, J., Zancope-Oliveira, M.C., Sampaio, P., Pais, C. 2014b. First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. *Diagnosics Microbiology and Infectious Disease*. **78** (2014) 388–390.
- Pappas, P.G., Tellez, I., Deep, A.E., Nolasco, D., Holgado, W., Bustamante, B. 1999. Sporotrichosis in Peru: Description of an Area of Hyperendemicity. *Clinical Infectious Diseases*. **30**:65–70.
- Pappas, P.G. 2011. Sporotrichosis. P.387-395 In Kauffman, C.A., Pappas, P.G., Sober, J.D., Dismukes, W.E. (ed.) *Essentials of Clinical Mycology*, 2nd Ed., Springer Science+Business Media, New York, USA.

- Reis, R.S., Almeida-Paes, R., Muniz, M.deM., Tavares, P.M., Monteiro, O.C., Schubach, T.M., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancopé-Oliveira, R.M. 2009. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **104**(5):769-774.
- Rodrigues, A.M., Teixeira, M., de Hoog, G.S., Schubach, T., Pereira, S., Fernandes, G., Bezerra, L., Felipe, M., Camargo, Z. 2013. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7**(6):e228.
- Rodrigues A.M., de Hoog G.S., Camargo Z.P. 2014a. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. **78**:383–38.
- Rodrigues A.M., Bagali, E., de Camargo, Z.P., Bosco S. de M. 2014b. *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolated from soil in an armadillo's burrow. *Mycopathologia*. **177**(3-4):199-206.
- Rodrigues, A.M., De Hoog, G.S., Pires, D.C., Brilhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Gadelha, M.F., Colombo, A.L., Camargo, Z.P. 2014c. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *Infectious Diseases*. **14**:219
- Rodrigues, A.M., Hoog, G.S., De Camargo, Z.P. 2015. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **9**(12): e0004190.
- Rodrigues, A.M., de Hoog, G. S., de Camargo, Z.P. 2016. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal-Animal Transmission. *PLoS Pathogens*. **12**(7): e1005638.
- Romeo, O., Scordino, F., Criseo, G. 2011. New Insight into Molecular Phylogeny and Epidemiology of *Sporothrix schenckii* Species Complex Based on Calmodulin-Encoding Gene Analysis of Italian Isolates. *Mycopathologia*. **172**:179–186.
- Sandhu, G.S., Kline, B.C., Stockman, L., Roberts, G.D. 1995. Molecular Probes for Diagnosis of Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**(11): 2913- 2919.



- Schubach, A., Schubach, T.M.P., Barros, M.B.de L., Wanke, B. 2005. Cat-transmitted Sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. **11**(12): 1952-1954
- Symmers W.S.1968. Sporotrichosis in Ireland. *Ulster Medical Journal*. **37**: 85–101.
- Suzuki K., Kawasaki, M., Ishizaki, H. 1988. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia*. **103**(3):145-51.
- Suzuki, K., Kawasaki, Yikelamu, A., Tanaka, R., Igawa, K., Yokozeki, H., Yaguchi, T. 2016. Studies in Phylogeny, Development of Rapid Identification Methods, Antifungal Susceptibility and Growth Rates of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* complex in Japan. *Medical Mycology Japan*. **57**(3): E47-E57.
- Takeda, Y., Kawasaki, M., Ishizaki, H. 1991. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia* **116**: 9-14.
- Télez, M.D., Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Quinello, C., Hernández-Bonne, R., Carlos, I.Z. 2014. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology*. **160**: 2352–2365.
- Ventin, M., Ramirez, C., Ribera, M., Ferrandiz, C., Savall, R., Peyri, J. 1987. A significant geographical area for the study of the epidemiological and ecological aspect of mediterranean sporotrichosis. *Mycopathology*. **99**:41-43.
- Watanabe, S., Kawasaki, M., Mochizuki, T., Ishizaki, H. 2004. RFLP Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region of *Sporothrix schenckii*. *Japan Journal of Medical Mycology*. **45**:165-175.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 315–322.
- Xavier, M.H.S.B., Teixeira, A. L., Pinto, J. M. N. P., Rodrigues, K. S., Vilar, E. G., Souza, A.C.L., Pereira, G.B. 2008. Cat-transmitted cutaneous lymphatic sporotrichosis. *Dermatology Online Journal*. **14**(7): 4.

- Yagnik, K.J., Skelton, W.P., Olson, A., Trillo, C.A., Lascano, J. 2017. A rare case of disseminated *Sporothrix schenckii* with bone marrow involvement in a patient with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *ID Cases*. **9**: 70–72.
- Yamada, K., Zaitz, C, Framil, Valéria, M., Muramatu, L. 2011. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide: A 24 year experience in São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **53**(2): 89-93.
- Yu, X., Wan, Z., Zhang, Z., Li, F., Li, R., Liu, X. 2013. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. *Mycopathologia*. **176**81(2):67-74.
- Zhang, Y., Hagen, F., Stielow, B., Rodrigues, A.M., Samerpitak, K., Zhou, X., Feng, L., Yang, M., Deng, S., Li, S., Liao, W., Li, R., Li, F., Meis, J.F., Guarro, J., Teixeira, M., Al-Zahrani H.S., Pires de Camargo, Z., Zhang, L., de Hoog G.S. 2015. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia*. **35**:1–20.
- Zhou, X., Rodrigues, A.M., Feng, P., de Hoog, G.S. 2013. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Diversity*. **66**(1): 153–165.

## **6. ANEXOS**

## Anexo I- Características das amostras colhidas e analisadas neste trabalho

Número	Amostra	Local de amostragem	Data da amostragem	Autor da colheita	Tipo amostra	Resultado	
						Cultura	Identificação Molecular
1	CA2101	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
2	CA2102	Cadaval, lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
3	CA2103	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
4	CA2104	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
5	CA2105	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
6	CA2106	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
7	CA2107	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	negativo	Negativo
8	CA2108	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
9	CA2109	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
10	CA2110	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
11	CA2111	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
12	CA2112	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
13	CA2113	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
14	CA2114	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
15	CA2115	Cadaval, Lisboa	21/i04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
16	CA2116	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
17	CA2117	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo

**Anexo I- Cont.**

Número	Amostra	Local da amostragem	Data Amostragem	Autor da Colheita	Tipo de amostra	Resultado	
						Cultura	Identificação Molecular
18	CA2118	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
19	CA2119	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
20	CA2120	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	espinhos	Negativo	Negativo
21	CA2121	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	negativo	negativo
22	CA2122	Cadaval, lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
23	CA2123	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
24	CA2124	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
25	CA2125	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
26	CA2126	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
27	CA2127	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	negativo	negativo
28	CA2128	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
29	CA2129	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
30	CA2130	Cadaval, Lisboa	21/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
31	AR2901	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
32	AR2902	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
33	AR2903	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo

Anexo I- Cont.

Número	Amostr a	Local de Amostragem	Data da Amostragem	Autor da Amostragem	Tipo amostra	Resultado	
						Cultu ra	Identificaçã o Molecular
34	AR2904	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negati vo	Negativo
35	AR2905	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negati vo	Negativo
36	AR2906	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negati vo	Negativo
37	AR2907	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negati vo	Negativo
38	AR2908	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Solo	negati vo	negativo
39	AR2909	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Solo	Negati vo	Negativo
40	AR2910	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Guano de Morcego	Negati vo	Negativo
41	AR2911	Além da Ribeira, Santarém	29/04/17	Mafalda Dançante	Guano de Morcego	Negati vo	Negativo
42	AL0901	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negati vo	Negativo
43	AL0902	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negati vo	Negativo
44	AL0903	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negati vo	Negativo
45	AL0904	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negati vo	Negativo
46	AL0905	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinho s	Negativo	Negativo

**Anexo I- Cont.**

Número	Amostra	Local da Amostragem	Data da amostragem	Autor da Colheita	Tipo de Amostra	Resultado	
						Cultura	Identificação molecular
47	AL0906	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
48	AL0907	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
49	AL0908	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
50	AL0909	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
51	AL0910	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Musgo	negativo	negativo
52	AL0911	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Musgo	Negativo	Negativo
53	AL0912	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
54	AL0913	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
55	AL0914	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
56	AL0915	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
57	AL0916	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Mafalda Dançante	Musgo	negativo	negativo
58	AL0917	Gruta do Almonda, Santarém	09/05/17	Dr <sup>a</sup> Luísa Rodrigues	Guano de Morcego	Negativo	Negativo
59	PR1701	Mina da Preguiça, Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo

**Anexo I- Cont.**

Número	Amostra	Local da amostragem	Data da amostragem	Autor da Colheita	Tipo de Amostra	Resultado	
						Cultura	Identificação molecular
60	PR1702	Mina da Preguiça. Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
61	PR1703	Mina da Preguiça, Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
62	PR1703	Mina da Preguiça, Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
63	PR1704	Min da Preguiça, Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Guano de morcego	Negativo	Negativo
64	AA1703	Abrigo do Alqueva, Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
65	AA1704	Abrigo do Alqueva, Beja	17/05/17	Bruno Silva	Guano de Morcego	Negativo	Negativo
66	AA1705	Abrigo do Alqueva, Beja	17/05/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
67	FS1501	Fojo, Sesimbra	15/05/17	Drª Luísa Rodrigues	Guano de Morcego	Negativo	Negativo
68	LG1502	Lousal, Grândola	15/05/17	Drª Luísa Rodrigues	Guano de Morcego	Negativo	Negativo
69	I02061	Idanha, Lisboa	02/06/17	VETPAT	clínica	Negativo	Positivo
70	I02062	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
71	I02063	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
72	I02064	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
73	I02065	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
74	I02067	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
75	I02068	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo




Anexo I- Cont.

Número	Amostra	Local de amostragem	Data da amostragem	Autor da recolha	Tipo de Amostra	Resultado	
						Cultura	Identificação molecular
76	I02069	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
77	I02069	Idanha, Lisboa	02/06/17	Mafalda Dançante	solo	Negativo	Negativo
78	MS26061	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Kátia Rebosa	clínica	Negativo	Negativo
79	MS26062	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Drº Cláudio Cabral, Pontovet	clínica	Negativo	Negativo
80	MS26063	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Kátia Rebosa, Pontovet	clínica	Negativo	Negativo
81	MS26064	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
82	MS26065	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
83	MS26066	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
84	MS26067	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
85	MS26068	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
86	MS26069	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
87	MS26070	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Espinhos	Negativo	Negativo
88	MS260711	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo
89	MS260672	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Dançante	Solo	Negativo	Negativo

**Anexo I- Cont.**

Número	Amostra	Local da Amostragem	Data da Amostragem	Autor da colheita	Tipo de Amostragem	Resultado	
						Cultura	Identificação Molecular
90	MS260673	Mira-Sintra, Lisboa	26/06/17	Mafalda Daçante	Solo	Negativo	Negativo
91	C25051	Colaride, Lisboa	25/05/17	Drº Cláudio Cabral, Pontovet	clínica	Negativo	Negativo
92	C25052	Colaride, Lisboa	25/05/17	Mafalda Daçante	solo	Negativo	Negativo
93	C25053	Colaride, Lisboa	25/05/17	Mafalda Daçante	solo	Negativo	Negativo
94	C25053	Colaride, Lisboa	25/05/17	Mafalda Daçante	espinhos	Negativo	Negativo
95	C25054	Colaride, Lisboa	25/05/17	Mafalda Daçante	solo	Negativo	Negativo
96	Q03071	Queluz, Lisboa	03/07/17	Animais e Cãopanhia	clínica	Negativo	Negativo
97	Q10072	Queluz, Lisboa	21/06/17	AndiCat	clínica	Negativo	Negativo
98	B20041	Belém, Lisboa	20/04/17	Mafalda Daçante	solo	Negativo	Negativo
99	B20042	Belém, lisboa	20/04/17	Mafalda Daçante	solo	Negativo	Negativo
100	B20043	Belém, Lisboa	20/04/17	Mafalda Daçante	Espinhos	Negativo	Negativo
101	B20044	Belém, Lisboa	20/04/17	Mafalda Daçante	Musgo	Negativo	Negativo
102	B20045	Belém, Lisboa	20/04/17	Mafalda Daçante	Solo	Negativo	Negativo

**Anexo II- Alinhamento das sequências ITS de várias espécies clinicamente importantes de *Sporothrix*, locais de hibridação dos primers usados neste trabalho e polimorfismos diferenciadores entre as espécies do complexo *S. schenckii*.**

ITS1  


Ssch95_KF961127.1	-----ATCATTACAGA-GTTTTCACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch1_KF961118.1	-----ATCATTACAGAAGTTTTTACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch1_KF961139.1	-----ATCATTACAGA-GTTTTCACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch1_KF961140.1	-----ATCATTACAGA-GTTTTCACAAC TCCCAATCCT TGCGAACCGTACC
Ssch1_KJ999885.1	-----CGTACC
Ssch1_KF961131.1	-----ATCATTACAGA-GTTTTCACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch52_KF961135.1	-----ATCATTACAGA-GTTTTCACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch1_LC012514.1	GAACCTGCGGAGGGATCATTACAGA-GTTTTTACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch5_KU041846.1	-----ACTCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Ssch1_KP890189.1	-----CTCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Sglo_KF574456.1	-----TTACAGA-GTTTTCACAAC TCCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Sbra_KP017087.1	-----ACTCCAACCC TTGCGAACCGTACC
Spal_EF127879.1	-----
Smex_KP017072.1	-----ACTCCACCC TTGTGA-CCATACC
Ssch95_KF961127.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch1_KF961118.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch1_KF961139.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch1_KF961140.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch1_KJ999885.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch1_KF961131.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch52_KF961135.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGAACGGCCC
Ssch1_LC012514.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---TGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch5_KU041846.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Ssch1_KP890189.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Sglo_KF574456.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAG---CGGGGGGGCGCCCGACACGGCCC
Sbra_KP017087.1	CAATCTCGTTCTCGTTGCTTCTGGCGGGGGGAGCGGGGGGGCGCCCGAGAGGGCCC
Spal_EF127879.1	-----
Smex_KP017072.1	CAAA-TCGTTCTCGTTGCTTCCGGCGGGGGGAG-----GGGGGGCCTGAAAACGGCC



Anexo II- Cont.

ITS3 →

Ssch95\_KF961127.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_KF961118.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_KF961139.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_KF961140.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_KJ999885.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_KF961131.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch52\_KF961135.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_LC012514.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch5\_KU041846.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Ssch1\_KP890189.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Sglo\_KF574456.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Sbra\_KP017087.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Spal\_EF127879.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
Smex\_KP017072.1 CTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
\*\*\*\*\*

Ssch95\_KF961127.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_KF961118.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_KF961139.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_KF961140.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_KJ999885.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_KF961131.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch52\_KF961135.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_LC012514.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch5\_KU041846.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Ssch1\_KP890189.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Sglo\_KF574456.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Sbra\_KP017087.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Spal\_EF127879.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
Smex\_KP017072.1 CGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC  
\*\*\*\*\*

**Anexo II- Cont.**

	<b>SNP7</b>
	↓
Ssch95_KF961127.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_KF961118.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_KF961139.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_KF961140.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_KJ999885.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_KF961131.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch52_KF961135.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_LC012514.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch5_KU041846.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Ssch1_KP890189.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Sglo_KF574456.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCC-TCCGC
Sbra_KP017087.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCGCCCTCCGC
Spal_EF127879.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCTCC-TCCGC
Smex_KP017072.1	ATTTCCCCCTCACGCGCCCCGTTGCGCGCTGGTGTGGGGCTCC-TCCGC
	*****

	<b>SNP8</b>	<b>SNP9</b>	<b>SNP10</b>
	↓	↓	↓
Ssch95_KF961127.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_KF961118.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_KF961139.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_KF961140.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_KJ999885.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_KF961131.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch52_KF961135.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGAAGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_LC012514.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGAAGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch5_KU041846.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGAAGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Ssch1_KP890189.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Sglo_KF574456.1	CTGGCGGAGG-CCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Sbra_KP017087.1	CTGGCGGGGGCCCCCGAAAGCGAGTGGCGGGCCCTG-TGGATGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Spal_EF127879.1	CTGGCGGAGGGCCCC-GAAAGCGAGTGGCGGGCCCGGCTGGTTGGCTCCGAGCGCAGTAC		
Smex_KP017072.1	CTGGCGGAGGGCCCC-GAAAGCGAGTGGCGGGCCCGGCTGGTTGGCTCCGAGCGCAGTAC		
	*****	*****	*****

