

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MANOEL MARQUES EVANGELISTA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E IMPLEMENTAÇÃO DE  
FERRAMENTAS MOLECULARES NA  
IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DO COMPLEXO  
*Sporothrix* spp..**

Rio de Janeiro

2013

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E IMPLEMENTAÇÃO DE  
FERRAMENTAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE  
ISOLADOS DO COMPLEXO *Sporothrix* spp..**

MANOEL MARQUES EVANGELISTA DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Rio de Janeiro

2013

O48 Oliveira, Manoel Marques Evangelista de

Análise filogenética e implementação de ferramentas moleculares na identificação de isolados do complexo *Sporothrix spp.* / Manoel Marques Evangelista de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2013.

x, 103 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 73-93

1. Complexo *Sporothrix*. 2. Taxonomia polifásica. 3. T3B fingerprinting MALDI-TOF ICMS. I. Título.

CDD 579.5

MANOEL MARQUES EVANGELISTA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE FILOGENÉTICA E IMPLEMENTAÇÃO DE FERRAMENTAS  
MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DO COMPLEXO**

***Sporothrix spp.***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Aprovada em 27/11/2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo (Presidente)  
Doutora em Medicina (Dermatologia)  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach  
Doutor em Ciências  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Lúcia Martins Teixeira  
Doutora em Ciências (Microbiologia)  
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes  
Doutor em Ciências  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo  
Doutor em Ciências  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes (Revisor e suplente)  
Doutor em Ciências  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz



A minha família meus pais Manoel e Lucia pelo amor, carinho, dedicação, apoio, exemplos de vida e razão de minha existência. A meus irmãos Armando e Pedro Henrique, amigos e companheiros sempre. A minha esposa Mariângela, amiga e companheira de todas as horas boas e difíceis. A meus avós Cacilda e Amando (saudades) pelo carinho e apoio sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação dedicada e pela companhia durante a superação dos obstáculos nesta caminhada. Quantas histórias, momentos de grandes dificuldades e também muitas conquistas. Acredito que as frases que utilizamos com mais frequência foram: “Vamos fazer...?” e “Nós podemos ...”. Muito obrigado por acreditar em mim, pelas oportunidades de aprendizado, pela amizade, obrigado por tudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo, pelas ótimas observações realizadas durante os seminários de qualificação, por acreditar em nosso trabalho e pela amizade.

Ao revisor e amigo Rodrigo de Almeida Paes, pela grande contribuição e colaboração no trabalho, nas extensas discussões durante a preparação dos manuscritos e no desenvolvimento dos trabalhos do nosso grupo de esporotricose. Obrigado pela parceria que desenvolvemos no grupo de pesquisa em esporotricose, juntamente com os demais colegas pesquisadores da equipe.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pelo curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e aos seus professores. Agradeço em especial, aos funcionários da pós-graduação Marcelo, Priscilla e Sônia que sempre foram muito agradáveis e solícitos.

A minha família por todo apoio e que apoio, desde uma palavra de incentivo até uma ajuda nos momentos mais difíceis. Principalmente durante os momentos mais difíceis e desafiadores, dos quais somente o doutorando sabe como é. Obrigado a todos: meu pai (Manoel), minha mãe (Lúcia), meus irmãos (Armando e Pedro Henrique), meus avós (Cacilda e Amando, Puxa!!! Saudade dos ensinamentos e palavras de incentivo. Sempre com a frase “Você está bem e feliz com o que está fazendo?”) e minha esposa (Mariângela).

Minha esposa, Mariângela, merece um agradecimento especial, pois ela sempre tem uma palavra de incentivo e apoio “Se é bom para você nós vamos...”. Obrigado por todo apoio sempre e pela força para superarmos as dificuldades.

A todos os amigos do Laboratório de Micologia, setor de Imunodiagnóstico, minha “família carioca”. Principalmente à “trupe da velha guarda”: Mauro, Claudia e Marcos, pelos agradáveis momentos de convívio, pela ótima receptividade no laboratório sempre, pelos bons momentos de descontração e por todo apoio durante essa caminhada. E aos demais integrantes do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, setor de Diagnóstico Micológico, pelos agradáveis momentos de convívio, em especial a Helena e Fábio pelo auxílio sempre que necessário.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Célia Pais e Prof<sup>ª</sup>. Dra. Paula Sampaio, pela fantástica recepção em seu laboratório durante o ano de minha bolsa sanduíche na Universidade do Minho, Braga, Portugal. Agradeço também todo o aprendizado, orientação, amizade e colaborações.

A minha “família bracarense” do Laboratório da Micro II, na Universidade do Minho: Joana Pereira, Catarina Carneiro, Catarina Vaz, João Pacheco e Filipa Vale; pela ótima recepção e pelos momentos agradáveis de convívio. Muito obrigado pelo aprendizado e pela construção de uma bela amizade.

Aos Professores Dr. Nelson Lima e Dr. Cledir Santos, pelo bom acolhimento no laboratório na Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal; e pelo aprendizado, amizade e colaboração

Ao amigo Isaac, parceiro e companheiro que sempre me ajudou e pela sua amizade.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Célia Maria de Almeida Soares e demais professores e pesquisadores do laboratório na Universidade Federal de Goiás, pelo apoio, colaboração e bom recebimento no laboratório.

Aos amigos da Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial ao Prof. Renê Gonçalves de Matos e a Prof<sup>ª</sup> Maria Helena Braga, pelas oportunidades, pela amizade e pelo apoio sempre.

As agências de fomento Fapetj e Capes.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

“Você não sabe  
O quanto em caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas  
Antes de dormir  
Eu nem cochilei! ”

Tony Garrido, Da Gama,  
Lazão, Bino

Oliveira, M.M.E. **Análise filogenética e implementação de ferramentas moleculares na identificação de isolados do complexo *Sporothrix* spp.**. Rio de Janeiro, 2013. 103f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

A esporotricose, micose subcutânea causada pelo complexo *Sporothrix schenckii*, é cosmopolita e a mais frequente na América Latina. Nos últimos anos tem aumentado significativamente o número de casos no Brasil, com destaque para o aumento no estado do Rio de Janeiro. Atualmente, quatro novas espécies dentro do gênero *Sporothrix* têm sido consideradas, sendo essas: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix luriei*, as quais são altamente associadas às duas espécies já existentes *S. schenckii* e *S. albicans*, sendo a última recentemente renomeada como *S. pallida*. A caracterização destas espécies foi realizada por meio da utilização de provas fenotípicas: morfologia de conídios, teste de crescimento à 30°C e 37°C, teste de termotolerância, auxonograma e sequenciamento parcial do gene da calmodulina. O principal objetivo deste estudo foi a caracterização de espécies do complexo *Sporothrix* por meio de taxonomia molecular através do desenvolvimento de metodologia baseada em ácidos nucleicos para a identificação das espécies e a determinação do perfil proteômico do complexo *Sporothrix*, utilizando metodologia baseada em espectrometria de massa em célula intacta (MALDI-TOF ICMS). No presente trabalho foi realizada a identificação em nível de espécie de isolados clínicos e ambientais oriundos da epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro, de um surto zoonótico familiar no estado do Espírito Santo e dois isolados clínicos oriundos de Portugal. Por meio da identificação por taxonomia polifásica de 246 isolados clínicos e um ambiental obtidos da endemia de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro foi demonstrado que esta abordagem é fundamental para a identificação das espécies do complexo *Sporothrix*. A identificação em nível de espécies de cepas do complexo *Sporothrix* spp. provenientes de diferentes regiões geográficas, demonstrou *S. globosa* e *S. mexicana* circulando em Portugal, sugerindo que a esporotricose seja subdiagnosticada naquele país, e que esta micose poderia ser considerada emergente no sul da Europa. Também descrevemos o primeiro surto causado por *S. brasiliensis* fora da zona endêmica do Rio de Janeiro. Para a identificação das espécies de *Sporothrix* descrevemos uma PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B, o qual distinguiu com sucesso as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, e *S. schenckii*. Essa metodologia gerou padrões de bandas distintos, permitindo a correta identificação de todos os 35 isolados clínicos estudados apresentando 100% de concordância com o sequenciamento parcial do gene da calmodulina, sendo uma técnica rápida e de fácil execução. A padronização da metodologia do MALDI-TOF ICMS, possibilitou a determinação de perfis proteômicos distintos entre as espécies do complexo *Sporothrix*, demonstrando a aplicabilidade desta técnica na diferenciação das espécies. A caracterização de espécies do complexo *Sporothrix* em nosso estudo foi a maior reportada na literatura especializada até o presente. Concluímos que a taxonomia polifásica é fundamental para diferenciação das espécies de *Sporothrix*, podendo ser realizada com as técnicas de T3B *Fingerprinting* e MALDI-TOF ICMS, tendo importância na epidemiologia e clínica da esporotricose.

**Palavras-chave:** Complexo *Sporothrix*, taxonomia polifásica, T3B *Fingerprinting* MALDI-TOF ICMS.

Oliveira, M.M.E. **Phylogenetic analysis and implementation of tools for molecular identification of *Sporothrix* spp. complex.** Rio de Janeiro, 2013. 103f. PhD [ Science Thesis in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Sporotrichosis, a subcutaneous mycosis caused by the *Sporothrix schenckii* complex, has a worldwide distribution and is frequent in Latin America. In last years, the number of cases has been significantly increased in Brazil, especially in Rio de Janeiro state. Recently, four new species, in *Sporothrix* genus have been considered, these species are: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, and *Sporothrix luriei* which are highly associated to the two existing species *S. schenckii* and *Sporothrix albicans* that has been recently renamed as *Sporothrix pallida*. The characterization of these species was performed by the use of phenotypic tests: morphology of conidia, growth rates at 30°C and 37°C, thermotolerance, carbohydrate assimilation tests and partial sequencing of the calmodulin gene. The main goal of this study was the characterization of species of *Sporothrix* complex by molecular taxonomy, through the development of methodology using nucleic acids for identification of species and determination of proteomic profile of *Sporothrix* using a method based on intact cell mass spectrometry (MALDI-TOF ICMS). In the present work the identification to the species level of clinical and environmental isolates originating from the sporotrichosis endemic in Rio de Janeiro, from an outbreak of zoonotic sporotrichosis in Espirito Santo, and two clinical isolates from Portugal was performed. Through identification by polyphasic taxonomy of 246 clinical isolates and one environmental isolate obtained from the endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro state, it has been shown that this approach is essential to identify the species of the *Sporothrix* complex. The identification at species level of strains from the *Sporothrix* spp. complex from different geographic regions demonstrated *S. globosa* and *S. mexicana* circulating in Portugal, suggesting that sporotrichosis should be under diagnosed in that country and that this mycosis could be considered as an emerging mycosis in southern Europe. We also describe the first outbreak caused by *S. brasiliensis* outside the endemic zone of Rio de Janeiro. To identify the species of *Sporothrix* we describe a PCR fingerprinting using the universal primer T3B which distinguished successfully the species *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, and *S. schenckii*. This methodology has generated different band patterns allowing the correct identification of all 35 clinical isolates studied with 100 % of concordance with partial sequencing of the calmodulin gene, being a methodology fast and easy to apply. The standardization of MALDI-TOF ICMS technique allowed the determination of distinct proteomic profiles between different species of *Sporothrix*, demonstrating the feasibility of this technique in the differentiation of species. The speciation of *Sporothrix* complex in this study was the largest reported in the specialized literature up to now. We conclude that the polyphasic taxonomy is essential for differentiation of *Sporothrix* species and could be performed with the techniques of T3B fingerprinting and MALDI - TOF ICMS, having importance in the epidemiology and clinics of sporotrichosis.

**Keywords:** *Sporothrix* complex, polyphasic taxonomy, sporotrichosis, T3B Fingerprinting, MALDI-TOF ICMS.

## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 – ESPOROTRICOSE .....  | 1         |
| 1.1.1 - Histórico .....  | 1         |
| 1.1.2. Epidemiologia.....  | 1         |
| 1.1.3. Patogenia .....   | 3         |
| 1.1.4. Formas clínicas .....   | 4         |
| 1.1.5. Diagnóstico laboratorial da esporotricose .....   | 6         |
| 1.1.5.1 Métodos moleculares para o diagnóstico da esporotricose .....  | 8         |
| 1.1.5.2 Identificação molecular de espécies do complexo <i>Sporothrix</i> .....  | 9         |
| 1.2 - O GÊNERO <i>SPOROTHRIX</i> .....   | 10        |
| 1.2.1. Sistemática .....   | 10        |
| 1.2.2. Filogenia do gênero <i>Sporothrix</i> .....   | 13        |
| 1.2.3. Morfologia e Fisiologia.....  | 15        |
| 1.2.4. Fatores de virulência.....  | 17        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1. GERAL.....  | 22        |
| 3.2. ESPECÍFICOS.....  | 22        |
| <b>4.CAPÍTULO 1 .....</b>  | <b>23</b> |
| <i>Comparação entre método de caracterização fenotípica e genotípica das espécies do complexo Sporothrix.</i> .....                                    | 23        |
| <b>5.CAPÍTULO 2 .....</b>  | <b>40</b> |
| <i>Comparação de fenótipos e genótipos entre Sporothrix spp. obtidos no estado do Rio de Janeiro com isolados de outras regiões geográficas.</i> ..... | 40        |
| <b>6.CAPÍTULO 3 .....</b>  | <b>59</b> |
| <i>Inclusão de nova metodologia baseada em ácidos nucleicos para caracterização de espécies do complexo Sporothrix.</i> .....                          | 59        |
| <b>7.CAPÍTULO 4 .....</b>  | <b>64</b> |
| <i>Determinação do perfil proteômico do complexo Sporothrix, utilizando metodologia baseada em espectrometria de massa.</i> .....                      | 64        |
| <b>8. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>9. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>73</b> |
| <b>10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>   | <b>74</b> |
| <b>11. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>75</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 – Esporotricose

### 1.1.1 - Histórico

O fungo *Sporothrix schenckii* foi isolado pela primeira vez por Benjamin Schenck, em 1896, de um paciente com 36 anos, do sexo masculino, apresentando lesões na mão e no braço direito. Este isolado, obtido da secreção dos abscessos que o paciente apresentava, foi estudado pelo micologista Erwin Smith, que concluiu que este fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898). Anteriormente, Linck em 1809 e Lutz em 1889 já tinham se referido a possíveis casos de esporotricose. No entanto, não foi possível o isolamento do fungo para a confirmação dos casos (Kwon-Chung & Bennet, 1992). O segundo caso indiscutível de esporotricose descrito, também nos Estados Unidos, em Chicago, por Hekton & Perkins (1900), relata o desenvolvimento de uma lesão no dedo de um menino após ter sofrido um ferimento por uma martelada, lesão esta que regrediu espontaneamente. Tais pesquisadores deram a esse fungo patogênico sua denominação atual, *Sporothrix schenckii* (Hekton & Perkins, 1900). Em 1907, o primeiro caso de infecção natural em animais foi descrito por Lutz & Splendore (1907), em ratos, no Brasil, onde a possibilidade de contágio ao homem pela mordedura desses animais foi mencionada (Pupo, 1917). Este fungo tem sido identificado em diversas áreas do mundo e, mais recentemente, a maioria dos casos publicados é proveniente da América Latina, em especial México, Colômbia, Brasil e Peru, além do continente africano (Pappas et al., 2000; Kovarik et al., 2008; Lopez-Romero et al., 2011).

### 1.1.2. Epidemiologia

A esporotricose é a micose subcutânea mais prevalente na América Latina (Conti-Diaz, 1989; Kovarik et al., 2008, Lopez-Romero et al., 2011), onde as taxas de infecção em áreas rurais são relevantes (Pappas et al., 2000). No Brasil, a distribuição de *S. schenckii* no meio ambiente e as características do seu nicho ecológico têm sido muito pouco estudadas. Podendo ser enumerados os trabalhos referentes ao isolamento deste fungo do solo, apesar de alguns casos terem sido descritos em especial no Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (Freitas et al., 1965; Lopez et al., 1999; Barros et al., 2004, Freitas et al., 2010).



No homem, a esporotricose é uma doença que costuma ocorrer sob a forma de casos isolados ou em pequenos surtos familiares ou profissionais, envolvendo pessoas expostas a vegetais ou solo rico em matéria orgânica, como agricultores, floristas, jardineiros e mineiros, além de laboratoristas (Carrada-Bravo, 1975; Cooper et al., 1992a; Hajjeh et al., 1997). Epidemias envolvendo grande número de pessoas ou amplas regiões geográficas são raras e têm sido relacionadas a uma fonte de infecção comum no ambiente. A maior epidemia conhecida de esporotricose foi registrada na África do Sul em trabalhadores de uma mina cujas madeiras estavam contaminadas pelo fungo (Quintal, 2000). Outra importante epidemia ocorreu nos Estados Unidos, sendo relacionada a um tipo de musgo contaminado por *S. schenckii* (Coles et al., 1992), sendo esta fonte de infecção confirmada por métodos moleculares de tipagem dos isolados clínicos e ambientais (Cooper et al., 1992b). Também nos Estados Unidos, uma microepidemia de esporotricose ocorreu através da contaminação de pessoas pelo feno estocado numa casa abandonada, onde se realizavam festas de “Halloween” (Dooley et al., 1997). Mais recentemente foi descrito na Austrália um aumento do número de casos de esporotricose, que por métodos moleculares ficou demonstrado ser relacionado à exposição ao fungo presente no feno (O’Reilly & Altman, 2006; Feeney et al., 2007).

No Brasil, a esporotricose foi primeiramente reportada em 1907 (Lutz & Splendore, 1907). Desde então, outros casos têm sido descritos, em especial no Rio Grande do Sul e em São Paulo (Freitas et al., 1965; Lopes et al., 1999). Uma revisão dos casos de esporotricose no Rio Grande do Sul entre 1967 e 2002 revelou um número de 304 casos de esporotricose, sendo 96% deles confirmados pelo isolamento de *S. schenckii* em cultura. Na maioria dos pacientes (75%) a infecção foi relacionada a exposição à matéria orgânica contaminada (Lopes et al., 1999). Não foi possível verificar transmissão zoonótica da esporotricose neste estudo. Entretanto, recentemente foi descrita transmissão zoonótica de esporotricose na Região Sul (Madrid et al., 2010). Também foi verificado que o número de casos de esporotricose nesse estado brasileiro estava diminuindo desde a década de 90 (Rosa et al., 2005), mas no período entre 2008 e 2010, foi observado um aumento considerável no número de casos de esporotricose na região (Madrid et al., 2012). Outro estudo realizado por inquérito epidemiológico com esporotriquina em Morro Velho, uma cidade do quadrilátero ferrífero em Minas Gerais, revelou positividade em 13,67% dos indivíduos submetidos ao estudo, embora *S. schenckii* não tenha sido isolado de nenhuma amostra de solo colhida na localidade

estudada (Rodrigues & Resende, 1996). Assim como no Sul do país, casos de esporotricose também foram evidenciados em um estudo realizado na região Norte, no período de 1973 a 1983 (Talhari et al., 1988).

O estado do Rio de Janeiro apresenta atualmente uma endemia de esporotricose, fato esse demonstrado inicialmente por Schubach e colaboradores (2005a, 2008) em um estudo realizado no período de 1998 a 2004. Nesse estudo foram diagnosticados em uma única instituição hospitalar 759 casos de esporotricose humana, 1.503 de esporotricose felina e 64 de infecção canina, onde em 83,4% dos casos de esporotricose humana os pacientes relataram terem tido contato com gatos com esporotricose (Schubach et al., 2008). Recentemente Silva e colaboradores (2012) realizaram uma atualização dos dados desta endemia, sendo reconhecidos 1.848 casos de esporotricose humana no estado do Rio de Janeiro, no período entre 1997 e 2007. Esta endemia difere das epidemias ocorridas em outros lugares do mundo por não serem transmitidas por uma fonte vegetal contaminada pelo fungo, mas sim por gatos domésticos infectados por *S. schenckii* (Hay & Morris-Jones, 2008). A endemia inicialmente concentrou-se em áreas menos favorecidas do estado do Rio de Janeiro, nos municípios da região metropolitana e, no município do Rio de Janeiro, principalmente nos bairros do subúrbio. A doença foi mais comumente observada em mulheres jovens que desenvolviam atividades no domicílio, proporcionando contato direto com os felinos domésticos. A forma cutâneo-linfática da doença foi a mais frequente, seguida das formas cutânea localizada e cutânea disseminada (Silva et al., 2012) O itraconazol (ITC) na dose de 100mg/dia foi eficiente para cura da esporotricose cutânea em 90% dos pacientes tratados, com boa tolerabilidade pelos pacientes e sem alterações laboratoriais importantes (Barros et al., 2011). Também foram descritas formas clínicas pouco comuns como envolvimento de mucosas nasal e conjuntival, isoladas ou associadas a formas cutâneas clássicas (Schubach et al., 2005a, 2008). Outro aspecto interessante foi o relato de manifestações de hipersensibilidade, descritas pela primeira vez relacionadas à esporotricose, como eritema nodoso, eritema multiforme e Síndrome de *Sweet* (Gutierrez-Galhardo et al., 2002, 2005; Freitas et al., 2012).

### **1.1.3. Patogenia**

O início da infecção pelo *Sporothrix* aquém dos linfonodos regionais nos seres humanos, geralmente ocorre após inoculação do fungo na pele por ocasião de um trauma com

espinhos, farpas, arranhadura e/ou mordedura de gatos, cães ou ainda por meio da contaminação pré-existente de solução de continuidade cutânea, alcançando o tecido cutâneo e subcutâneo (Jin et al., 1990; Marques et al., 1993; Madrid et al., 2012). Indivíduos que trabalham com solo ou plantas, tais como lavradores, jardineiros, agricultores, entre outros, são mais suscetíveis ao contato com este agente infectante, desenvolvendo essa micose com maior frequência. Os sítios de infecção habituais são os membros inferiores e superiores. A transmissão pode ocorrer também de forma menos comum, por meio da inalação de estruturas fúngicas, via trato respiratório superior, com possibilidade de consequente disseminação hematogênica. Quando inalado promove um quadro de pneumonite granulomatosa cavitária, podendo iniciar-se semelhante a um quadro de tuberculose (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Zancopé-Oliveira et al., 2011).

A esporotricose foi descrita em 1970 como uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos como: alcoólatras, diabéticos, portadores de malignidade hematológica, doença pulmonar obstrutiva crônica, transplantados utilizando drogas imunossupressoras e mais recentemente em indivíduos infectados pelo HIV (Lynch et al., 1970; Ramos-e-Silva et al., 2007; Freitas et al., 2012).

#### **1.1.4. Formas clínicas**

A esporotricose é uma micose de evolução subaguda ou crônica e clinicamente pode ocorrer com uma variedade de expressões clínicas, podendo ser dividida em quatro formas clínicas distintas (Ramos-e-Silva et al., 2007):

A forma linfocutânea é a mais comum e fácil de diagnosticar, respondendo por até 75% dos casos, dependendo da região geográfica. Geralmente as lesões são localizadas nas extremidades superiores e caracterizadas pelo aparecimento de uma lesão primária no local da inoculação após duas ou três semanas. Esta lesão pode ser ulcerada com uma base infiltrada ou papular, nodular, nódulo-ulcerativa, placa úlcero-gomosa ou vegetativa. A partir da lesão inicial, forma-se uma cadeia de nódulos indolores ao longo do trajeto dos vasos linfáticos, os quais podem tumefazer e ulceram com pequenos exsudatos. Geralmente, os linfonodos regionais não estão envolvidos, e não há alterações observadas na pele entre os linfonodos (Rippon, 1988). Eritema e infecção secundária podem estar presentes, mas a dor é geralmente leve (Gutierrez-Galhardo et al., 2002, 2005; Zancopé-Oliveira et al., 2011).

A forma cutânea fixa é o segundo tipo mais comum de esporotricose e contribui para aproximadamente 20% dos casos desta enfermidade. A lesão permanece confinada ao local de inoculação e os vasos linfáticos não estão envolvidos. As lesões são úlceras, placas verrucosas, ou placas infiltradas. Lesões satélites de pequeno porte são comuns e frequentemente observadas em crianças (Zancopé-Oliveira et al., 2011). As extremidades superiores e inferiores são os locais mais comuns de lesões, e as crianças apresentam um alto índice de lesões na face (Song et al., 2011). Assim como a forma linfocutânea, os pacientes com a forma cutânea fixa não apresentam sintomas sistêmicos. No entanto, se deixada sem tratamento, as lesões podem evoluir para um curso crônico, ou uma involução espontânea da lesão pode ocorrer (Zancopé-Oliveira et al., 2011).

A forma cutânea disseminada se apresenta com lesões nodulares, gomosas ou ulceradas disseminadas. Após a inoculação da pele, há disseminação hematogênica, que inicialmente apresenta lesões subcutâneas tumefeitas que podem ulcerar depois de semanas ou meses. Embora muito rara esta forma tem sido relatada em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) como a primeira manifestação desta síndrome (Al-Tawfiq & Wools, 1998; Freitas et al., 2012) e em pacientes submetidos a um longo curso de terapia com corticosteróides. A esporotricose cutânea disseminada é mais frequentemente observada, em até 16% dos casos, em pacientes imunocompetentes cuja transmissão do fungo ocorreu por meio de trauma determinado por gatos doentes, possivelmente por inoculações múltiplas do agente (Barros et al., 2004; Freitas et al., 2010).

A forma extracutânea aparece em menos de 5% dos casos e é a mais difícil de diagnosticar. Ela surge após a disseminação hematogênica do fungo, inalação de conídios, contato direto com uma lesão de pele ou inoculação direta em uma mucosa. Quaisquer órgãos ou tecidos podem ser afetados pela esporotricose extracutânea, e os sintomas são específicos para o órgão envolvido e acompanhados de febre e comprometimento geral em alguns casos (Zancopé-Oliveira et al., 2011). O envolvimento pode ser unifocal ou multifocal. Imunossupressão causada por doenças como diabetes, alcoolismo, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica e AIDS é comum nas formas pulmonar e nervosa (Rippon, 1988; Carvalho et al., 2002; Freitas et al., 2012).

### 1.1.5. Diagnóstico laboratorial da esporotricose

O diagnóstico da esporotricose é baseado no isolamento e identificação de seu agente causal, *S. schenckii*, de materiais biológicos (Know-Chung & Bennet, 1992; López-Romero et al., 2011; Zancopé-Oliveira et al., 2011). Para isso, devem ser empregados, concomitantemente, os exames diretos, onde preparações a fresco de espécimes clínicos tratados com hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou hidróxido de sódio (NaOH) a 4% são analisadas microscopicamente para a observação de células leveduriformes de *S. schenckii*, e o cultivo. O exame direto é de difícil leitura, uma vez que as células leveduriformes presentes em amostras clínicas são estruturas pequenas e escassas, exceto quando os espécimens biológicos são provenientes de gatos domésticos (Reed et al., 1993). Esfregaços de pus e “imprint” de biópsias de lesões coradas pelo Giemsa favorecem a visualização das formas infectantes. Em cortes histológicos a impregnação pela prata de Grocott, a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina-eosina (HE) são as técnicas imunohistoquímicas de escolha. Porém, a menos que o material esteja muito rico em estruturas fúngicas, não é fácil a observação das formas leveduriformes características de *S. schenckii* (Morris-Jones, 2002; Miranda et al., 2011). Geralmente, as formas leveduriformes têm aspecto variando do globoso a ovalado com brotamentos claveiformes, no interior de macrófagos e forma de “charuto”(Miranda et al., 2009). Em cerca de 40% dos casos onde o fungo é encontrado, nota-se a presença de corpo asteróide, substância eosinofílica de forma radiada constituída de complexo antígeno-anticorpo, que se deposita na parede de alguns fungos (Chandler et al., 1980; Morris-Jones, 2002).

O isolamento de *S. schenckii* é facilmente obtido através da semeadura do material clínico, que, em geral, é biópsia ou o pus da lesão, sem um tratamento prévio, em Ágar Sabouraud com cloranfenicol para evitar contaminação bacteriana, adicionado ou não de cicloheximida, droga que reduz a contaminação por alguns fungos saprófitos. Entre cinco a sete dias já é possível a observação do aparecimento de colônias filamentosas, hialinas com aspecto úmido. Com o tempo as colônias podem apresentar uma coloração escura no seu centro que vai aumentando centrifugamente ou permanece hialina. Na fase filamentosa, deve-se preparar um microcultivo em lâmina objetivando o estudo mais detalhado da microscopia das estruturas fúngicas. A presença de dois tipos de conídios: hialinos a marrons, de parede fina, em conidióforo do tipo simpodial e conídios escuros de parede espessa, dispostos ao logo

da hifa identificam a amostra como *S. schenckii* (Dixon et al., 1991; Zancopé-Oliveira et al., 2011).

A observação de crescimento de uma colônia miceliana com aspectos descritos acima é indicativa para a realização do teste de termo-conversão da colônia em meio de BHI ágar (Brain Heart Infusion Agar) com extrato de levedura. Para tanto, distribui-se um pequeno inóculo por toda a superfície do meio de cultura e incuba-se a 37°C por cinco dias. A colônia, após a conversão do fungo à levedura, assumirá um aspecto cremoso de cor bege amarelado (Morris-Jones, 2002; Criseo et al., 2008). As colônias de *S. schenckii* são urease negativas após sete dias, podendo tornam-se urease positivas ao décimo-quarto dia (Sigler et al., 1990). Esta característica no entanto, deve ser analisada com cautela, visto que estudos recentes verificaram variação na produção de urease (Marimon et al., 2007) e alta produção de urease após 4 dias de incubação em isolados do RJ (Almeida-Paes, 2012). *S. schenckii* em cultura à 37°C apresenta células leveduriformes hialinas, pequenas, globosas com um ou mais brotamentos claveiformes, tais como aquelas observadas no exame direto. A confecção de lâminas de *S. schenckii*, tanto na fase filamentosa como na leveduriforme, é feita com lactofenol-azul de algodão e estas são observadas em um microscópio óptico nos aumentos de 100 e 400X (Zancopé-Oliveira et al., 2011).

Para o estabelecimento do diagnóstico sorológico da esporotricose várias técnicas têm sido descritas. Reações de imunodifusão dupla com soro de pacientes com esporotricose subcutânea não apresentam reações cruzadas com leishmaniose e cromoblastomicose, doenças com manifestações clínicas semelhantes às da esporotricose (Casserone et al., 1983; Albornoz et al., 1984). O teste de imunoeletroforese apresenta alta sensibilidade, com a presença de um arco anódico, chamado arco S em todos os casos positivos (Albornoz et al., 1984). Os testes de aglutinação em tubo e em partículas de látex têm grande valor na pesquisa de anticorpos, demonstrando boa sensibilidade e especificidade (Karlin & Nielsen, 1970; Blumer et al., 1973; Casserone et al., 1983). Técnicas imunoenzimáticas também começaram a ser utilizadas no diagnóstico da esporotricose. As primeiras reações imunoenzimáticas (ELISA) descritas na literatura utilizaram um antígeno purificado de parede celular da forma leveduriforme (Bernardes-Engemann et al., 2005), e um extrato bruto de cultivo da forma filamentosa de *S. schenckii* (Almeida-Paes et al., 2007a). Ambas as técnicas demonstraram valores de especificidade e sensibilidade satisfatórios. Recentemente, Almeida-Paes e colaboradores

(2007b), descreveram que ELISA utilizando exoantígenos de *S. schenckii*. Essa técnica apresentou sensibilidade de 97%, especificidade de 89% e eficiência de 92%, estando associada com a detecção de três isotipos de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Dependendo do isotipo verificado existe uma variação da sensibilidade e a especificidade deste método para o diagnóstico da esporotricose. Fernandes e colaboradores (2011) realizaram um estudo comparando o antígeno purificado e o exoantígeno, cujos resultados demonstraram respectivamente, 90 e 96% de sensibilidade e 96 e 98% de especificidade, corroborando com os dados apresentados por Almeida-Paes e colaboradores (2007b).

#### **1.1.5.1 Métodos moleculares para o diagnóstico da esporotricose**

O diagnóstico baseado na amplificação das sequências gênicas de fungos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta poderosa para a identificação de micoses invasivas. A primeira PCR descrita para a identificação de *S. schenckii* lato sensu foi descrita por Kano e colaboradores (2001). Iniciadores baseados no gene codificador da *CHS 1* (quitina sintase 1) foram desenhados e a PCR foi capaz de detectar 10 pg de fragmento de DNA genômico de *S. schenckii*. Posteriormente essa metodologia foi utilizada para o diagnóstico molecular da esporotricose (Kano et al., 2005). Uma *nested* PCR para detecção de *S. schenckii* foi avaliada em amostras clínicas utilizando como alvo a região do gene 18S rRNA. Essa reação detectou DNA de *S. schenckii* em amostras de tecidos de animais infectados ou de amostras clínicas de pacientes com esporotricose, confirmados por cultura ou coloração histoquímica. O ensaio mostrou uma alta sensibilidade e especificidade, indicando que poderia permitir o diagnóstico rápido, com precisão suficiente para ser útil no diagnóstico de pacientes com esporotricose (Hu et al., 2003). Recentemente, esses iniciadores foram utilizados para detecção de DNA de *S. schenckii* em 38 cepas oriundas de diversas regiões geográficas do mundo, em amostras de tecido de camundongos infectados experimentalmente, biópsia de nove pacientes com esporotricose, duas cepas de *Ceratocystis minor*, e em 10 isolados de outros fungos patogênicos (Xu et al., 2010). Os autores demonstraram que a *nested* PCR identificou todas as cepas e amostras clínicas de *S. schenckii*, corroborando com os dados obtidos por Hu e colaboradores (2003), que relataram alta sensibilidade e especificidade dessa reação, sendo um método rápido para o diagnóstico da esporotricose em condições livres de contaminação (Xu et al., 2010). Outros estudos também relataram a metodologia da PCR para

o diagnóstico da esporotricose. Mendoza e colaboradores (2012) apresentaram uma evolução na metodologia da *nested* PCR descrita anteriormente por Hu e colaboradores em 2003. Entretanto, este estudo demonstrou que esta metodologia molecular apresentou baixa eficácia quando comparada com as metodologias convencionais de diagnóstico, como a cultura que é considerada “padrão ouro”. Liu e colaboradores (2012) relataram uma PCR em biópsia de tecido utilizando o *primer* para o gene codificador da *CHS*, S2-R2, apresentou reações positivas em 25 de 30 casos (83,3%). Esses *primers* também foram utilizados com sucesso para o diagnóstico da esporotricose felina, sem apresentar reações cruzadas com células da pele de gatos saudáveis ou infectados com outros fungos dimórficos (Kano et al., 2005). Contudo, estes estudos não permitiram a classificação em nível de espécie do complexo *Sporothrix*.

#### **1.1.5.2 Identificação molecular de espécies do complexo *Sporothrix***

Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos moleculares baseados na detecção de DNA para identificação de isolados fúngicos promoveu uma redução no tempo do diagnóstico, mantendo ou melhorando a especificidade, sensibilidade e precisão quando comparado à cultura fúngica. Poucos métodos moleculares têm sido aplicados na detecção de DNA de *S. schenckii* a partir de espécimes clínicos e na identificação de *Sporothrix* spp. em cultura. O estudo pioneiro utilizando a metodologia de detecção de DNA para o diagnóstico de infecções fúngicas foi relatado por Sandhu e colaboradores (1995), no qual os autores desenvolveram 21 *primers* específicos com alvo para a grande subunidade do rRNA de diversos fungos, incluindo *S. schenckii*. Os resultados apresentaram um alto nível de especificidade (Sandhu et al., 1995). Estudos prévios utilizando a análise do DNA mitocondrial têm apresentado heterogenicidade de perfis em cepas de *S. schenckii* (Suzuki et al., 1988; Takeda et al., 1991).

Diversos estudos taxonômicos moleculares utilizando diferentes metodologias, como a *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) de diferentes genes alvos, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), sequenciamento do DNA da região de transcrição interna do RNA ribossômico (ITS), PCR com alvo no gene da topoisomerase II, *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), e M13 PCR *fingerprinting* têm demonstrado que isolados de *S. schenckii* apresentam polimorfismos, sugerindo que poderiam não ser apenas uma espécie (Suzuki et al., 1988; Takeda et al., 1991; Lin et al., 1999; Ishizaki et al., 2000;



Mora-Cabrera et al., 2001; Watanabe et al., 2004; Kanbe et al., 2005; Neyra et al., 2005; Marimon et al., 2006; Zhang et al., 2006; Arenas et al., 2007).

Marimon e colaboradores (2007), baseados nos resultados de estudos anteriores citados acima, descreveram por meio da combinação de características fenotípicas e genotípicas, quatro espécies relacionadas de *S. schenckii*: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, e *S. mexicana*. *S. globosa* com distribuição mundial (Madrid et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Cruz et al., 2012), enquanto *S. mexicana* sendo restrita ao México e *S. brasiliensis* ao Brasil (Marimon et al., 2007). Entretanto, um caso de esporotricose humana causada por *S. mexicana* foi relatado por Dias e colaboradores (2011) em Portugal. A ferramenta molecular proposta para diferenciação destas espécies estreitamente relacionadas foi o sequenciamento parcial do gene da calmodulina (CAL) (Marimon et al., 2007). Nesse estudo foi proposta uma chave de identificação para o complexo *Sporothrix* (Marimon et al., 2007, 2008b), que inclui a análise morfológica de conídios, auxonograma, genotipagem através de amplificação por PCR, e sequenciamento parcial do gene da CAL. Baseado nesse último estudo, Romeo e colaboradores (2011) analisaram a filogenia molecular e epidemiologia das espécies de *Sporothrix* isoladas na Itália, demonstrando 26 cepas ambientais identificadas como *S. albicans*, e dois isolados clínicos como *S. schenckii* sensu stricto. A análise filogenética baseada no rDNA e no gene da  $\beta$ -tubulina de *S. albicans*, *S. pallida* e *S. nivea* revelou semelhança significativa entre as espécies, sendo proposto que as três espécies deveriam ser classificadas como *S. pallida*. Os autores demonstraram também que a análise da sequência parcial da  $\beta$ -tubulina é recomendada em estudos taxonômicos de espécies *Sporothrix* isoladas do ambiente (de Meyer et al., 2011). A análise do sequenciamento parcial da  $\beta$ -tubulina, permitiu a descrição mais detalhada de outras duas espécies de *Sporothrix* ambientais: *S. brunneoviolacea* e *S. dimorphospora* (Madrid et al., 2010).

## **1.2 - O gênero *Sporothrix***

### **1.2.1. Sistemática**

Infecções fúngicas invasivas por leveduras e fungos filamentosos são significantes causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com comprometimento do sistema imune e hospitalizados sob procedimentos invasivos. Com isso, a rápida identificação dos agentes etiológicos isolados de espécimes clínicos é particularmente importante. Neste sentido, a

sistemática e seu principal constituinte, a taxonomia dos fungos patogênicos, possui grande importância uma vez que a posição exata dos fungos na classificação informa as características do microorganismo, permitindo encaminhar, com maior confiabilidade, o melhor esquema terapêutico ou profilático a ser utilizado.

Os estudos taxonômicos em micologia iniciaram-se oficialmente no ano de 1753 em estudos de Linnaeus, onde foi proposto o sistema binomial de nomenclatura. Christian Hendrich Persoon e Elias Magnus Fries, conotativamente denominados “pais da micologia”, propuseram a hipótese de ocorrência de relação entre todos os níveis da sistemática taxonômica. Juntamente com os demais taxonomistas do século XVIII, promoveram um sistema de classificação estruturado no estudo da morfologia comparativa. Nesse sistema proposto baseou-se a classificação de espécies e gênero. Poucos sistemas foram propostos em substituição aos já implementados no século XIX, sendo o que mais se destacou foi o da hipótese filogenética por arranjo numérico e a associação de maior quantidade de características. Dentre os taxonomistas que a desenvolveram temos Pier Andrea Saccardo, o qual foi responsável pela inserção de características primordiais na classificação dos fungos como a observação da coloração, forma e da presença de septos; características essas que segundo o autor deveriam ser catalogadas. A contribuição de Saccardo a taxonomia fúngica foi considerada adversa pelas próximas gerações de micologistas chegando a ser taxada como inoperante (Korf, 2005). A quimiotaxonomia foi também utilizada na sistematização, mas com poucos adeptos e promovendo surpresa entre os não envolvidos nesse sistema.

O’ Hara (1997) apresentou uma visão resumida e muito didática da sistemática no século XX realizando a divisão da mesma em dois períodos: população sistemática implementada entre os anos de 1930 e 1940 e da sistemática filogenética a qual foi iniciada em 1960 e continua sendo utilizada durante todos os anos até o presente.

Historicamente, a classificação dos fungos primeiramente se baseou em dois principais eixos: fenótipo o qual inclui todas as características que possam ser vistas ou medidas diretamente à partir do microorganismo, como por exemplo, produção de metabólitos secundários, e bem utilizada na taxonomia de fungos filamentosos (Frisvad, 1998); ecologia e fisiologia tal como características de crescimento sobre diferentes substratos (Frisvad, 1998; Frisvad & Samson, 2004), muito eficiente na classificação de leveduras. Com o transcorrer do

tempo um terceiro eixo foi introduzido para delimitação de espécie, onde o genoma do fungo reflete a herança genética (filogenia) (Guarro et al., 1999; Taylor et al., 2000). A classificação baseada na filogenia pode ser utilizada em todos microorganismos. Entretanto, uma grande parte do genoma pode ser muito similar entre alguns gêneros, e a escolha do gene correto implicará na determinação de espécie. Todas as três formas de classificação estão fortemente inter-relacionados e algumas vezes redundantes, mas igualmente importantes na descrição, entendimento e classificação de espécies (Smedsgaard & Nielsen, 2004).

A definição de espécies fúngicas não apresenta um consenso entre os micologistas. Atualmente os conceitos de espécie mais comumente utilizados na classificação são:

1. O conceito morfológico ou fenotípico ou de fenótipo é clássico, sendo baseado na descrição das características morfológicas ou outras características fenotípicas, como termotolerância, produção de metabólitos secundários, presença de pigmento, entre outros (Taylor et al., 2000).

2. O conceito ecológico que se baseia na adaptação dos organismos ao habitat e na reprodução isolada, apresentando grande aplicabilidade na classificação de fungos patógenos de plantas (Davis, 1995).

3. O conceito biológico, o qual define espécie como populações que se reproduzem entre si produzindo uma progênie viável e são isoladas reprodutivamente dos outros grupos (Kwon-Chung & Varma, 2006). Este também está fundamentado nas variações genéticas entre espécies com possível compartilhamento de genes e na presença de barreiras quanto a essa “troca de genes” (Davis, 1995; Taylor et al., 2000).

4. O conceito filogenético que define espécie como o menor agrupamento de indivíduos interconectados por relações genéticas (Taylor et al., 2000).

Todos estes conceitos apresentam vantagens e desvantagens na classificação de fungos. Smedsgaard & Nielsen (2004) propuseram um simplificado e prático modelo para “conceito de espécie”, o qual engloba a combinação de caracteres fenotípicos juntamente com os aspectos relacionados ao ambiente (ecologia) e suas características hereditárias (filogenia ou genoma).

A inserção de conceitos de biologia molecular fundamentados principalmente na análise de sequências nucleotídicas do DNA possibilitou o acesso a novas informações sobre os isolados caracterizados. Estudos de morfo-espécies ou de morfologia das espécies estão

empregando a associação de variáveis biológicas e filogenéticas, sendo um dos grandes questionamentos enfrentados pelos morfologistas a decisão de quantas diferenças são necessárias para a definição de espécies diferentes. Segundo Guarro e colaboradores (1999), a aplicação do conceito filogenético de espécies tem parcialmente respondido ao questionamento dos morfologistas quando esse conceito é fundamento na análise cladística de características moleculares, o que permite bases estruturadas na realização do delineamento das espécies. A utilização do cladograma determina a existência de grupos monofiléticos, os quais podem ser classificados como espécies ou subespécies.

### **1.2.2. Filogenia do gênero *Sporothrix***

Inicialmente, o agente etiológico da esporotricose era apenas *S. schenckii*, um fungo dimórfico, que pode ser encontrado no meio ambiente na forma filamentosa, tendo como habitat natural vegetação, madeira em decomposição e solo. *S. schenckii* está inserido no Reino Fungi, sendo um organismo eucariótico, heterotrófico, sem mobilidade própria, com parede celular quitinosa e rígida, constituinte da Divisão *Ascomycota*, da Classe *Pyrenomycetes*, Ordem *Ophiostomatales* e Família *Ophiostomataceae* (Guarro et al., 1999). Recentemente, Marimon e colaboradores (2007) sugeriram que *S. schenckii* não deveria ser considerada a única espécie causadora da esporotricose, uma vez que através da combinação de características fenotípicas e genéticas, uma chave de identificação foi desenvolvida. Esses autores propuseram a criação de três novas espécies: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (Tabela 1), sendo essas associadas às demais espécies já existentes *S. schenckii* e *S. albicans*, recentemente renomeada como *S. pallida* (de Meyer et al., 2008). A espécie *S. pallida* apresenta uma característica peculiar que é a presença apenas de conídios hialinos.

Marimon e colaboradores (2007) realizaram estudos fenotípicos incluindo morfologia de conídios em meio Ágar Corn Meal à 30°C por 10 a 12 dias, teste de crescimento à 30°C do isolado em meio de ágar batata (PDA) incubado por 21 dias, teste de crescimento à 37°C do isolado em meio PDA incubado por 21 dias e auxonograma utilizando os açúcares rafinose e sacarose conforme chave de identificação proposta.

**Tabela 1. Chave de identificação de espécies do Gênero *Sporothrix***  
**Fonte: Adaptado de Marimon et al., 2007; p.3206**

| Espécie               | Conídio<br>sésil e<br>demáceo | Diâmetro de colônia<br>>50 mm* | Termotolerância<br>37°C | Assimilação de açúcar |          |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------|
|                       |                               |                                |                         | Sacarose              | Rafinose |
| <i>S. albicans</i>    | Não                           | Sim                            | Sim                     | +                     | -        |
| <i>S. bmsiliensis</i> | Sim                           | Não                            | Sim                     | -                     | -        |
| <i>S. globosa</i>     | Sim                           | Não                            | Não                     | +                     | -        |
| <i>S. mexicana</i>    | Sim                           | Sim                            | Sim                     | +                     | +        |
| <i>S. schenckii</i>   | Sim                           | Não                            | Sim                     | +                     | +        |
| <i>S. luriei</i>      | Não                           | Sim                            | Sim                     | -                     | -        |

\* Diâmetro obtido após crescimento fúngico em PDA após incubação por 21 dias a 30°C

Já no estudo genotípico, a PCR foi utilizada com as sequências iniciadoras CL1 e CL2A, as quais são oriundas do gene da calmodulina. Posteriormente, o mesmo grupo sugere que *S. schenckii* var. *luriei* deveria, também, ser considerada uma nova espécie (Marimon et al., 2008) após estudos baseados na mesma metodologia proposta anteriormente (Marimon et al., 2007).

Até o presente não se conhece a forma de reprodução sexuada de *S. schenckii*, e dos outros fungos pertencentes ao complexo, embora haja fortes evidências moleculares de que estes fungos sofram mecanismos de recombinação na natureza (Mesa-Arango et al., 2002). Recentemente a análise filogenética dos fragmentos do gene *MAT1-2* em *Ophiostoma himal-ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*, *Ophiostoma ulmi* e *S. schenckii* demonstrou o agrupamento dos isolados de *S. schenckii* e das três espécies de *Ophiostoma* em clados distintos, segundo Kano e colaboradores (2013). Sendo que avaliando as sequências de aminoácidos do gene *MAT 1-2*, observaram aproximadamente 70% de similaridade entre as regiões conservadas de *S. schenckii* e *O. himal-ulmi*, indicando ser relativamente elevada a similaridade entre as espécies. Entretanto, a análise do gene *MAT-1-1* de *S. schenckii* não foi realizada, sendo necessária uma análise mais aprofundada do gene *MAT1-1* de *Sporothrix* tanto para a sua classificação filogenética quanto para a descoberta de seu teleomorfo (Kano et al., 2013).

Estudos demonstram que *S. schenckii* e as demais espécies do complexo são ascomicetos, uma vez que apresentam septo simples, com corpúsculos de Woronin (Smith & Batenburg-van der Vegte, 1985) e três genes de quitina sintase (Chua et al., 1994). Análises moleculares da região 18S do DNA ribossomal mostraram evidências indiretas de que a forma

sexuada deste fungo pudesse ser *Ophiostoma stenoceras* (Berbee & Taylor, 1992). Porém, estudos morfo-fisiológicos mostram diferenças básicas entre as duas espécies: *O. stenoceras* é incapaz de produzir conídios demáceos, conforme todos teleomorfos, ao contrário de *S. schenckii*, um anamorfo, não produzindo peritécio em meios de batata, arroz ou malte, como acontece com os isolados de *O. stenoceras* (Dixon et al., 1991; O'Reilly & Altman, 2006). As diferenças também são demonstradas quando ambas espécies são inoculadas em camundongos, pois *S. schenckii* é encontrado em diversos tecidos após inoculação intravenosa, o que não ocorre com *O. stenoceras*, que somente é encontrado em determinados órgãos e nunca em todos os animais inoculados (Dixon et al., 1992). Tais observações levaram a considerar como espécies diferentes o anamorfo de *O. stenoceras* (*Sporothrix* spp.) e *S. schenckii*. Outros estudos moleculares (Berbee & Taylor, 1992; Hintz, 1999) reforçam, entretanto, que a forma teleomórfica do patógeno *S. schenckii* pertença ao gênero *Ophiostoma*.

### 1.2.3. Morfologia e Fisiologia

Os fungos classificados dentro do gênero *Sporothrix* são de caráter dimórfico; em vida saprofítica ou em cultivo a 25°C apresentam-se na forma filamentosa, como hifas hialinas, septadas, ramificadas, com conídios unicelulares de dois tipos: hialinos a castanhos (demáceos). Os conídios hialinos são pequenos, ovóides, surgindo de denticulos distintos na porção apical dos conidióforos. Já os conídios demáceos são grandes, ovóides, com parede celular espessa, sendo observados ao longo de toda a extensão das hifas (St-Germain & Summerbell, 1996). Os conídios não possuem a propriedade de realizar a formação de cadeias (Sigler et al, 1990). A macroscopia da colônia nesta fase evolutiva do fungo se apresenta inicialmente de cor branca e gradativamente, ao formar conídios escuros, assume coloração marrom a negra. Em parasitismo, ou a partir de espécimes clínicos sob cultivo à 37°C em meio de cultura apropriado, *S. schenckii* se apresenta como leveduras unicelulares ovaladas, globosas e em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos (Chandler et al., 1980; Ramos-e-Silva et al., 2007; López-Romero et al., 2011; Zancopé-Oliveira et al., 2011). Macroscopicamente a colônia de *S. schenckii* a 37°C apresenta coloração bege amarelada e aspecto cremoso (Morris-Jones, 2002; Criseo et al., 2008; López-Romero et al., 2011; Zancopé-Oliveira et al., 2011).

Poucos são os trabalhos referidos na literatura especializada sobre as características fisiológicas de *S. schenckii*. Gosh e colaboradores (2002) analisaram e compararam 49 isolados de *S. schenckii* de três regiões da Índia e observaram que as mesmas não apresentaram variação na morfologia em três diferentes meios de cultivo. Além disso, o crescimento de todos os isolados foi inibido a 40°C, com crescimento ótimo entre 30 e 37°C. As leveduras se mostraram mais tolerantes à pressão osmótica que a forma filamentosa, crescendo em três dias, em meio contendo 20% de glicerol, e 10 isolados apresentaram tolerância em 30% de glicerol. Na fase miceliana todos os isolados cresceram lentamente em meio com 20% de glicerol, e nenhum cresceu na concentração de 30%. Houve crescimento de todos os fungos na fase leveduriforme em meios acrescidos de NaCl a 9%; já em concentrações mais elevadas somente 24% dos isolados estudadas foram tolerantes. A forma filamentosa não foi capaz de crescer na presença de uma concentração salina acima de 7%. O crescimento ótimo da forma miceliana foi visto no pH entre 3,0-11,5, entretanto, algumas amostras foram tolerantes ao pH de 12,5. Por outro lado, leveduras cresceram bem em uma faixa de pH entre 3,0-8,5, mas alguns isolados puderam crescer mesmo em pH 2,0. Variações no padrão de assimilação de carboidratos foram observadas em isolados de diferentes áreas geográficas. Todos os isolados assimilaram adonitol, celobiose, frutose, galactose, glicose, glicerol, maltose, manose, sorbitol, sacarose, trealose e xilose e nenhuma foi capaz de assimilar inositol, lactose e dulcitol. Os isolados do norte da Índia não assimilaram ramnose e os do oeste não assimilaram amido. Todos os isolados do sul da Índia assimilaram rafinose e dextrose. Apenas a forma filamentosa pôde degradar a uréia após 96 horas de incubação. O teste de fenol oxidase foi positivo para todos os isolados. Tanto a fase leveduriforme quanto a miceliana de todos os isolados puderam assimilar KNO<sub>3</sub>. Nenhum dos isolados hidrolisou caseína ou apresentou atividade de gelatinase (Gosh et al., 2002).

Mais recentemente, alguns autores descrevem as características fisiológicas de cepas de *S. schenckii* preservadas em água e por repiques sucessivos (Mendonza et al., 2005), onde observou-se alterações na capacidade de liquefazer gelatina, bem como na degradação de amido.

#### 1.2.4. Fatores de virulência

Seres humanos estão constantemente expostos a diferentes microorganismos, entre eles, os fungos, mas somente um número limitado entre os últimos pode causar doença. Com isso, a patogenicidade não é uma característica estável na maioria dos fungos. Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência destes microorganismos têm sido descritos na literatura especializada. Alguns destes fatores são bem determinados como: parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, como a produção de fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro, a capacidade de fazer “switch” a várias vias metabólicas que são fundamentais para a sobrevivência intracelular, a termotolerância (capacidade de crescer a 37°C) a qual é pré-requisito para disseminação hematogênica. Fungos dimórficos, entre eles *S. schenckii*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (Hogan et al., 1996).

Os fatores de virulência de *S. schenckii* são pouco conhecidos devido à escassez de estudos. Steenbergen e colaboradores (2004) sugerem que a origem da virulência esteja relacionada às relações intermicrobianas existentes no habitat natural de *S. schenckii*, sendo demonstrado por esses autores que as células leveduriformes, quando fagocitadas por *Acanthamoeba castellanii*, são capazes de sobreviver em seu interior, matar a ameba e a utilizam como nutriente. Estas relações também são observadas em outros fungos dimórficos patogênicos, como o *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Cryptococcus neoformans*. Entretanto essa característica não é compartilhada por fungos patogênicos que não possuem o solo como seu habitat primário como, por exemplo, *Candida albicans*, ou por fungos não patogênicos como *Saccharomyces cerevisiae* (Steenbergen et al., 2004; Malliaris et al., 2004).

Um dos principais fatores de virulência associado ao *S. schenckii*, assim como a outros fungos patogênicos, é a termotolerância. Os isolados que são capazes de crescer a 35°C, mas incapazes de realizá-lo a 37°C não promovem lesões linfangíticas, limitando-se a infecções cutâneas fixas. Já os isolados oriundos de lesões linfangíticas, disseminadas e extracutâneas apresentam tolerância e crescimento a 37°C (Kwon-Chung & Bennet, 1992). Recentes estudos demonstraram que os isolados de *S. schenckii* provenientes da Colômbia, onde a forma clínica predominante da esporotricose é a cutânea fixa, apresentaram alta taxa



de inibição do crescimento entre 35 a 37°C, ao contrário de cepas do México e da Guatemala, onde as formas linfangíticas predominam (Mesa-Arango et al., 2002).

Tem sido amplamente discutido que a melanina pode atuar como fator de virulência em vários fungos patogênicos. *S. schenckii* é capaz de sintetizar melanina, e, portanto, poderia ser outro fator de virulência apresentado pelo mesmo (Jacobson, 2000). A produção de melanina nos conídios de *S. schenckii* ocorre por meio da via do 1,8-diidroxinaftaleno penta acetato (Romero-Martinez et al., 2000). Embora macroscopicamente somente a forma filamentosa do fungo pareça ser melanizada, posteriormente foi demonstrada a produção de melanina por *S. schenckii* também nas formas leveduriformes, tanto *in vitro* como durante a infecção. Porém, as hifas não são capazes de sintetizar melanina, somente os conídios (Morris-Jones et al., 2003). Foi demonstrado que a melanização dos conídios torna-os mais resistentes à fagocitose por macrófagos, o que favoreceria a instalação da infecção, já que estas são as partículas infectantes do fungo (Romero-Martinez et al., 2000).

Almeida-Paes e colaboradores (2009) em diferentes meios de cultura demonstraram que vários isolados foram capazes de produzir mais melanina em meio adicionado de L-DOPA. Por esse motivo, foram estudadas partículas de melanina obtidas de isolados cultivados na presença ou na ausência deste composto fenólico. Esses resultados foram pioneiros em demonstrar que diversas espécies de *Sporothrix* são capazes de utilizar L-DOPA para aumentar sua síntese de melanina (Almeida-Paes et al., 2009), em especial pelo fato de isolados albinos na ausência deste composto produzirem colônias pigmentadas em Meio Mínimo (MM) suplementado com L-DOPA. As partículas de melanina geradas dessas culturas são mais escuras que as isoladas do fungo cultivado em MM e uma atividade semelhante à lacase foi verificada entre proteínas citoplasmáticas de ambas as morfologias deste fungo. Anteriormente observações de uma atividade de fenoloxidase em isolados de *Sporothrix* através do crescimento de colônias negras em meio de Staib foi descrita por Ghosh e colaboradores, porém sem distinguir entre melanina DHN e melanina derivada de compostos fenólicos. A possível utilização de compostos fenólicos exógenos na síntese de melanina por *S. schenckii* também já havia sido previamente sugerida (Morris-Jones et al., 2003) e os resultados deste estudo demonstraram claramente este fato. Posteriormente um estudo de Teixeira e colaboradores (2010), demonstrou que a produção de melanina a partir de L-DOPA foi associada à virulência de *S. schenckii*.

Recentemente, Almeida-Paes e colaboradores (2012b) demonstraram a produção de piomelanina na presença de tirosina pelas espécies do complexo *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*, estando esse pigmento envolvido na virulência dos microrganismos e na sobrevivência a diferentes condições ambientais.

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

---

A esporotricose é a doença fúngica subcutânea com alta prevalência na cidade do Rio de Janeiro nos últimos anos, ocorrendo um aumento no número de casos diagnosticados em humanos, no IPEC, de 13 entre 1987 a 1997, de 759 casos entre o período de 1998 a 2004, para 1.848 casos humanos entre 1997 e 2007 (Barros et al., 2001; Schubach et al., 2008; Silva et al., 2012). Nesta epidemia, um amplo espectro clínico tem sido observado. A forma predominante de apresentação clínica é a cutânea clássica. Entretanto, apresentações consideradas raras como lesões cutâneas com múltiplas localizações (16,3%) e envolvimento das mucosas conjuntival (2,8%) e nasal foram observadas (Schubach et al., 2005b; Barros et al., 2004). Neste sentido, associações como eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo et al., 2002), Síndrome de Sweet (Freitas et al., 2012) e eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo et al., 2005) foram descritas pela primeira vez. Provavelmente, a transmissão zoonótica em contraste com a via clássica da infecção por *Sporothrix*, onde material de solo e planta carregado com hifas saprofíticas do patógeno são a fonte de contaminação, a transmissão de *Sporothrix* spp. por gatos para outros gatos e seres humanos por meio da inoculação direta de células leveduriformes exibindo uma riqueza parasitária, deve estar influenciando estas formas de apresentação clínica.

O diagnóstico e tratamento precoces de qualquer sítio extracutâneo sem dúvida trará um melhor prognóstico para o paciente. Acreditamos que fatores relacionados à forma de transmissão ao hospedeiro, à virulência do fungo e às características das diferentes espécies do complexo *Sporothrix* possam estar relacionados à diversidade clínica vista nesta epidemia (Zancopé-Oliveira et al., 2011).

As lesões cutâneas do gato com esporotricose apresentam alta carga parasitária e constituem uma fonte de potencial zoonótico (Schubach et al., 2002; Schubach et al., 2003), transmitindo o fungo na ausência de trauma, como observado em 35,5% dos casos descritos no IPEC/Fiocruz (Barros et al., 2004). Sendo as principais formas de transmissão zoonótica por meio da arranhadura ou mordedura de gatos doentes. É provável que o contato estreito com o gato doente no ambiente domiciliar promova repetidas exposições ao *S. schenckii*, possibilitando repetidas inoculações, podendo acarretar em hipersensibilização do hospedeiro

ao fungo (Gutierrez-Galhardo et al., 2002). Entretanto, estas questões ainda não foram confirmadas.

Nosso grupo tem se voltado para a caracterização fenotípica e genotípica de *Sporothrix* spp. isolado na epidemia do Rio de Janeiro. Recentemente, foram demonstrados alguns padrões fenotípicos e genotípicos dos isolados de *S. schenckii* provenientes da epidemia do Rio de Janeiro (Reis et al., 2004, Oliveira et al., 2011), associados a manifestações clínicas raras da esporotricose e sua correlação com as diferentes formas clínicas (Gutierrez-Galhardo et al., 2008). Nossos dados sugerem uma fonte comum de infecção, bem como corroboram dados recentemente publicados (Marimon et al., 2008), onde isolados provenientes desta epidemia são mais suscetíveis aos antifúngicos utilizados na rotina clínica. Com isso, estudos fenotípicos e genotípicos têm nos permitido e nos permitirão esclarecer aspectos ainda obscuros relacionados à taxonomia, fisiologia e patogenia de espécies do complexo *Sporothrix*, agente etiológico da epidemia da esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Uma nova abordagem realizando a comparação da sensibilidade e especificidade entre método de caracterização fenotípica e genotípica das espécies do complexo *Sporothrix*, assim como a análise de fenótipos e genótipos entre *Sporothrix* spp. obtidos no estado do Rio de Janeiro com isolados de outras regiões geográficas; são propostas neste estudo. Com a descrição do complexo *Sporothrix*, surgiu também uma importante questão que seria a obtenção de uma metodologia rápida e eficaz para identificação e tipagem das espécies deste complexo.

Acreditamos que as observações adquiridas contribuíram, portanto, para um maior entendimento do agente infectante nesta endemia de esporotricose fornecendo dados mais significativos para o desenvolvimento e aplicação de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos adequados. Estes conhecimentos também nos permitirão explorar a relação parasita-hospedeiro, bem como serão úteis no desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos de diagnóstico.

### 3.1. Geral

Nosso principal propósito foi realizar a análise filogenética por meio de taxonomia clássica e molecular das espécies do complexo *Sporothrix* provenientes de diferentes regiões geográficas, e desenvolver metodologias moleculares para a identificação das espécies do complexo.

### 3.2. Específicos

1. Comparação entre método de caracterização fenotípica e genotípica das espécies do complexo *Sporothrix*;
2. Comparação de fenótipos e genótipos entre *Sporothrix* spp. obtidos no estado do Rio de Janeiro com isolados de outras regiões geográficas;
3. Inclusão de nova metodologia baseada em ácidos nucleicos para caracterização de espécies do complexo *Sporothrix*;
4. Determinação do perfil proteômico do complexo *Sporothrix*, utilizando metodologia baseada em espectrometria de massa.

Comparação entre método de caracterização fenotípica e genotípica das espécies do complexo *Sporothrix*.

Neste capítulo, apresentamos dois estudos, onde 246 isolados clínicos e um ambiental obtidos da epidemia de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro, foram identificados por taxonomia polifásica.

A esporotricose aumentou significativamente no Brasil na última década, particularmente no estado de Rio de Janeiro, com a ocorrência de uma epidemia, sendo esta relacionada com a transmissão zoonótica de gatos naturalmente infectados para os seres humanos. Recentemente, quatro novas espécies filogenéticas (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. pallida* e *S. mexicana*) foram incorporadas ao complexo *Sporothrix* com base nas suas características fenotípicas e molecular. No primeiro estudo, descrevemos a caracterização de 246 isolados obtidos de pacientes atendidos no Laboratório de Dermatologia Infecçiosa, IPEC - FIOCRUZ, entre 1998 e 2008, juntamente com uma amostra ambiental. Fenotipicamente, 206 amostras (83,4%) foram caracterizadas como *S. brasiliensis*, 15 (6,0%) como *S. schenckii*, e uma (0,5 %) como *S. mexicana*. Vinte e cinco amostras (10,1%) não puderam ser identificadas de acordo com o seu fenótipo e foram classificadas como *Sporothrix* spp.. O sequenciamento parcial do gene da calmodulina foi realizado para confirmar a identidade destes isolados. A análise molecular demonstrou que 24 dos isolados classificados como *Sporothrix* spp. eram *S. brasiliensis*, e o outro isolado foi classificado como *S. globosa*. Este isolado de *S.globosa* foi o primeiro descrito no Brasil e o mesmo apresentava perfil fenotípico atípico quando comparado à chave de identificação proposta por Marimon e colaboradores (2007). O isolado fenotipicamente caracterizado como *S. mexicana* ficou agrupado no clado de *S. schenckii*, demonstrando a partir das análises desses dados a importância da correlação entre dados moleculares e fenotípicos para a identificação das espécies do complexo *Sporothrix*.

## Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* Isolates from an Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil

Manoel Marques Evangelista Oliveira · Rodrigo Almeida-Paes ·  
Mauro Medeiros Muniz · Maria Clara Gutierrez-Galhardo ·  
Rosely Maria Zancope-Oliveira

Received: 26 January 2011 / Accepted: 30 May 2011 / Published online: 24 June 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** Sporotrichosis has significantly increased in Brazil in the last decade, particularly in the state of Rio de Janeiro, with the occurrence of an epidemic related to zoonotic transmission from cats to humans. Recently, four new phylogenetic species were incorporated into the *Sporothrix* species complex based on the phenotypic and molecular characteristics, and a new species name (*Sporothrix brasiliensis*) was proposed for some of the *Sporothrix* isolates from this epidemic. This study describes the characterization of 246 isolates obtained from patients attending the Laboratory of Infectious Dermatology, IPEC-FIOCRUZ, between 1998 and 2008, together with one environmental sample. Two hundred and six of the isolates (83.4%) were characterized as *S. brasiliensis*, 15 (6.0%) as *S. schenckii*, and one (0.5%) as *S. mexicana*. Twenty-five isolates (10.1%) could not be identified according to their phenotype and were classified as *Sporothrix* spp. The calmodulin gene was sequenced to confirm the identity of these

isolates. The molecular analysis demonstrated that 24 of the isolates were *S. brasiliensis*, with the remainder being a *S. globosa* isolate. The isolate characterized phenotypically as *S. mexicana* was clustered on the *S. schenckii* clade. The correlation between molecular data and phenotypic characteristics described in this study is fundamental to the identification of the *Sporothrix* complex.

**Keywords** *Sporothrix* species complex · Sporotrichosis · Rio de Janeiro · Calmodulin gene · Identification · Taxonomy

### Introduction

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis with a global distribution, with areas of high endemicity in Latin America [1–3]. This infection is caused by the dimorphic fungus previously described as the single species *Sporothrix schenckii*, which is associated in the environment with plants and soil [4]. In humans, sporotrichosis is a disease that usually occurs in the form of isolated cases or small outbreaks, involving people exposed to plants or soil rich in organic matter such as farmers, florists, gardeners and miners, and occasionally laboratory technicians [5, 6].

Pathogenic fungi of the genus *Sporothrix* are dimorphic; in the environment or when cultured in the

M. M. E. Oliveira · R. Almeida-Paes ·  
M. M. Muniz · R. M. Zancope-Oliveira (✉)  
Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica  
Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,  
RJ 21045-900, Brazil  
e-mail: rosely.zancope@ipecc.fiocruz.br

M. C. Gutierrez-Galhardo  
Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia  
Infecciosa, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas,  
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

laboratory at 25–30°C, in the filamentous form they present as hyaline, septate, branched hyphae with single-celled conidia of two types—hyaline and brown (dematiaceous). The hyaline conidia are small, ovoid and usually occur in the apical portion of conidiophores. The dematiaceous conidia are large and ovoid, with a thick cell wall and are present along the entire length of the hyphae [7]. Macroscopically, filamentous *S. schenckii* colonies are initially white and gradually become brown to dark black, as conidia are produced by the fungus [8]. In contrast, in the parasitic phase or when cultured in appropriate culture media at 35–37°C, *S. schenckii* appears as cigar-shaped oval yeast cells that may have one or more buds [9, 10]. Macroscopically colonies of *S. schenckii* grown at 37°C have a yellowish-beige color with a creamy aspect [11, 12].

Rio de Janeiro State in Brazil is an epidemic area for sporotrichosis; thus, in a study conducted from 1998 to 2004, Schubach and co-workers [13, 14] identified 759 cases of human sporotrichosis, 1,503 of feline sporotrichosis, and sixty-four cases of canine *S. schenckii* infection. 83.4% of the human infections were associated with prior contact with cat sporotrichosis cases [14]. This differs from other worldwide sporotrichosis outbreaks that have been associated with infection via a plant source containing the fungus, rather than by domestic cats infected with *S. schenckii* [14, 15]. In the Rio de Janeiro outbreak, the cutaneous-lymphatic form of the disease was most common, followed by localized and disseminated cutaneous forms. Uncommon manifestations of the disease involving nasal and conjunctival mucosa [13, 14] as well hypersensitivity manifestations, such as erythema nodosum and erythema multiform [16, 17], were also noted.

Marimon et al. [18] have recently suggested on the basis of a combination of phenotypic and genetic features that *S. schenckii* should not be considered a single taxon, which causes sporotrichosis, and have identified three new species, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*. *S. globosa* has been defined as having a worldwide distribution [19, 20], whereas *S. mexicana* is apparently restricted to Mexico, and *S. brasiliensis* to Brazil. Recent work by the same group has also suggested that *S. schenckii* var. *luriei* should be promoted to a new species, *S. luriei* [21]. Additionally, other phylogenetic analysis based on rDNA and  $\beta$ -tubulin regions from *S. albicans*, *S. pallida*, and *S. nivea* revealed a significant similarity, and there is a proposition that

all the three species were called as *S. pallida*, the first of three species first described [22]. An identification key for the *Sporothrix* complex has now been proposed [18] that includes analysis of conidial morphology, auxonogram analysis using raffinose and sucrose, and genotyping via polymerase chain reaction (PCR) amplification of the calmodulin gene. Based on this last analysis, Romeo and collaborators (2011) studying the molecular phylogeny and epidemiology of *S. schenckii* species complex isolated in Italy demonstrated that twenty-six environmental strains co-clustered with *S. albicans*, and two clinical isolates grouped with *S. schenckii stricto sensu* [24].

The objective of this study was characterizing, at the species level, *Sporothrix* strains isolated during the course of the Rio de Janeiro sporotrichosis epidemic, and maintained in our fungal collection, using the newer methods of taxonomic analysis developed by Marimon et al. [18], and evaluate the accuracy of the classic methodologies applied in the *Sporothrix* identification.

## Materials and Methods

### Strains

This study was approved by the Research Ethics Committee of IPEC/Fiocruz. Two hundred and forty-seven isolates from the Fungal Culture Collection of the Laboratorio de Micologia/IPEC/Fiocruz, two control strains (IOC 1113, IOC 1824) isolated on 1926 and 1984, respectively, prior to the Rio de Janeiro State sporotrichosis epidemic, and *S. brasiliensis* CBS 120339 (former IPEC16490) type strain characterized by Marimon et al. [19] were included in this study—each had been characterized previously as *S. schenckii* by traditional morphological identification methods [22]. Two hundred and forty-six of the isolates were from human sporotrichosis patients identified between 1998 and 2008 and the remainder was isolated from the environment. All strains were previously identified as *S. schenckii*.

### Fungal Re-isolation and Phenotypic Characterization

Filamentous fungal colonies grown on Sabouraud Dextrose Agar were visually examined using



Lactophenol Cotton Blue (Fluka Analyted, France), and slide cultures were prepared as previously described for *Sporothrix* identification [22]. Dimorphism was demonstrated by conversion to the yeast-like form on Brain Heart Infusion (BHI) agar medium (Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA) for 7 days at 37°C. In order to study and confirm macroscopic features and sporulation, isolates were sub cultured on potato dextrose agar plates (PDA—Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA) and Corn Meal Agar slants (BBL™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA) and incubated at 30°C in the dark. After 10–12 days, the microscopic features were determined. Colony diameter on PDA was determined after 21 days according to the previously described protocol [18, 20]. To check growth at 37°C, the strains were grown on PDA and incubated at 37°C for 3 weeks. Carbohydrate assimilation tests were performed using freshly prepared yeast nitrogen base (YNB) medium (Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA) and tested for sucrose and raffinose using the technique described previously protocol [18, 20]. Cultures on YNB supplemented with glucose were used as positive control for growth and YNB without carbohydrates was used as a negative control. Experiments were performed at least three times on different days and, in case of discordant results, repeated two additional times.

#### Molecular Identification

Genomic DNA was extracted and purified from *Sporothrix* spp mycelial phase by phenol/chloroform/isoamyl alcohol method as previously described [25]. For the partial sequencing of the nuclear calmodulin (CAL) gene, we used the specific conditions described by Oliveira et al. [20]. Briefly, the PCR mix consisted of MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Invitrogen, USA), dNTP mix 200 μM (Invitrogen, USA), 2.5U *Taq* Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA), 30 pmol of each primer CL1 (5'-GA(GA)T (AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3'), and CL2A (5'-TT TTTGCATCATGAGTTGGAC-3') [20, 23]. In the PCR reaction, the annealing temperature was 60°C. Automated sequencing was done using the Sequencing Platform at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/FIOCRUZ, Brazil [26]. Sequences from both DNA strands were generated and edited with the

Sequencher ver. 4.6 software package (Genes Codes Corporation, USA), followed by alignment by means of the Mega version 4.0.2 software. The sequences of our strains were compared by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- NIH) with sequences available from NCBI GenBank (*Sporothrix* AM 398382.1/AM 398393.1/AM 117444.1/AM 116899.1/AM 116908.1). All phylogenetic analyses were performed based on Tamura et al. [27], using MEGA vers. 4.0.2 (<http://www.megasoftware.net/>). The phylogenetic relationships among isolates were evaluated from tree topologies: (1) the Neighbor-joining (NJ) algorithm [28] was generated using the genetic distances model of Kimura 2-parameter [29] with pair-wise deletion (gaps/missing data) and uniform rates among sites; (2) the Maximum parsimony (MP) method [29] was employed to infer trees using the close-neighbor-interchange algorithm [30]. A Bootstrap test [31] with 1,000 replicates was conducted for both NJ and MP analyses.

#### Statistical Analyses

All data were subjected to statistical analysis with the use of GraphPad PRISM vers. 4.00, San Diego, CA (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>) and Statistical Package for Social Science (SPSS®) vers. 11.0, Chicago, IL, EUA. P values (<0.005) were calculated by analysis of variance, chi-square test, or McNemar's correlation analysis with 95% of confidence interval (CI) and 5% significance level.

Nucleotide sequence accession numbers. All sequences from isolates included in genotypic analysis were deposited in the GenBank database under accession numbers GU456632, HQ426928 to HQ426962.

#### Results

Phenotypic characterization. All fungal isolates included in the study exhibited similar macroscopic morphology in their filamentous form. After 21 days of incubation, at 30°C on PDA, white, brown, or black colonies with velvety or glabrous texture were observed (data not shown). Pigmented colonies were not seen in only three *Sporothrix* isolates (IPEC 16919, IPEC 27022, and IPEC 27087). Microscopic examination of these colonies revealed thin, hyaline, and septate hyphae. All 247 isolates when cultured on

Com Meal Agar for 12 days at 30°C developed interim or terminal conidia in sympodial conidiophores along the hyphae. These conidia were hyaline or pigmented, usually globose to subglobose or pear shaped. In addition, sessile conidia were also observed, which were dark, thick-walled, and connected individually throughout the hyphae via tiny denticles. Globose, elongated or triangular (Fig. 1), and dematiaceous conidia were predominantly observed in our isolates (Table 1). The IPEC 17692, IPEC 18782B, and IPEC 28790 strains (1.2%) produced just hyaline, globose to subglobose, or pear shaped conidia, and three other isolates, IPEC 25406, IPEC 28329, and IPEC 28487 (1.2%) demonstrated elongated and pigmented conidia. Triangular, pigmented conidia characteristic of *S. schenckii* were seen on five strains (Table 1).

The mean diameter of the colonies together with statistical measures of dispersion was also evaluated in our study (Table 1). Overall, the best fungal growth was at 30°C, with minimum colony diameter ranging from 9 to 14 mm, and maximum from 42 to 51 mm at this temperature. Colony growth at 37°C was lower than that observed at 30°C, with 2–3 mm diameter minima and maxima of 14–20 mm. The mean colony diameter at 30°C was higher in all strains studied when compared with that at 37°C (Table 1).

After 10 days, glucose was assimilated by all isolates tested including the controls. Fifteen isolates (6%) also assimilated sucrose and raffinose, and 22 isolates (8.9%) only assimilated sucrose and glucose. The remaining 84.7% ( $n = 210$ ) assimilated only glucose. None of the isolates assimilated only raffinose and none was able to grow in the control without a carbohydrate source. The biochemical profile of *Sporothrix* isolates that assimilated sucrose only was assessed and repeated five times using five samplings on five consecutive days of each strain in order to evaluate the occurrence of variable sugar assimilation. In all evaluations, *Sporothrix* isolates presented the same biochemical profile, just assimilating sucrose.

Table 1 shows the phenotypic characteristics observed in each species. Of the total, 25 (10.1%) strains could not be identified according to the proposed identification key previously reported [18]. Twenty-two thermotolerant isolates (8.9%) with dematiaceous conidia, diameter of the colonies not exceeding 50 mm, on PDA at 30°C after 21 days of incubation presented biochemical profile of assimilation for species

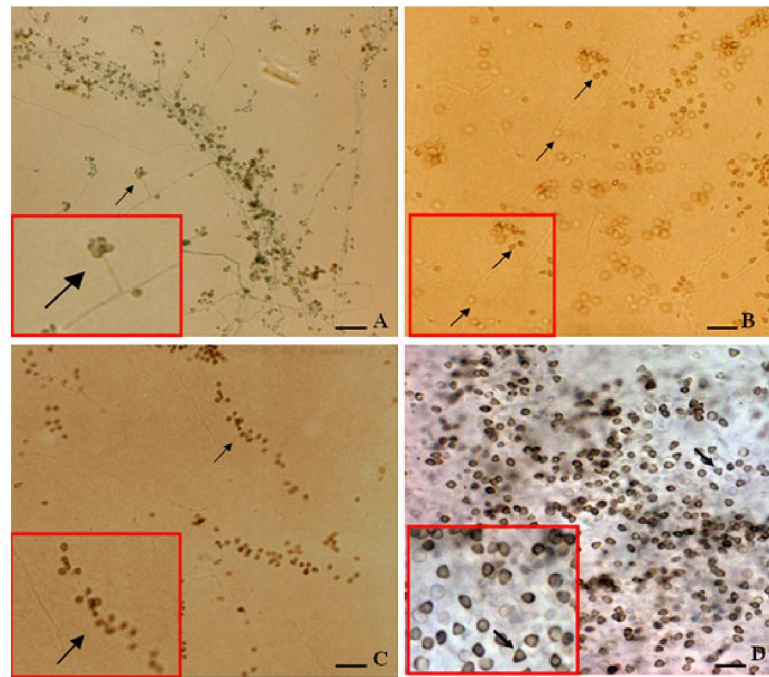
*S. globosa* or *S. albicans*. In the previous species definition, [18] *S. globosa* is described as being not thermotolerant, and *S. albicans* typically produces colonies >50 mm, and does not produce dematiaceous conidia (Table 1). In the other group of strains, 1.2% of our isolates (IPEC 17692, IPEC 28790, and IPEC 18782B) did not produce dematiaceous conidia, grew colonies less than 50 mm, showed growth at 37°C, and did not assimilate raffinose and sucrose (Table 1). This carbohydrate assimilation profile is characteristic of *S. brasiliensis*, whereas the conidial structure is typical of *S. albicans*.

The conidia type produced by different species of the genus *Sporothrix* included in this study is also shown in Table 1. Two hundred and two isolates of *S. brasiliensis* (98%) showed dematiaceous and oval conidia and two isolates (1.0%) triangular conidia. Most isolates (60%) characterized as *S. schenckii* produced oval conidia without the presence of dematiaceous and triangular conidia, which according to studies by Marimon et al. [18] could be a peculiar feature of the strains characterized as belonging to the species *S. schenckii*. Another isolate, also characterized as *S. schenckii*, produced oval, elongated, and pigmented conidial morphology. The correlation among the isolates characterized as *S. schenckii* with the presence of triangular conidia was performed using the statistics test McNemar's and was not statistically significant ( $P = 0.0961$ ). Just one isolate (IPEC 27722) was characterized as *S. mexicana* based on the key proposed previously [18], since dematiaceous and oval conidia were observed.

The correlation among colony growth on PDA at 30°C and 37°C for 21 days on our isolates is shown in Fig. 2. The isolate characterized as *S. mexicana* had the largest diameter at 30°C and lowest at 37°C. The growth of *S. schenckii* isolates was higher at 37°C when compared to *S. brasiliensis*, although statistical differences ( $P = 0.57$ ) were not observed. *S. brasiliensis* isolates and the *Sporothrix* spp. were not identified at the species level and demonstrated similar colony growth at 30°C ( $P = 0.79$ ) and 37°C ( $P = 0.58$ ). The comparison of growth at 30°C of *S. schenckii* and *S. brasiliensis* isolates showed statistically significant differences ( $P = 0.012$ ).

The phenotypic tests of type strain CBS120339 (IPEC 16490) characterized as *S. brasiliensis* by Marimon et al. [18] were re-assessed. The colonies on PDA attained a diameter of 13 mm at 30°C and of





**Fig. 1** Morphology of conidia *Sporothrix* spp. **a** Interim or terminal conidia in sympodial conidiophores type placed along the hypha, **b** hyaline and pigmented conidia, **c** sessile and dark

conidia connected individually in throughout the hyphae, and **d** triangular conidia. Bars 10  $\mu$ m. Magnification  $\times 40$

35 mm 37°C after 21 days of incubation and were unable to assimilate sucrose and raffinose. These phenotypic data are characteristic of *S. brasiliensis*. However, it was found microscopically that this strain produced triangular, dematiaceous conidia, in addition to the globose to subglobose, elongated, dematiaceous conidia (Fig. 1). All control strains from Brazil (IOC1113 and IOC1824) produced colonies on PDA with diameters of 45 and 38 mm at 30°C, and 10 and 9 mm at 37°C, with triangular dematiaceous conidia in all strains. All assimilated sucrose and raffinose. These phenotypic characteristics are consistent with the species *S. schenckii*.

**Molecular Analysis.** Molecular assessment was used to identify the 25 (10.1%) isolates that could not be identified via phenotypic characterization and to confirm the taxonomy of one strain phenotypically characterized as *S. mexicana*, together with the control strains ( $n = 3$ ) and isolates with the phenotypic profiles of *S. brasiliensis* or *S. schenckii* ( $n = 6$ ). The primers CL1 and CL2A were used to

amplify a fragment of 785 base pairs (bp) of the CAL gene, which was then sequenced. The BLASTn program (Basic Local Alignment Search Tool—NIH) was used to compare all the partial *Sporothrix* sequences of the CAL locus with datasets of *Sporothrix* sequences in the NCBI public databank, which showed high similarity with previously deposited sequences, ranging from 97 to 100%. We selected sequences that could provide 100% of query coverage and maxima similarity. The phylogenetic tree of the CAL locus analyzed by Neighbor Joining—NJ revealed (Fig. 3) three distinct and major clades represented by *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, and *S. globosa*. Similar results were obtained when the MP method was employed to analyze the CAL locus of our isolates (data not shown). The significance of the tree was assessed using bootstrap confidence [32]. In our assessment, in 1,000 replicates, the confidence level of occurrence of nodes was 96–99% (Fig. 3). Bootstrap values lower than 70% are not shown. Twenty-four of our isolates with inconclusive

**Table 1** Phenotypic characteristics of *Sporothrix* species complex

| Species (%)                               | Conidia      |                 |                | Colony diameter |       |       |             | Assimilation test |          |          |          |           |
|---|--------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|-------|-------------|-------------------|----------|----------|----------|-----------|
|   | Dematiaceous |                 |                | Hyaline         |       | Range |             | Average ± SD*     |          | Glucose  | Sucrose  | Raffinose |
|   | Globose N(%) | Triangular N(%) | Elongated N(%) | Hyaline N(%)    | 30°C  | 37°C  | 30°C        | 37°C              |          |          |          |           |
| <i>Sporothrix brasiliensis</i> (83.4)     | 202 (98)     | 2 (1)           | 2 (1)          | 0               | 9–45  | 2–18  | 26.9 ± 7.7  | 6.3 ± 2.5         | Positive | Negative | Negative |           |
| <i>Sporothrix</i> spp (10.1) <sup>§</sup> | 22 (88)      | 0               | 0              | 3 (12)          | 14–42 | 3–14  | 27.3 ± 7.5  | 6.4 ± 3.7         | Positive | Positive | Negative |           |
| <i>Sporothrix schenckii</i> (6.0)         | 09 (60)      | 5 (33)          | 1 (7)          | 0               | 12–49 | 2–20  | 33.2 ± 10.2 | 7.0 ± 3.4         | Positive | Positive | Positive |           |
| <i>Sporothrix mexicana</i> (0.5)          | 01 (100)     | 0               | 0              | 0               | 51    | 3     | 51.0 ± 0.0  | 3.0 ± 0.0         | Positive | Positive | Positive |           |

\* Standard deviation

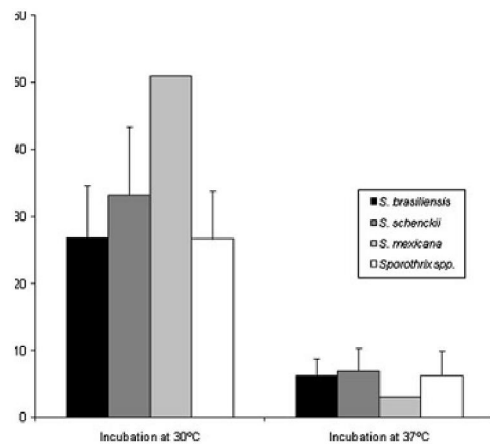
§ Sampling not identified to species level by phenotypic tests

phenotypic profile were grouped on cluster *S. brasiliensis* and shared 100% similarity with a previously published *S. brasiliensis* AM116899.1. The isolate IPEC27722 phenotypically characterized as *S. mexicana* was grouped in cluster *S. schenckii* (AM117444.1) with 99% of similarity. The taxonomy of *S. globosa* was confirmed in the isolate IPEC 27135 by this methodology showing 99% similarity with a previously published *S. globosa* (AM116908.1). The control strains and our isolates with the phenotypic profile of *S. brasiliensis* or *S. schenckii* randomly selected to confirm their identification remained grouped into the cluster *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, respectively (Fig. 3). Overall, there was 11.7% disagreement between the species classification using phenotypic and genotypic methodologies.

**Discussion**

During the last decade, sporotrichosis has significantly increased in Brazil, especially in the State of Rio de Janeiro, with the occurrence of an epidemic related to zoonotic transmission from cats to humans causing small outbreaks amongst cat’s owners and professionals taking care of sick cats [14]. This form of zoonotic transmission of disease has led to changes in the usual clinical manifestations of sporotrichosis, with examples of primary involvement of the nasal mucosa [33], erythema nodosum [16], erythema multiform [17], and primary conjunctivitis [13]. In addition, there have been a large number of cases of disseminated cutaneous sporotrichosis, which is typically a less common clinical form of the disease [34].

Previous studies using methodologies based on the analysis of nucleic acids, such as RAPD and partial sequencing of some genes [35–37], showed that *Sporothrix* isolates retrieved during the outbreak in Rio de Janeiro State could be grouped in clades distinct to other isolates from different geographical regions in Brazil and from other countries. A high degree of genetic similarity was observed among isolates from the epidemic. However, it was possible to discriminate between 5 and 10 genotypic profiles, indicating the presence of more than one population of *S. schenckii* [37]. These findings suggested a common source of infection between humans and



**Fig. 2** Comparison of colony growth (mean diameters of colonies) in PDA among species of the genus *Sporothrix* in two different temperatures of incubation

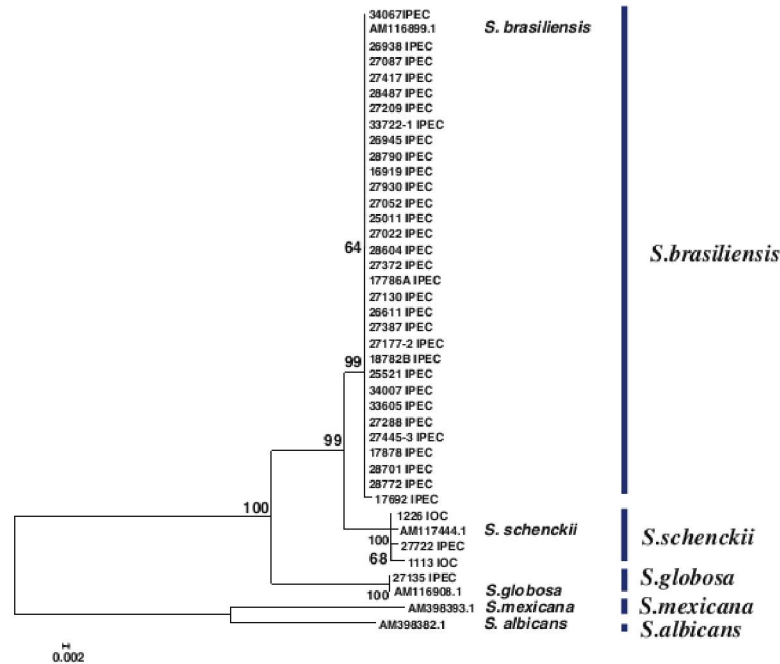
cats, and that animal's act as vectors for transmission of the fungus.

In order to confirm the identity of species within *Sporothrix* complex isolated during the epidemic in Rio de Janeiro, 247 isolates (representing 11.8% of the isolates maintained in our laboratory) were re-analyzed. The predominant species found was *S. brasiliensis* (83.4%), which confirms previous data that strains of *S. brasiliensis* are associated with the Rio de Janeiro sporotrichosis epidemic [18]. However, *S. schenckii* and *S. globosa* were also isolated from patients' resident at these epidemic areas, which indicate that other species of *Sporothrix* are also contributing to the persistence of this epidemic disease in Rio de Janeiro.

The saprophytic form of *S. schenckii* is usually characterized by the types of conidia [38]. It should be emphasized that on the description of new species the authors [18] observed terminal or intercalary conidial cluster on sympodial conidiophores arranged along the hyphae, hyaline or lightly pigmented, usually globose to subglobose or pear shaped. Besides these sessile conidia, dark, thick-walled, connected individually throughout the hyphae of tiny denticles were also detected, as well as dematiaceous conidia with triangular morphology seen only in *S. schenckii*. Based on the morphology of conidia found in our isolates, three of them (IPEC25406, IPEC28329, and IPEC28487) showed elongated, globose, and

dematiaceous conidia, typical of *S. schenckii*, corroborating data presented earlier in which the presence of these conidia were associated with the morphology of *S. schenckii* [18]. However, only isolate IPEC28329 was characterized as *S. schenckii* via the other phenotypic methods, whilst the isolates IPEC25406 and IPEC28487 were characterized as *S. brasiliensis* by other phenotypic tests. The same observation was made when the previously characterized *S. brasiliensis*-type strain CBS120339 (IPEC16490) was re-analyzed in this study. The colonies of this isolate when grown on PDA attained a diameter of 35 mm at 30°C and 13 mm at 37°C, and the fungus was unable to assimilate sucrose and raffinose. These phenotypic aspects are characteristic of *S. brasiliensis*. However, microscopic examination determined that this strain produced dematiaceous triangular conidia, structures not previously described on this strain, which have been only associated previously with strains of *S. schenckii*. Similar data were also described by Marimon et al. [18] who showed that the type strain *S. schenckii* (CBS 359.36), which traditionally produces pigmented conidia, formed only sympodial and hyaline conidia. These data suggest that the identification of *Sporothrix* species using only the morphology of conidia as a parameter of classification should be used with restrictions, and that the application of other phenotypic tests is mandatory, since these isolates may fail their ability to produce some morphological structures or may modify them due to some external factor or even after several culture passages. This fact was recently demonstrated in Italy where a fungal isolate from an immunocompetent patient with lymphocutaneous sporotrichosis was characterized as *S. schenckii* by conventional filamentous morphology and conversion to yeast form in BHI at 37°C [39]. This isolate was subcultured several times to be used as a standard strain in environmental studies. After these subcultures, the yeast form remained unchanged even when grown at room temperature [12]. In addition, Marimon et al. [18] related that morphology of conidia would be a parameter to be considered in the characterization of *S. schenckii*, since the isolates included in their studies tended to have triangular conidiation. Our data contradict this assertion, since statistical analysis by the McNemar's method showed no correlation between the strains characterized phenotypically as *S. schenckii* and morphology of conidia.





**Fig. 3** The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method among 6 taxa (26). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown next

to the branches (30). All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (26)

Few studies have focused on the complex physiology of *S. schenckii* and have shown conflicting results, since the methodologies used are not the same [40, 41]. Our results are fully consistent with those observed by other colleagues [18] who claim that only the assimilation of sucrose, raffinose, and ribitol are useful in discriminating *Sporothrix* species complex since all our isolates, including the controls, assimilated glucose; 15 isolates (6.1%) assimilated sucrose and raffinose in addition to glucose, and 22 (8.9%) assimilated only sucrose. None of the isolates assimilated only raffinose, and none was able to grow on controls without carbohydrates. All isolates included in this study had optimal growth at 30°C and were thermotolerant at 37°C with conversion, at least partially at this temperature, with budding cigar-shaped yeasts.

Based on the results obtained in this study, we initially assumed that variations in the sugar assimilation profile could be associated with the storage

time of these isolates in a culture collection. However, we discarded this hypothesis, since we included in our sample two isolates obtained from the same patient at different times. That first sample (IPEC 27288) isolated on 2005 was identified just for morphological characteristics as *S. schenckii*, and storage by the Castellani's methodology. The second isolate (IPEC 34067) was obtained after 3 years after the isolation of the first sample. Both were tested for carbohydrate assimilation at the same time, presenting the same pattern of assimilation. Mendoza et al. [41] demonstrated changes in enzyme activity and in ability to hydrolyze starch in isolates of *S. schenckii* maintained for 18 years by two preservation methods, but they did not evaluate the uptake of the carbohydrates used in our study. Moreover, the first of our isolates was stored only for 3 years. Thus, our results should not be compared to this previous study.

In this study, it proved impossible to identify 25 isolates by phenotypic characteristics alone. Twenty-

two of these isolates showed a biochemical pattern of carbohydrate assimilation typical to that of *S. globosa* or *S. albicans* by the Marimon's key. However, the average colony diameter at 30°C excluded *S. albicans* in these cases; in addition, the latter produces dematiaceous conidia. They also could not be classified as *S. globosa* since these isolates were thermotolerant. The identification was concluded after sequencing of the CAL locus, which confirmed that 21 of the isolates were actually *S. brasiliensis* and one was *S. globosa*.

Identification of isolates IPEC17692, IPEC18782B, and IPEC28790, also proved inconclusive, based on observation of hyaline conidia, which are characteristic features of the species *S. albicans* or *S. lurie* [18, 21], together with an auxonogram profile typical of *S. brasiliensis*. Recently our group demonstrated that one of these isolates (IPEC18782B), whilst being unable to produce dematiaceous conidia, was able to produce low levels of melanin at 30°C, although in insufficient amounts to either darken colonies or to appear in fungal cell walls [42]. Thus, this isolate probably lost its ability to produce visible amount of melanin during its growth. However, it cannot yet be ruled out that there is further as yet unappreciated variability within isolates classified as *S. brasiliensis*, and studies are underway in our laboratory to clarify this hypothesis. Another three strains classified as *S. brasiliensis* (IPEC16919, IPEC27022, and IPEC27087) have not demonstrated macroscopically pigmented colonies, but did develop oval conidia. These results also suggest phenotypic variability within this species, and that the production of melanin should be verified by both macroscopic and microscopic examination of colonies.

Some isolates examined in this study deserve special attention. Isolate IPEC27722, characterized phenotypically as *S. mexicana*, showed colony diameters exceeding 50 mm (51 mm) at 30°C and 3 mm at 37°C, coincident with those proposed for the classification of this species. Physiological characteristics also inferred that this isolate was *S. mexicana*. Thus far this species has only been isolated from environmental sources - rosewood soil and carnation leaves—and is considered non-pathogenic to man [18]. Therefore, genotypic analysis was performed to confirm its taxonomy given that IPEC27722 was isolated from the forearm injury of an immunocompromised patient, who had a previous report of an

uncommon form of histoplasmosis [43]. The sporotrichosis regressed spontaneously, supporting previous data that *S. mexicana* acts more as opportunistic fungi. Molecular analysis of this isolate clustered it on the *S. schenckii* clade. For this reason, we suggest that molecular characterization should be applied to isolates of the *Sporothrix* complex that grow colonies around 50 mm in diameter at 30°C.

Molecular analysis of 25 isolates that showed inconclusive results on phenotypic studies enabled the formation of a clade composed by 24 isolates with 100% similarity with the species *S. brasiliensis* demonstrating again the importance of analysis at the level of genotype to identify species. Moreover, one of our isolates (IPEC27135) was clustered with the species *S. globosa* (AM116908.1) isolated in Spain (Fig. 3). Accordingly, strain IPEC27135 was classified as *S. globosa* and represents the first isolation of this pathogen in Brazil [20]. In addition, our study has shown that the strain IPEC28329, classified phenotypically as *S. schenckii*, actually demonstrates similarity to the *S. brasiliensis* (AM116899.1) type strain. Therefore, our data is in disagreement with those previously published [18] that make the assumption that the differentiation of species within the complex *Sporothrix* can be easily accomplished without the involvement of molecular methods. In contrast, we believe that the correlation between molecular data and phenotypic characteristics is crucial in identifying these species and suggest that other genetic markers should also be evaluated in taxonomic studies of the *Sporothrix* species complex.

This study represents the most extensive characterization of strains yet undertaken of the *Sporothrix* complex, based on phenotypic and genetic analysis. We have characterized phenotypically 247 isolates from the epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro state, Brazil. And have confirmed *S. brasiliensis* as the most prevalent species (83.4% of isolates). We have also identified an important discrepancy with the previously reported data concerning the microscopy of conidia produced by these newly described *Sporothrix* species. More studies are necessary to fully understand the conidial profile of each *Sporothrix* species.

**Acknowledgments** Financial support for this work was provided by FAPERJ (Grant Proc. E-26/111.619/2008). R.M.Z.O. is in part supported by CNPq 350338/2000-0. We

thank Andrew J. Hamilton for help in preparing this manuscript. Automated sequencing was done using the Genomic Platform-DNA Sequencing Platform at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), Brazil.

## References

- Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. 1989;108:113–6.
- Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med. Mycol.* 2008;46:53–6.
- Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis*. 2000;30:65–70.
- Carrada-Bravo T. New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1975;69:267–73.
- Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol*. 1992;30:169–71.
- Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, Licitra C, Hankins M, Toth B, Padhye A, Kaufman L, Passarell L, Cooper CR, Hutwagner L, Hopkins R, McNeil M. Outbreak of sporotrichosis among three nursery workers. *J Infect Dis*. 1997;176:499–504.
- St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. In: *A clinical laboratory handbook*. California: Star Publishing Company; 1996.
- Sigler L, Harris JL, Dixon DM, Flis AL, Salkin IF, Kemna M, Duncan RA. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1009–15.
- Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. *A colour atlas and textbook of histopathology of mycotic diseases*. Wolfe Medical Publications Ltd.; 1980, pp 112–115.
- Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol*. 2007;25:181–7.
- Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatology*. 2002;27:427–31.
- Criseo G, Zungriand D, Romeo O. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3870–1.
- Schubach A, de Lima Barros MB, Schubach TM, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Sued M, de Matos Salgueiro M, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, Marzochi KB, Wanke B, Conceição-Silva F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea*. 2005;24:491–3.
- Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2008;21:129–33.
- Freitas DF, Valle AC, Almeida-Paes R, Bastos FI, Galhardo MC. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis*. 2010;50:453.
- Gutierrez-Galhardo MC, de Oliveira Schubach A, de Lima Barros MB, Moita Blanco TC, Cuzzi-Maya T, Pacheco Schubach TM, dos Santos Lazera M, do Valle AC. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Int J Dermatol*. 2002;41:114–6.
- Gutierrez-Galhardo MC, Barros MB, Schubach AO, Cuzzi T, Schubach TM, Lazera MS, Valle AC. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 2005;19:507–9.
- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3198–206.
- Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev. Iberoam. Micol*. 2009;26(3):218–22.
- Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Barros MBL, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia*. 2010;169:359–63.
- Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol*. 2008;46(6):621–5.
- de Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, de Hoog GS, Vismer HF, Wingfield MJ. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*. 2008;100(4):647–61.
- Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia* 2011; Published online: 02 April 2011.
- Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, Coles FB. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest US epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29:1106–13.
- Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):463–4.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res*. 2008;7(3):861–71.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24(8):1596–9.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol*. 1987;4:406–25.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16(2):111–20.
- Eck RV, Dayhoff MO. *Atlas of protein sequence and structure*. National Biomedical Research Foundation, Maryland: Silver Springs; 1966.
- Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University, NY: Oxford University Press; 2000.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783–91.



33. Schubach TMP, Schubach AO, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PCF, Gutierrez-Galhardo MC, Wanke B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats of Rio de Janeiro. *Vet Rec.* 2003;152:172–5.
34. Barros MBL, Schubach AO, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Reis RS, Conceição MJ, Valle ACF. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2003;42:677–81.
35. Marimon R, Gené J, Cano J, Sutton DA, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3251–6.
36. Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Valle AC, Almeida-Paes R, Silva-Tavares PM, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med. Mycol.* 2008;46:141–51.
37. Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz MM, Tavares PM, Monteiro PC, Schubach TM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2009;104:769–74.
38. de Hoog GS, de Vries GA. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blastobotrys nivea*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1973;39:515–20.
39. Criseo G, Malara G, Romeo O, Puglisi Guerra A. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. *Mycopathologia.* 2008;166:159–62.
40. Gosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharmaand VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses.* 2002;45:449–54.
41. Mendoza M, Alvarado P, Dias de Torres E, Lucena L, de Albornoz MC. Physiological compartment and in vivo sensitivity of *Sporothrix schenckii* isolates maintained for 18 years by two preservation methods. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005;22:151–6.
42. Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PC, Gutierrez Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Microb. Infect.* 2009;11:554–62.
43. Valle AC, Moreira LC, Almeida-Paes R, Moreira JS, Pizzini CV, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Chronic disseminated histoplasmosis with lesions restricted to the mouth: case report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006; 48:113–6.

## Sporotrichosis Caused By *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: Case Report

Manoel Marques Evangelista de Oliveira · Rodrigo de Almeida-Paes ·  
Mauro de Medeiros Muniz · Monica Bastos de Lima Barros ·  
Maria Clara Gutierrez Galhardo · Rosely Maria Zancope-Oliveira

Received: 23 October 2009 / Accepted: 20 January 2010 / Published online: 4 February 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** This report describes the first isolation of *Sporothrix globosa* from a Brazilian patient. A 77-year-old woman was examined for sporotrichosis infection. Histopathological examination of skin biopsy revealed chronic granulomatous infiltrate with microabscess. Furthermore, *S. schenckii*-like yeasts were evident as demonstrated by PAS and Grocott stains. The fungus was identified based on colony morphology on Sabouraud Dextrose Agar slants, Potato Dextrose Agar, and Corn Meal Agar, microscopic morphology on slides cultures, and assimilation of different carbon sources. The species confirmation was made by molecular methodology.

**Keywords** *Sporothrix globosa* · Sporotrichosis · Calmodulin · Phylogeny · First isolation · Brazil

### Introduction

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis with a global distribution, but the most endemic region is found in Latin America [1–3]. This infection is caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, which is associated, in the environment, with plants and soil [4]. Other *Sporothrix* species, however, have been reported as agents of sporotrichosis such as *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, and *Sporothrix luriei* [5–9]. Previous studies revealed the existence of differences in the geographical distribution among the members of the *Sporothrix* complex, including geographically restricted species such as *S. brasiliensis*. Conversely, *S. globosa* is a widespread fungus found up to now in UK, Spain, Italy, China, Japan, USA, India [6, 9] and more recently Mexico, Guatemala, and Colombia [9]. Here, we report a case of lymphocutaneous sporotrichosis due to a non-*S. schenckii* species, *S. globosa* in a patient from Rio de Janeiro, an endemic sporotrichosis region in Brazil. This is a recently established species, and to our knowledge, this is the first description of *S. globosa* in Brazil.

M. M. E. de Oliveira · R. de Almeida-Paes ·  
M. de Medeiros Muniz · R. M. Zancope-Oliveira (✉)  
Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia  
do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas,  
Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos,  
Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil  
e-mail: rosely.zancope@ipecc.fiocruz.br

M. B. de Lima Barros  
Laboratório de Pesquisa Clínica DST-AIDS, Instituto de  
Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo  
Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ  
21045-900, Brazil

M. C. G. Galhardo  
Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia  
Infecciosa, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas,  
Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos,  
Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil

## Case Report

A 77-year-old woman, from the Rio de Janeiro metropolitan area (Xerem) presented to Laboratório de Dermatologia Infecçiosa, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz for evaluation of a verrucous lesion measuring 3 × 2 cm on her right dorsal hand accompanied of ascending subcutaneous nodules on her arm. There were 12 nodules and some of them were fistulized. The patient reported that the lesions have been developed over a 4-month period. She used to hand plants, vegetable garden and soil in her residence; however, she did not remember the occurrence of local trauma. The only medication used by the patient before medical attending was Captopril 50 mg/day for treatment of high blood pressure.

Skin biopsy was performed on the lesions, and tissue fragments were sent for histopathological and microbiological examination. Direct examination of tissue fragments after KOH clarification of all samples was negative. Hematoxylin and eosin examination revealed chronic granulomatous infiltrate with microabscess. Furthermore, *S. schenckii*-like yeasts were evident as demonstrated by PAS and Grocott stains. The fungal culture performed at 25°C on Sabouraud Dextrose Agar showed after 7 days filamentous colonies on the agar slants. Microscopic examination of slide cultures demonstrated hyaline septate hypha, with both hyaline and dematiaceous conidia compatible with *Sporothrix* spp., and the diagnosis of lymphocutaneous sporotrichosis was made. The patient was treated with itraconazole 100 mg/day for 5 months, with regression of all the lesions.

## Materials and Methods

### Isolation and Phenotypic Characterization of the Fungus

Filamentous fungal colonies grown on Sabouraud Dextrose Agar were visually examined and slide cultures prepared as previously described for *Sporothrix* identification [10]. In order to study macroscopic features and sporulation [6], the case isolate (IPEC 27135) was subcultured on Potato Dextrose Agar (PDA) plates, and Corn Meal Agar (CMA; BBL

™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA) slants, and incubated at 30°C in the dark. The microscopic features were determined primarily on CMA slide cultures after 10–12 days of incubation at 30°C, and the diameter of the colonies on PDA was measured after 21 days according to the previously described protocol [6]. To check growth at 37°C, the strain was grown on PDA and incubated at 37°C for 3 weeks. Carbohydrate assimilation tests were performed using freshly prepared Yeast Nitrogen Base (YNB) medium [Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA] and tested for three sugars (dextrose, sucrose, and raffinose) using the technique described previously [6]. Cultures on YNB supplemented with dextrose were used as positive control for growth and YNB without carbohydrates was used as a negative control. Type strain of *Sporothrix brasiliensis* CBS 120339 (IPEC 16490) characterized by Marimon et al. [6] was also included in this study.

### Molecular Identification

Genomic DNA was extracted and purified from *S. schenckii* yeast phase by phenol/chloroform/isoamyl alcohol method as previously described [11]. For the partial sequencing of the nuclear calmodulin (CAL) gene, we used specific conditions described by Susca et al. [12] with slight modifications. Briefly, the PCR mix consisted of MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Invitrogen, USA), dNTP mix 200 mM (Invitrogen, USA), 2.5 U *Taq* Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA), 30 pmol of each primer CL1 (5'-GA(GA)T(AT)CAA GGAGGCCTTCTC-3'), and CL2A (5'-TTTTTGCAT CATGAGTTGGAC-3') [13]. In the PCR, the annealing temperature was altered to 60°C. Automated sequencing was done using the Sequencing Platform at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/FIOCRUZ, Brazil [14]. Sequences from both DNA strands were generated, edited with the Sequencher ver. 4.6 software package (Genes Codes Corporation, USA), and aligned by means of the Mega version 4.0.2 software. The sequences of our strain were compared by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool—NIH) with sequences available from NCBI GenBank (*Sporothrix* AM 398382/AM 398393/AM 117444/AM 116899/AM 116908). All phylogenetic analyses were performed based on Tamura and coworkers [15], using MEGA vers. 4.0 (<http://www.megasoftware.net/>). The

phylogenetic relationships among isolates were evaluated from tree topologies: (1) the Neighbor-joining (NJ) algorithm [16] was generated using the genetic distances model of Kimura 2-parameter [17] with pair wise deletion (gaps/missing data) and uniform rates among sites; (2) the Maximum parsimony (MP) method [18] was employed to infer trees using the close-neighbor-interchange algorithm [19]; gaps were used as fifth character. A Bootstrap test [20] with 1,000 replicates was conducted for both NJ and MP analyses. Sequence was deposited in GenBank as GU 456632.

## Results

### Primary Isolation

Pure cultures of identical moulds were found in SDA slants at 30°C. After 7 days of growth the initial colonies of this fungus isolated from clinical material were glabrous, white and, after a few days, a dark pigment was developed in the mycelia. Microscopic observation at this time showed the presence of simple, ovate hyaline and thin-walled conidia in sympodial conidiophores, and a second conidial form of brown, thick-walled dark conidia along the undifferentiated hyphae. At 37°C on Brain Heart Infusion Agar (BHI) (BBL™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD 21152 USA), moist, glabrous, yeast-like colonies were observed. In the yeast form, the budding yeast cells were hyaline, small, globose,

or oval. Based on their micromorphology, this strain was tentatively classified as *Sporothrix* spp.

### Morphological and Physiological Analysis of the Case Isolate

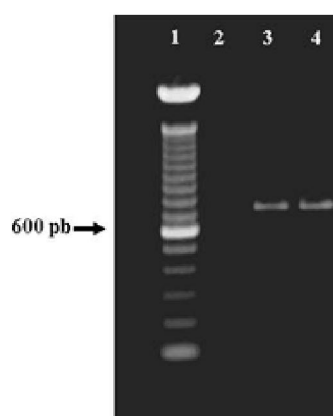
The macroscopic morphologies of *Sporothrix* spp. from the case isolate, as well strain type *S. brasiliensis* CBS 120339 were similar. After 3 weeks of incubation at 30°C, colonies on PDA were moist, glabrous to cotton-like surface, white to dark brown. Microscopically these fungi presented thin, septated hyaline hyphae. All the isolates sporulated on CMA after 12 days at 30°C, and developed intercalary or terminal conidial cluster on sympodially conidiophores. The conidia were hyaline or slightly pigmented, usually obovoid. These sessile conidia were globose and measured 2,5 µm long by 2,5 µm wide (Fig. 1a).

The case isolate and the type strain of *S. brasiliensis* exhibited better growth at 30°C compared to 37°C. The colonies grown on PDA, at the first temperature, achieved a diameter of 34–35 mm after 21 days. At 37°C the isolates showed restricted growth, with 7–13 mm in colony diameter after 21 days (Fig. 1b). Carbohydrate assimilation tests were run in triplicate and presented the following results: both strains assimilated dextrose, and were unable to assimilate raffinose. The *Sporothrix* isolate (IPEC 27135) also assimilated sucrose, typical phenotypic characteristic of *Sporothrix globosa* [6].



**Fig. 1** Macroscopic and microscopic morphologies of *S. globosa*. **a** Morphology of the sessile conidia of the *S. globosa*. **b** Colony of *S. globosa* developed on PDA at 37°C

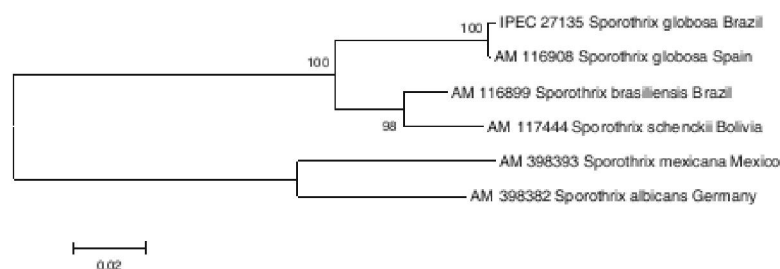




**Fig. 2** PCR product based on the partial calmodulin gene sequence with CL1-CL2A primers pair. 1 100-bp DNA Ladder-Invitrogen; 2 Negative control; 3 *Sporothrix* isolate CBS 120339; 4 *Sporothrix* isolate IPEC 27135

#### Molecular Analysis

Phenotypic characteristics allowed us to classify this fungus as *S. globosa*, although this species has shown atypical morphologic profile, with different characteristics among this group [6]. Identity with other *Sporothrix* strains was confirmed by molecular sequencing data of the calmodulin (CAL) gene. GenBank search revealed that the case isolate (IPEC 27135) showed a 100% match with the CAL sequences of *S. globosa* (i.e., GenBank accession number AM 116908) with high bootstrap support values sustaining thus the morphological identification by mycological procedures (Figs. 2, 3).



**Fig. 3** The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method among six taxa [16]. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches [20]. All positions containing gaps and missing

#### Discussion

The first epidemic of sporotrichosis in humans as a result of zoonotic transmission was identified in Rio de Janeiro, Brazil, in 1998, with predominance of women with a median age of 41 who were engaged in domestic activities. The prevalence of sporotrichosis is four times higher among patients in contact with animals, especially cats, irrespective of gender. Although, in the current epidemic of sporotrichosis, contact with sick cats was the main factor associated with transmission of the disease to humans [21], traditional mechanism of transmission by traumatic inoculation with soil or plant-related matter is also occurring [4]. In the present case, the patient denies any trauma, although is possible that patient suffered a small local trauma during her daily occupational activities.

Our phylogenetic analysis has shown a clear separation of *S. globosa* from the other species that currently include the *S. schenckii* complex [6]. Apart from genetic character, morphological, and physiological features also indicate the identity of the case isolate (IPEC 27135) as *S. globosa*, and although in the phenotypic markers proposed by Marimon et al. [6], this species does not present growth at 37°C, our *S. globosa* isolate presented growth at 37°C, attaining 7 mm of colony diameter. However, the same authors related four exceptions, which exhibit a very restrict growth. Consequently, our results corroborated those data, and suggested that other phenotypic features besides capacity for growth at 37°C, have to be evaluated before the final classification as *S. globosa*.

data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 537 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 [15]. Sequence for strain IPEC 27135 is deposited as GU 456632

*Sporothrix* species vary in virulence [22, 23]. Recent information from a murine infection model suggests that *S. brasiliensis* currently causes the highest fungal burdens resulting in the highest morbidity and mortality [24]. *S. schenckii* caused less damage than *S. brasiliensis* and *S. globosa* was avirulent. Interestingly, the conidia of *S. globosa* isolates did not produce pigment or grow at 37°C. In contrast, the *S. globosa* isolate described in the present work readily grew at 37°C suggesting that there may be significant variation within this species. We are currently studying additional isolates to assess this hypothesis.

**Acknowledgments** Financial support for this work was provided by FAPERJ (Grant Proc. E-26/111.619/2008). R. M. Z. O. is in part supported by CNPq 350338/2000-0. Automated sequencing was done using the Genomic Platform-DNA Sequencing Platform at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), Brazil

## References

- Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. 1989;108:113–6.
- Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol*. 2008;46:53–6.
- Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis*. 2000;30:65–70.
- Carrada-Bravo T. New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1975;69:267–73.
- Marimon R, Gené J, Cano J, Sutton DA, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3251–6.
- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3198–206.
- Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):732–4.
- Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: rare fungus from clinical origin. *Med Mycol*. 2008;46(6):621–5.
- Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26(3):218–22.
- Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29:1106–13.
- Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):463–4.
- Susca A, Stea G, Mulé G, Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Addit Contam*. 2007;24(10):1154–60.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 2000;41:61–78.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res*. 2008;7(3):861–71.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24(8):1596–9.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec Biol and Evol*. 1987;4:406–25.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16(2):111–20.
- Eck RV, Dayhoff MO. Atlas of protein sequence and structure. Silver Springs, Maryland: National Biomedical Research Foundation; 1966.
- Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University, NY: Oxford University Press; 2000.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783–91.
- Barros MBL, Schubach AO, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Reis RS, Conceição MJ, et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol*. 2003;42:677–81.
- Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3004–11.
- Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*. 1992;30:951–4.
- Arillaga-Moncrieff I, Capilla E, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(7):651–5.

Comparação de fenótipos e genótipos entre *Sporothrix* spp. obtidos no estado do Rio de Janeiro com isolados de outras regiões geográficas.

Neste capítulo incluímos três estudos que englobam a identificação de espécies do complexo *Sporothrix* spp. provenientes de diferentes regiões geográficas, por meio de estudos fenotípicos e moleculares.

A comparação de fenótipos e genótipos dos isolados do complexo *Sporothrix* obtidos no estado do Rio de Janeiro com isolados de outras regiões geográficas, nos permitiram reportar o primeiro caso de esporotricose humana causada por *S. mexicana* em Portugal, embora não seja caso autóctone, uma vez que o paciente esteve em viagem à Malásia. Descrevemos também o primeiro caso autóctone de esporotricose em Portugal, causado por *S. globosa*. Com esses estudos concluímos que a esporotricose pode estar subdiagnosticada particularmente no sul da Europa, sugerindo Portugal como uma área emergente para esta infecção fúngica. Outro importante estudo realizado foi a descrição do primeiro surto familiar zoonótico, por *S. brasiliensis* fora da área endêmica de esporotricose no Rio de Janeiro, ocorrido no estado do Espírito Santo. Nesse estudo identificamos *S. brasiliensis* como o agente de infecção no gato e em três membros da família, fora da área endêmica de esporotricose com transmissão zoonótica no Brasil.

## Sporotrichosis Caused by *Sporothrix* *mexicana*, Portugal

**To the Editor:** Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection present worldwide that is caused by traumatic inoculation or inhalation of spores of the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* complex (1–3). However, molecular studies have shown that the *S. schenckii* complex constitutes several cryptic infectious species (i.e., *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana*, and *S. schenckii*). Marimon et al. (4) demonstrated 3 major clades grouped into 6 putative phylogenetic species. The natural habitats of these species are soil and plants. The species showed distinct pathologic behavior, antifungal responses, and phenotypes, which suggests that optimal clinical treatment may depend on the taxon involved in the sporotrichosis (1). Human infections have been reported primarily from the Americas, including Latin America (3,5), Asia (e.g., Malaysia, India, Japan), Africa, and Australia are also regions where infections are endemic (6). Although infections are rare in Europe, a case of human infection (7) and a case of an animal infection (8) have been described in southern Italy. We report a case of human sporotrichosis in which *S. mexicana* was isolated from a patient in Portugal.

A 34-year-old man sought care at a podiatry clinic in Vila Nova de Famalicão, Portugal, in 2009 for multiple polymorphous eruptions and ulcers on both feet. There was no obvious cause of the disease. Although the patient had traveled to Malaysia in 2003 and had worn open footwear every day, he did not recall receiving a skin wound. In 2004 in Portugal, subcutaneous nodules appeared in both feet, became ulcerated, and spontaneously healed. By 2005, more

severe lesions had appeared and became a chronic infection in both feet and lower limbs. The symptoms were diagnosed erroneously as dyshidrotic eczema, and treatment with topical corticosteroids was unsuccessful.

Several skin fragments of the lesions were submitted for mycological assessment. Fungi were not found on potassium hydroxide slides of all samples. Filamentous fungal colonies were observed after 7 days of culture on Sabouraud dextrose agar slopes at 25°C. The fungus had hyaline septate hyphae, with hyaline and dematiaceous conidia compatible with *Sporothrix* spp. The isolate was accessed and preserved in the Micoteca da Universidade do Minho (MUM, Braga, Portugal) fungal culture collection and given the accession code MUM 11.02.

The macroscopic features and sporulation were analyzed by

using cornmeal and potato dextrose agars. Clusters of intercalary or terminal conidia were formed by sympodial growth from differentiated conidiophores on both media. Sympodial conidia were hyaline or slightly pigmented. Sessile conidia were predominantly subglobose, obovoidal or ellipsoidal, and  $3.35 \pm 0.41 \mu\text{m}$  long by  $2.30 \pm 0.32 \mu\text{m}$  wide (Figure, panel A). A teleomorph was not observed. The colony diameter on potato dextrose agar after 21 days of incubation attained 40 mm at 30°C and 5 mm at 37°C. The yeast form was achieved by incubating the isolate on brain heart infusion agar on slants at  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  for 7 days in a single subculture.

Dextrose, sucrose, and raffinose assimilation tests were performed in triplicate by using yeast nitrogen base medium. The strain assimilated dextrose, sucrose, and raffinose,

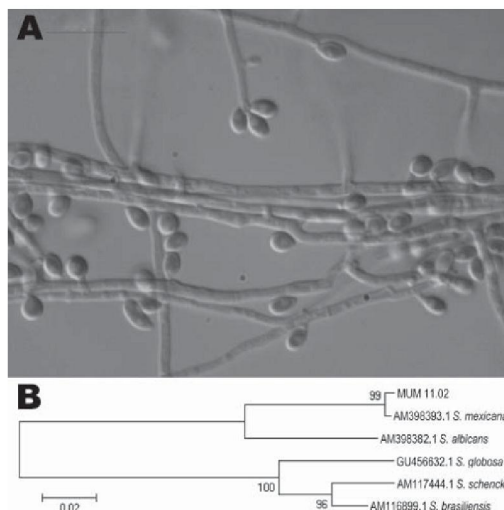


Figure. A) Photomicrograph of sympodial and sessile conidia of *Sporothrix mexicana* obtained by using a transmitted differential interference contrast microscope. The isolate was obtained from a patient in Portugal in 2009 and archived in the Micoteca da Universidade do Minho (MUM) under accession no. MUM 11.02. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . B) Neighbor-joining tree showing relatedness of MUM 11.02 isolate with other species of the *S. schenckii* complex. The percentage of replicate trees in which the associated taxon clustered in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown next to the branches. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (complete deletion option). There were 537 positions in the final dataset. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.



showing phenotypic characteristics typical of *S. mexicana* and *S. schenckii* (2). In contrast, type reference strain *S. brasiliensis* CBS 120339 was included in the test, and it was able to assimilate only dextrose.

A presumptive identification based on phenotypic characteristics allowed us to classify this fungus as *S. mexicana*, although this species has an atypical morphologic profile. The diameter of colonies grown at 30°C and 37°C are smaller than those proposed by Marimon and collaborators but much closer to those of *S. schenckii* (2). These differences could be attributable to the intraspecific variation of this single isolate.

Genomic DNA was obtained from the yeast phase of *S. mexicana* MUM 11.02, and the partial sequencing of the nuclear calmodulin gene was based on the amplicon generated by PCR reaction by using CL1 and CL2A primers (2,3). Sequencing was performed at Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. A BLAST analysis ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) comparing the sequence of the calmodulin gene with sequences AM398382, AM398393, AM117444, AM116899, and AM116908 in the GenBank database confirmed the identity of this isolate as *S. mexicana*. The MUM 11.02 isolate showed 99% similarity with the sequences of *S. mexicana* (i.e., GenBank accession no. AM398393) with high bootstrap support values (Figure, panel B). The calmodulin sequence of MUM 11.02 was deposited in GenBank as JF970258.

In vitro susceptibility tests with fluconazole, itraconazole, and terbinafine were performed by the microdilution method (9) and revealed MICs of 128 µg/mL, 32 µg/mL, and 0.5–1.0 µg/mL, respectively, which corresponds to the findings of Marimon et al. (1) for *S. mexicana*. Thus, *S. mexicana* is an emerging cause of human sporotrichosis.

Financial support for this work was provided by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Grant Proc. E-26/111.619/2008). R.M.Z.O. is in part supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico 350338/2000-0.

**Nicolina Marques Dias,  
Manoel Marques  
Evangelista Oliveira,  
Manuel Azevedo Portela,  
Cledir Santos,  
Rosely Maria Zancope-Oliveira,  
and Nelson Lima**

Author affiliations: Universidade do Minho, Braga, Portugal (N.M. Dias, C. Santos, N. Lima); Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde, Gandra-Paredes, Portugal (N.M. Dias, M.A. Portela); and Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (M.M.E. Oliveira, R.M. Zancope-Oliveira)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1710.110737>

#### References

- Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:732–4. doi:10.1128/AAC.01012-07
- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45:198–206. doi:10.1128/JCM.00808-07
- de Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Barros MBL, Galhardo MCG, Zancope-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia*. 2010;169:359–63. doi:10.1007/s11046-010-9276-7
- Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Lazera MS, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3251–6. doi:10.1128/JCM.00081-06
- da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:451–9. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
- Hay RJ. Fungal infections. *Clin Dermatol*. 2006;24:201–12. doi:10.1016/j.clinidematol.2005.11.011
- Criseo G, Malara GG, Romeo O, Guerra AP. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. *Mycopathologia*. 2008;166:159–62. doi:10.1007/s11046-008-9121-4
- Cafarchia C, Sasanelli M, Lia RP, de Caprariis D, Guillot J, Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from southern Italy: case report. *Mycopathologia*. 2007;163:75–9. doi:10.1007/s11046-006-0086-x
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. 2nd ed. CLSI document M38-A2. Wayne (PA): The Institute; 2008.

Address for correspondence: Nicolina Marques Dias, Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; email: [nidias@deb.uminho.pt](mailto:nidias@deb.uminho.pt)

## Swinepox Virus Outbreak, Brazil, 2011

**To the Editor:** *Swinepox virus* (SWPV), which replicates only in swine, belongs to the *Suiopoxvirus* genus of the *Poxviridae* family. It is the etiologic agent of a skin disease of pigs, characterized by generalized pustular lesions and associated with high rates of illness (occasionally >80%). It occurs mainly on farms with poor management and housing conditions and affects primarily pigs <3 months of age; adult pigs show milder signs. The disease is mechanically transmitted by pig lice or through direct animal contact (1). *Vaccinia virus* (VACV; *Orthopoxvirus* genus) also causes a similar pustular disease in pigs that is difficult to distinguish clinically from SWPV infections. VACV infections were common during smallpox vaccination

## Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil

Manoel Marques Evangelista Oliveira<sup>1/+</sup>, Simone Bravim Maifrede<sup>2</sup>,  
Mariceli Araújo Ribeiro<sup>2</sup>, Rosely Maria Zancope-Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

*Sporotrichosis* is a widespread subcutaneous mycosis caused by the dimorphic fungi now known as the *Sporothrix schenckii* complex. This complex is comprised of at least six species, including *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* and *S. schenckii*. Cases of sporotrichosis have significantly increased in Brazil over the past decade, especially in the state of Rio de Janeiro (RJ), where an epidemic among cat owners has been observed. The zoonotic transmission from cats to humans suggests a common source of infection and indicates that animals can act as vectors. We performed a molecular characterisation of samples collected during the first outbreak of familial sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* in the state of Espírito Santo, Brazil. These results represent the first description of such an outbreak outside the endemic area of zoonotic sporotrichosis in RJ.

Key words: *Sporothrix brasiliensis* - sporotrichosis - Espírito Santo - outbreak - calmodulin gene - taxonomy

Sporotrichosis is a widespread subcutaneous mycosis with high endemicity in Latin America, South Africa, India and Japan (Lopez-Romero et al. 2011). The infection is caused by dimorphic fungi of the *Sporothrix schenckii* species complex (Marimon et al. 2007), which is comprised of at least six species, including *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* and *Sporothrix schenckii* (Marimon et al. 2007, 2008). In humans, sporotrichosis is classically known as gardener's disease and is generally associated with soil transmission. In the sporotrichosis epidemic that occurred in the state of Rio de Janeiro (RJ), Brazil, transmission of the disease was associated with scratches or bites from cats infected with *S. schenckii* (Schubach et al. 2008).

A species-level classification of the *Sporothrix* complex has now been proposed (Marimon et al. 2007). In a previous study, Oliveira et al. (2011) disagreed with earlier data published by Marimon et al. (2007) that assumed that the differentiation of species within the *Sporothrix* complex could be easily accomplished without molecular methods. Our group has reported that the correlation between molecular data and phenotypic characteristics is crucial for the identification of species in the *Sporo-*

*thrix* complex. In the current study, we characterised four *Sporothrix* strains at the species level using a polyphasic analysis (Oliveira et al. 2011). The strains were obtained from sporotrichosis cases that occurred in one cat (ES213) and three family members (ES210, ES211 and ES212; ages 30, 14 and 10 years, respectively) from a rural area in the state of Espírito Santo (ES). The patients developed skin ulcers with irregular borders and satellite microabscesses located in the lower buttocks, thighs and neck as clinically and epidemiologically described by Falqueto et al. (2012). The isolated strains were compared with the following three control strains: *S. brasiliensis* (CBS 120339; formerly IPEC 16490) (Marimon et al. 2007), *S. schenckii* (IPEC 27722) (Oliveira et al. 2011) and *S. globosa* (IPEC 27135) (Oliveira et al. 2011).

The phenotypic characteristics of the isolates are shown in the Table. Overall, the sympodial conidia of the isolates were hyaline or slightly pigmented. The greatest fungal growth was observed at 30°C with a minimum colony diameter of 37 mm and a maximum colony diameter of 45 mm. At 37°C, a colony diameter minimum of 9 mm and a colony diameter maximum of 13 mm were observed.

Assimilation tests using dextrose, sucrose and raffinose were performed in triplicate in yeast nitrogen base medium. After 10 days, the four isolates assimilated only sucrose and glucose (Table). All isolates showed a biochemical pattern of carbohydrate assimilation typical of *S. globosa* or *S. albicans* according to Marimon's key. However, the average colony diameter at 30°C (diameter of the colonies not exceeding 50 mm) excluded *S. albicans* in this case; in addition the strains produce dematiaceous conidia. The isolates also could not be classified as *S. globosa* because they were thermotolerant. The isolates were therefore presumptively identified as *Sporothrix* spp based on phenotypic characteristics.

doi:

MMEO was supported by CAPES (2445/11-5), RMZO was supported in part by CNPq (350338/2000-0).

+ Corresponding author: manoel.marques@ipecc.fiocruz.br

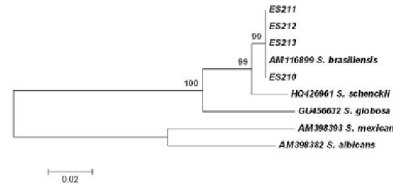
Received 19 February 2013

Accepted 13 June 2013

TABLE  
Phenotypic and genotypic characteristics of *Sporothrix* species complex from the state of Espírito Santo, Brazil

| Species                                | Conidia (%)  |            |           |   | Colony diameter |      |              |            | Assimilation test |         |           |   | Genotypic sequencing   |
|--|--------------|------------|-----------|---|-----------------|------|--------------|------------|-------------------|---------|-----------|---|------------------------|
|  | Dematiaceous |            | Hyaline   |   | Range           |      | Average ± SD |            | Glucose           | Sucrose | Raffinose |   |                        |
|  | Globose      | Triangular | Elongated |   | 30°C            | 37°C | 30°C         | 37°C       |                   |         |           |   |                        |
| <i>Sporothrix brasiliensis</i> (type)  | 0            | 1          | 0         | 0 | 35              | 13   | 35 ± 0       | 13 ± 0     | +                 | -       | -         | - | <i>S. brasiliensis</i> |
| <i>Sporothrix</i> spp (4) <sup>a</sup> | 4            | 0          | 0         | 0 | 37-45           | 9-13 | 41 ± 3.4     | 10.7 ± 1.7 | +                 | +       | +         | + | <i>S. brasiliensis</i> |
| <i>Sporothrix schenckii</i> (control)  | 0            | 1          | 0         | 0 | 51              | 3    | 51 ± 0       | 3 ± 0      | +                 | +       | +         | + | <i>S. schenckii</i>    |
| <i>Sporothrix globosa</i> (control)    | 1            | 0          | 0         | 0 | 34              | 7    | 34 ± 0       | 7 ± 0      | +                 | +       | +         | + | <i>S. globosa</i>      |
| Total                                  | 5            | 2          | 0         | 0 |                 |      |              |            |                   |         |           |   |                        |

a: sampling not identified to species level by phenotypic tests; SD: standard deviation; +: positive; -: negative.



Consensus tree of *Sporothrix* based on partial calmodulin gene sequences of four strains and the National Center for Biotechnology Information public GenBank sequences AM398393.1 (*Sporothrix mexicana*), AM398382.1 (*Sporothrix albicans*), AM116899.1 (*Sporothrix brasiliensis*), HQ426961.1 (*Sporothrix schenckii*) and GU456632.1 (*Sporothrix globosa*) that was constructed with MEGA version 4.0.2 and 1,000 bootstrap replicates.

Genomic DNA was obtained from the isolates in mould phase and sequencing of the partial calmodulin-encoding gene (CAL) was performed as previously described (Oliveira et al. 2010, 2011) using the Genomic Platform-DNA Sequencing at Oswaldo Cruz Foundation (RPT01A) in Brazil. The similarity of the partial CAL gene sequences to those obtained from the National Center for Biotechnology Information GenBank database confirmed with high bootstrap support that all isolates were *S. brasiliensis* (Figure). All sequences were deposited in the GenBank database under accessions JQ915210 through JQ915213.

During the past decade, cases of sporotrichosis have significantly increased in Brazil. The occurrence of these cases has been particularly evident in RJ; here, an epidemic resulting from zoonotic transmission from cats to humans has been observed, leading to small outbreaks among cats owners and veterinary professionals. Such an outbreak suggests a common source of infection between humans and cats and indicates that animals can act as vectors for the transmission of this fungal disease (Schubach et al. 2008, Reis et al. 2009).

All isolates were obtained from individuals living in a rural area in ES. ES borders RJ, which is endemic to zoonotic sporotrichosis (Falqueto et al. 2012). The outbreak in ES showed similarities to cases of epidemic sporotrichosis reported in RJ, including the fact that most individuals affected were women that were engaged in domestic duties, in contact with sick cats and were from low-income areas (Freitas et al. 2010). These similarities suggest that this emerging disease could be spreading in Brazil.

To our knowledge, this is the first molecular characterisation of a familial outbreak of zoonotic sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* outside of the endemic area in RJ.

REFERENCES

Falqueto A, Maifrede SB, Ribeiro MA 2012. Unusual clinical presentation of sporotrichosis in three members of one family. *Int J Dermatol* 51: 434-438.

Freitas DF, do Valle AC, Almeida-Paes R, Bastos FI, Galhardo MC 2010. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis* 50: 453.

- Lopez-Romero E, Reyes-Montes MR, Perez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagomez-Castro JC, Mora-Montes HM, Flores-Carreón A, Torricello C 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* 6: 85-102.
- Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 45: 3198-3206.
- Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J 2008. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* 46: 621-625.
- Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Barros MBL, Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia* 169: 359-363.
- Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM 2011. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia* 172: 257-267.
- Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz MM, Tavares PMS, Monteiro PCF, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM 2009. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 769-774.
- Schubach A, Barros MB, Wanke B 2008. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 21: 129-133.



1 **Note**

2

3 **First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix***  
4 ***globosa* in Portugal**

5 **Running Title:** *Sporothrix globosa* in Portugal.

6 Manoel Marques Evangelista de Oliveira<sup>1,2</sup>, Cristina  
7 Veríssimo<sup>3</sup>, Raquel Sabino<sup>3</sup>, João Aranha<sup>4</sup>, Rosely Maria  
8 Zancopé-Oliveira<sup>2</sup>, Paula Sampaio<sup>1</sup> and Célia Pais<sup>1</sup>

9 **Author affiliations:**

10 <sup>1</sup> Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA),  
11 Department of Biology, University of Minho, Braga, Portugal.

12 <sup>2</sup> Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica  
13 Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,  
14 Brasil.

15 <sup>3</sup> Laboratório de Micologia, Departamento de Doenças  
16 Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
17 (INSA), Lisboa, Portugal.

18 <sup>4</sup> Hospital Distrital de Santarém, Santarém, Portugal

19 **Keywords:** *Sporothrix globosa*, sporotrichosis, Portugal,  
20 autochthone case, T3B

21 Address for correspondence: Manoel Marques Evangelista  
22 Oliveira, Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de  
23 Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas,  
24 Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de  
25 Janeiro 21045-900 Brazil. Phone: (55-21) 3865 9640 Fax: (55-  
26 21) 3865 9557. Electronic mail address:  
27 [manoel.marques@ipecc.fiocruz.br](mailto:manoel.marques@ipecc.fiocruz.br); [manoelmeo@gmail.com](mailto:manoelmeo@gmail.com)

1

28 **Abstract**

29 In this study we characterize the first autochthone case of  
30 human sporotrichosis reported in Lisbon, Portugal. Phenotypic  
31 and genotypic characterization revealed that the infection was  
32 caused by *Sporothrix globosa*. We conclude that sporotrichosis  
33 may be under diagnosed particularly in Southern Europe, and  
34 suggest Portugal as an emerging area for this fungal infection.

35

36

37

38

39

40

41 **Text – 984 words**

42 **To the Editor:**

43 Sporotrichosis is a subcutaneous cosmopolitan mycosis that  
44 affects humans and other animals, being Latin America, South  
45 Africa, India and Japan the areas of high endemicity (Lopez-  
46 Romero et al., 2011). This infection is caused by the dimorphic  
47 fungus previously described as a single species, *Sporothrix*  
48 *schenckii*, **but recently the so-called *S. schenckii* complex as**  
49 **been described comprising the medically relevant agents of**  
50 **sporotrichosis, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S.***  
51 ***mexicana*, and *S. schenckii sensu stricto* (Marimon et al., 2007,**  
52 **2008; de Meyer et al., 2008). Other species such as *S. pallida***  
53 **have only been isolated from the environment (Marimon et**  
54 **al., 2007, 2008; de Meyer et al., 2008; Madrid et al., 2009;**  
55 **Romeo et al., 2011). An identification key for the *Sporothrix***  
56 **species complex differentiation has been proposed (Marimon et**  
57 **al., 2007) including analysis of conidial morphology,**  
58 **auxonogram analysis of raffinose and sucrose assimilation, and**  
59 **sequencing of calmodulin (CAL) and/or  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ -tub) genes**  
60 **(Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al.,**  
61 **2013). Recently Zhou and collaborators (2013) suggested**  
62 **that ITS region analysis could also be applied for**  
63 **identification at the species level of the *Sporothrix* complex.**  
64 In humans, sporotrichosis is usually associated with puncture  
65 injuries in farmers, florists, leisure gardeners, nursery workers,

66 landscapers or greenhouse workers. In 2008 a sporotrichosis  
67 epidemic was described in Rio de Janeiro, Brazil, in which the  
68 transmission of the disease occurred mainly through scratches  
69 or bites of *S. schenckii sensu lato* infected cats (Schubach et al.,  
70 2008). Few cases of sporotrichosis have been described in  
71 Europe, mainly in Italy but also in Spain, United Kingdom, and  
72 in Portugal (Cafarchia et al., 2007; Dias et al., 2011). However,  
73 the Portuguese case of human sporotrichosis due to *S. mexicana*  
74 occurred in a patient that had traveled to Malaysia in 2003, and  
75 therefore could not be regarded as autochthone (Dias et al.,  
76 2011).

77 In this study we characterize a new case of human  
78 sporotrichosis identified in Lisbon. This case occurred in an  
79 immunocompetent patient, which developed skin lesion in the  
80 right hand with localized lymphocutaneous sporotrichosis  
81 (Fig.1). The patient did not remember the date or the local  
82 where the trauma occurred and, to our knowledge, has never  
83 left Portugal. Skin biopsy was received at the INSA Mycology  
84 Laboratory for testing. Direct microscopic examination with  
85 10% KOH and culture of biopsy fragments on enriched  
86 medium (Blood agar) and Sabouraud agar, followed by  
87 incubation at 35°C for 5-10 days, allowed the isolation of strain  
88 INSA378027. The infecting isolate was initially identified as *S.*  
89 *schenckii* based on morphologic features. In order to confirm  
90 the identity of the isolate a detailed phenotypic analysis was



91 performed, including four control strains: the type strain of *S.*  
92 *brasiliensis* CBS 120339 (former IPEC16490) (Marimon et al.,  
93 2007), and the reference strains IPEC27722 (*S. schenckii*),  
94 IPEC27135 (*S. globosa*) and MUM11.02 (*S. mexicana*) (Dias et  
95 al., 2011; Oliveira et al., 2010, 2011). The microscopic features  
96 and sporulation analyzed in Cornmeal and Potato dextrose agar  
97 (PDA) showed clusters of intercalary or terminal conidia  
98 formed by sympodial growth from differentiated conidiophores  
99 on both media. Sympodial conidia were hyaline or slightly  
100 pigmented. Sessile conidia were predominantly globose and  
101 dematiaceous (**Fig. 2C and 2D**). The colony diameter on PDA  
102 after 21 days of incubation attained 35mm at 30°C (**Fig. 2B**)  
103 and 5mm at 37°C (**Fig. 2A**). The conversion to the yeast form  
104 was achieved by incubating the isolate on Brain Heart Infusion  
105 agar (BHI) slants at 35°C  $\pm$ 2°C for 7 days in a single  
106 subculture. Carbohydrate assimilation tests run in triplicate  
107 showed that the *Sporothrix* isolate (INSA378027) **assimilated**  
108 **glucose as well as sucrose and did not assimilate raffinose,**  
109 **an atypical phenotype of *S. globosa* species** (Marimon et al.,  
110 2007).  
111 Genomic DNA was extracted from the mycelial phase for  
112 sequencing of the partial  $\beta$ -tub-encoding gene (Marimon et al.,  
113 2007), **partial CAL-encoding gene (Oliveira et al., 2010)** and  
114 for T3B PCR fingerprinting (Oliveira et al., 2012). The BLAST  
115 analysis comparing the  $\beta$ -tub **and CAL** sequences obtained for

116 INSA378027 isolate in the NCBI GenBank database identified  
117 this isolate as *S. globosa* with **99-100%** similarity with other *S.*  
118 *globosa* sequences (AM116961, AM116964, AM116965,  
119 AM116966, AM116967, **GU456632, KC121567, AM116907,**  
120 **AM116908**). Moreover, comparison and **phylogenetic analysis**  
121 **of the partial  $\beta$ -tub and CAL sequences obtained from *S.***  
122 ***globosa* strain INSA378027 with the reference strain**  
123 **FMR8600 available in GenBank database presented 100%**  
124 **similarity among them and also showed high bootstrap**  
125 **support values for both genes (Fig. 3A and 3B). The**  
126 **sequences obtained for  $\beta$ -tub and CAL-encoding genes were**  
127 **deposited in the GenBank database under accession**  
128 **number KC716083 and KF437620.** The T3B PCR  
129 fingerprinting profile obtained for strain INSA378027 was  
130 identical to the *S. globosa* reference strain, corroborating once  
131 more the *S. globosa* identification (Fig. 3C). *In vitro* antifungal  
132 disk diffusion susceptibility testing was determined (CLSI,  
133 2010) and showed an inhibition zone diameter of 50 mm to  
134 ketoconazole and 40 mm to miconazole, suggesting *in vitro*  
135 susceptibility to these antifungals. However, the disk inhibition  
136 zone diameter to fluconazole, itraconazole and voriconazole  
137 was less than 0.5 mm, indicating *in vitro* reduced susceptibility  
138 to these antifungals, **data similar to those reported by other**  
139 **study with isolates of *S. globosa* (Marimon et al., 2008).**  
140 Overall, our results indicate that the reported infection was due

141 to *S. globosa* and highlight the need of an integrated phenotypic  
142 and molecular analysis for the identification of *Sporothrix*  
143 isolates, as previously suggested (Oliveira et al., 2011;  
144 **Rodrigues et al., 2013; Zhou et al., 2013**).

145 Isolates of *S. globosa* have been reported from United  
146 Kingdom, Spain, Italy, China, Japan, USA, India, Mexico,  
147 Guatemala, Brazil and Colombia (Madrid et al., 2009;  
148 Cafarchia et al., 2007; Dias et al., 2011; Oliveira et al., 2010,  
149 2011). In this study, we report the identification of the first  
150 autochthone sporotrichosis case in Portugal due to *S. globosa* and  
151 showing *in vitro* reduced susceptibility to fluconazole,  
152 itraconazole and voriconazole. This report indicates that  
153 sporotrichosis may be under diagnosed particularly in Southern  
154 Europe, and suggest Portugal as an emerging area for this  
155 fungal infection.

#### 156 **Acknowledgements**

157 This research was supported by FEDER funds through the  
158 Operational Programme COMPETE and national funds through  
159 Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), in the scope of  
160 project PEst-C/BIA/UI4050/2011, and by FAPERJ/Rio de  
161 Janeiro, Brazil (grant proc. E-26/110.619/2012) R. M. Z-O. is  
162 supported in part by CNPq 350338/2000-0 and FAPERJ E-  
163 26/103.157/2011. M. M. E. O. was supported by a grant from  
164 CAPES 2445/11-5.

165

166 **References**

167

168 Cafarchia C, Sasanelli M, Lia RP, de Caprariis D, Guillot J,  
169 Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog  
170 from southern Italy: case report. *Mycopathologia* 2007;  
171 163(2):75-79.

172

173 CLSI Reference method for antifungal disk diffusion  
174 susceptibility testing of non dermatophyte filamentous fungi,  
175 approved guideline, first edition, CLSI document 51-A, Wayne,  
176 PA. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.

177

178 de Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM,  
179 de Hoog GS, Vismer HF, Wingfield MJ. Taxonomy and  
180 phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species  
181 in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex.  
182 *Mycologia* 2008; 100(4):647-661.

183

184 Dias NM, Oliveira MM, Santos C, Zancope-Oliveira RM, Lima  
185 N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal.  
186 *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17(10):1975-1976.

187

188 Lopez-Romero E, Reyes-Montes M del R, Perez-Torres A,  
189 Ruiz-Baca E, Villagomez-Castro JC, Mora-Montes HM, et al.  
190 *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging  
191 health problem. *Future microbiology* 2011; 6:85-102.

192

193 Madrid H, Cano J, Gene J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J  
194 *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread  
195 geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26:218-  
196 222.

197

198 Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J  
199 *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new  
200 *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2007;  
201 45:3198-3206.

202

203 Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J *Sporothrix luriei*: a rare  
204 fungus from clinical origin. *Med Mycol* 2008; 46:621-625.

205

206 Oliveira MME, de Almeida-Paes R, de Medeiros Muniz M, de  
207 Lima Barros MB, Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM.  
208 Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro,  
209 Brazil: case report. *Mycopathologia* 2010; 169(5):359-363.

210

211 Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-  
212 Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Phenotypic and  
213 Molecular Identification of *Sporothrix* Isolates from an

214 Epidemic Area of Sporotrichosis in Brazil. Mycopathologia  
215 2011; 172(4):257-267.  
216  
217 Oliveira MME, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-  
218 Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Rapid identification of  
219 *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. J Clin Microbiol  
220 2012; 50:2159-2162.  
221  
222 Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of  
223 pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. Med Mycol  
224 2013; 51(4):405-412.  
225  
226 Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular  
227 phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species  
228 complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian  
229 isolates. Mycopathologia 2011; 172(3):179-186.  
230  
231 Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis.  
232 Current Opinion in Infectious Diseases 2008; 21:129-133.  
233  
234 Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, Hoog GS. Global ITS  
235 diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. Fungal Diversity  
236 2013; "epub ahead of print".  
237  
238 **Transparency Declaration**  
239 All authors declare no conflicting interests.  
240  
241 **FIG. 1.**  
242 **Skin lesion on the right hand of patient with localized**  
243 **limphocutaneous sporotrichosis.**  
244  
245 **FIG. 2.**  
246 ***S. globosa*: morphological aspects at 37°C (A), and 30°C**  
247 **(B). Sessile conidia 400X (C), SEM photograph showing the**  
248 **sessile conidia (D).**  
249  
250  
251 **FIG. 3.**  
252 **Neighbor-joining phylogram of the partial  $\beta$ -tub (A) and**  
253 **partial CAL (B) gene obtained of INSA378027 isolate and**  
254 ***S. mexicana*, *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. schenckii* and *S.***

255 *globosa* reference strains constructed with MEGA version  
256 4.0.2. Bootstrap values after 1,000 replicates are presented  
257 in the branch node.  
258 C) Comparison of the T3B PCR fingerprinting profiles  
259 obtained for INSA378027 isolate with the *Sporothrix* reference  
260 strains: (1) *S. globosa* (IPEC 27135), (2) *S. mexicana* (MUM  
261 11.02), (3) *S. brasiliensis* (IPEC 16490) (4) *S. schenckii*  
262 (IPEC27722), (5) negative control and (M) Molecular marker  
263 DNA ladder, 100 bp (Invitrogen).  
264  
265

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)



Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

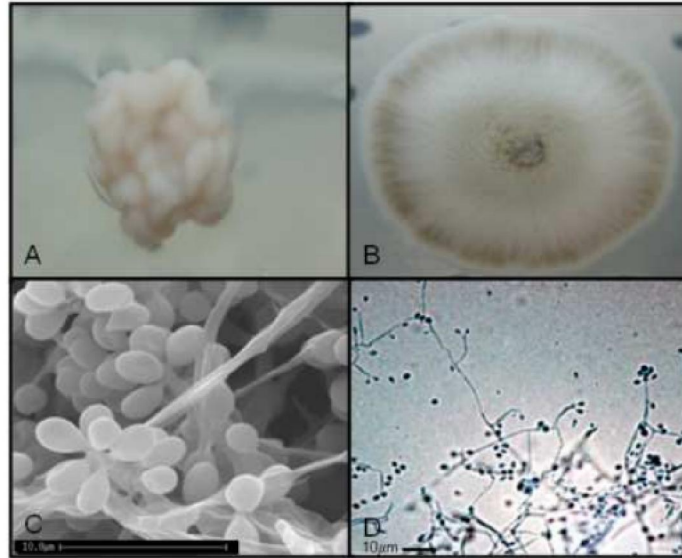
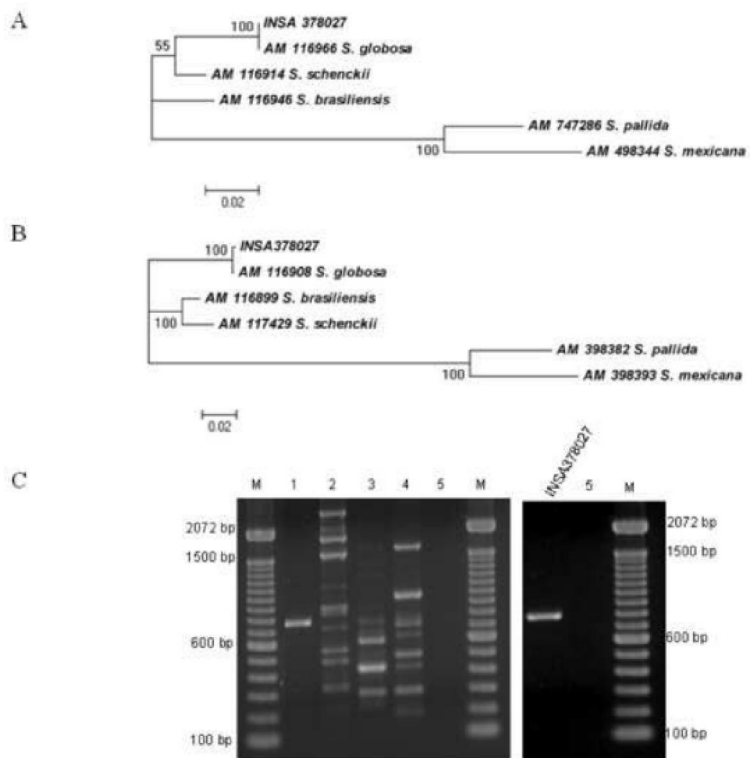




Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)



| Manuscript Number<br>▲▼ | Title<br>▲▼   | Initial Date Submitted<br>▲▼ | Status Date<br>▲▼ | Current Status<br>▲▼ | Date Final Disposition Set<br>▲▼ | Final Disposition<br>▲▼ |
|-------------------------|---|------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|
| DMID-07-626             | First autochthone case of sporotrichosis by Sporothrix globosa in Portugal. | May 28, 2013                 | Aug 23, 2013      | Completed - Accept   | Aug 23, 2013                     | Accept                  |

Inclusão de nova metodologia baseada em ácidos nucleicos para caracterização de espécies do complexo *Sporothrix*.

Nesse estudo descrevemos uma PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B, para distinguir as espécies do complexo *Sporothrix*: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, e *S. schenckii*. Essa metodologia gerou padrões de bandas distintos, permitindo a correta identificação de todos os 35 isolados clínicos incluídos no estudo em nível de espécie, confirmados pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina. Esta metodologia é simples, confiável, rápida e de baixo custo, sendo um sistema de identificação ideal para utilização em laboratórios clínicos de micologia que não disponham de equipamentos sofisticados para o sequenciamento de DNA.

## Rapid Identification of *Sporothrix* Species by T3B Fingerprinting

Manoel Marques Evangelista de Oliveira,<sup>a</sup> Paula Sampaio,<sup>b</sup> Rodrigo Almeida-Paes,<sup>a</sup> Célia Pais,<sup>b</sup> Maria Clara Gutierrez-Galhardo,<sup>a</sup> and Rosely Maria Zancoppe-Oliveira<sup>a</sup>

Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,<sup>a</sup> and Molecular and Environmental Biology Centre (CBMA), Universidade do Minho, Braga, Portugal<sup>b</sup>

This article describes PCR fingerprinting using the universal primer T3B to distinguish among species of the *Sporothrix* complex, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, and *S. schenckii*. This methodology generated distinct banding patterns, allowing the correct identification of all 35 clinical isolates at the species level, confirmed by partial calmodulin (CAL) gene sequence analyses. This methodology is simple, reliable, rapid, and cheap, making it an ideal routine identification system for clinical mycology laboratories.

**S**porotrichosis is a globally distributed subcutaneous mycosis with areas of high endemicity (11, 21) that is caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* (22). Sporotrichosis has been regarded as a job-related disease occurring as isolated cases or small outbreaks affecting people exposed to plants or soil (1, 6, 7). Rio de Janeiro State, Brazil, is a region of sporotrichosis hyperendemicity where several human and animal cases have been described since 1998 (5, 23).

The diagnosis of sporotrichosis is attained by clinical, epidemiological, and laboratorial data, including culture and analysis of phenotypic characteristics. The first description of PCR for sporotrichosis' diagnosis was reported in 2001 (9). A diagnostic nested PCR assay targeting the *S. schenckii* 18S rRNA gene was further evaluated and showed high sensitivity and specificity, indicating that PCR may be clinically useful for diagnosis (8).

*S. schenckii* was long considered a single taxon, although great genetic variation within this species has been described (10). By associating phenotypic and genotypic features, Marimon et al. (13) recognized three new species, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, and *Sporothrix mexicana*, and proposed an identification key for these *Sporothrix* species. *S. globosa* has worldwide distribution (12, 18), whereas *S. brasiliensis* is apparently restricted to Brazil (13) and *S. mexicana* to Mexican environmental samples (13), although the latter was recently identified in Portugal (3). Additionally, these authors have proposed the promotion of *S. schenckii* var. *luriei* to the status of a new species, *Sporothrix luriei* (14). However, identification based only on phenotypic characteristics is often inconclusive due to phenotypic variability within these species. Therefore, new rapid and reliable identification strategies are necessary (19).

Analysis of tRNA intergenic spacers was first used to distinguish *Streptococcus* species (15). It has also been applied successfully for *Candida* identification (2, 16, 24). Here, we evaluate T3B PCR fingerprinting to differentiate clinical *Sporothrix* strains at the species level in comparison to analysis of partial calmodulin (CAL) gene sequences (19).

Thirty-five *Sporothrix* spp. isolates from the Fungal Culture Collection of IPEC/Fiocruz were included in this study approved by the Ethics Commission of the same institution. Among them, *S. brasiliensis* type strain CBS 120339 (IPEC16490), *S. globosa* IPEC27135 (18), *S. schenckii* IPEC29334 (IOC1226) (19), and *S. mexicana* (MUM11.02) (3) were used as controls. All 35 strains

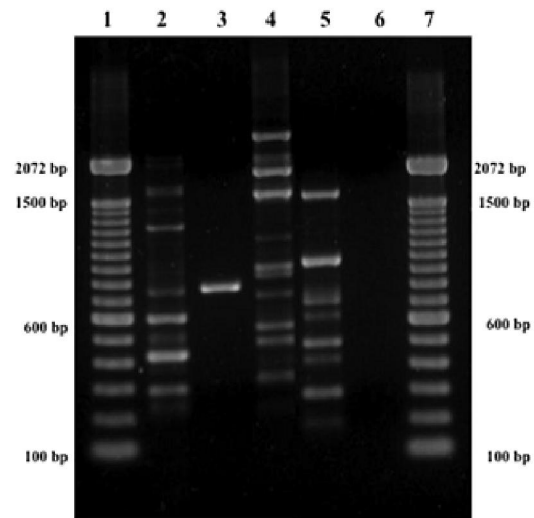


FIG 1 Representative T3B PCR fingerprinting profiles of the *Sporothrix* complex. (1 and 7) Molecular marker DNA ladder, 100 bp (Invitrogen). (2) *S. brasiliensis* (IPEC 16490). (3) *S. globosa* (IPEC 27135). (4) *S. mexicana* (MUM 11.02). (5) *S. schenckii* (IPEC27722). (6) Negative control.

were previously phenotypically characterized (3, 19), and 15 isolates could not be identified (Table 1).

Genomic DNA was extracted from the mycelial phase (25), and PCR was performed with the primer T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3') (24). T3B PCR fingerprinting reproducibility was confirmed by repeating the assays at least 3 times under the same conditions at two different laboratories. The T3B profiles

Received 16 February 2012 Accepted 27 February 2012

Published ahead of print 7 March 2012

Address correspondence to Rosely Maria Zancoppe-Oliveira, rosely.zancoppe@ipecc.fiocruz.br.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00450-12

TABLE 1 Comparison of tools applied in the characterization of strains of the *Sporothrix* complex

| Strain      | Phenotypic identification <sup>a</sup>      | Genotypic characterization        |                                    |                        |
|-------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|
|             |   | Final identification <sup>b</sup> | GenBank accession no. <sup>c</sup> | Reference <sup>d</sup> |
| IPEC16490   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | AM116899                           | 19                     |
| IPEC27445-3 | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426950                           | 19                     |
| IPEC27052   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426941                           | 19                     |
| IPEC27135   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. globosa</i>                 | GU456632                           | 3                      |
| IPEC27387   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426948                           | 19                     |
| IPEC34067   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426952                           | 19                     |
| IPEC27372   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426947                           | 19                     |
| IPEC25011   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426935                           | 19                     |
| IPEC33605   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426957                           | 19                     |
| IPEC27930   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426951                           | 19                     |
| IPEC28772   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426955                           | 19                     |
| IPEC28457   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | JN995607                           | This study             |
| IPEC34007   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426959                           | This study             |
| IPEC27177-2 | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426944                           | 19                     |
| IPEC27087   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426942                           | 19                     |
| IPEC27288   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426945                           | 19                     |
| IPEC27209   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426946                           | 19                     |
| IPEC28604   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426953                           | 19                     |
| IPEC26945   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426939                           | 19                     |
| IPEC27130   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426943                           | 19                     |
| IPEC25521   | <i>Sporothrix</i> sp.*                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426936                           | 19                     |
| IPEC16919   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426930                           | 19                     |
| IPEC18782A  | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426933                           | This study             |
| IPEC28329   | <i>S. schenckii</i> *                       | <i>S. brasiliensis</i>            | JN995610                           | This study             |
| IPEC27022   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426940                           | 19                     |
| IPEC28487   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426928                           | 19                     |
| IPEC28665   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | JN995606                           | This study             |
| IPEC28790   | <i>S. brasiliensis</i>                      | <i>S. brasiliensis</i>            | HQ426956                           | 19                     |
| IPEC29334   | <i>S. schenckii</i>                         | <i>S. schenckii</i>               | HQ426962                           | 19                     |
| IPEC26961   | <i>S. schenckii</i>                         | <i>S. schenckii</i>               | JN995605                           | This study             |
| IPEC27157-1 | <i>S. schenckii</i>                         | <i>S. schenckii</i>               | JN995604                           | This study             |
| IPEC27100   | <i>S. schenckii</i> *                       | <i>S. brasiliensis</i>            | JN995609                           | This study             |
| IPEC27133   | <i>S. schenckii</i> *                       | <i>S. brasiliensis</i>            | JN995608                           | This study             |
| MUM 11.02   | <i>S. mexicana</i> or <i>S. schenckii</i> * | <i>S. mexicana</i>                | JF970258                           | 4                      |
| IPEC27722   | <i>S. mexicana</i> *                        | <i>S. schenckii</i>               | HQ426961                           | 19                     |

<sup>a</sup> Performed according to reference 19. Asterisks indicate incorrect phenotypic identifications.

<sup>b</sup> Calmodulin sequencing and T3B concordant identification.

<sup>c</sup> Of strain used for characterization.

<sup>d</sup> Reference from which the partial gene calmodulin sequencing result was obtained.

were analyzed using the software BioNumerics 5.1 (Applied Maths BVBA, Saint-Martens-Latem, Belgium). Similarity coefficients were calculated using the Dice algorithm, and cluster analysis was performed by means of the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA). Sequencing of the CAL gene was performed as previously described (17) using the sequencing platform at Fiocruz, Brazil (20). Sequences were edited with Sequencer 4.6 (Genes Codes Corporation), aligned with MEGA 4.0.2 software, and compared with sequences available from NCBI GenBank by BLAST. Phylogenetic analyses were performed using MEGA with 1,000 bootstrap replicates (4) (<http://www.megasoftware.net/>).

T3B PCR fingerprinting of control strains showed profiles with DNA fragments ranging from 300 to 1,500 bp that allowed a clear

distinction of *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, and *S. schenckii* (Fig. 1). A dendrogram derived from analysis of the T3B profiles of all isolates splits *Sporothrix* strains into three groups, not the expected four, with IPEC27722, the only strain phenotypically characterized as *S. mexicana*, grouping into the *S. schenckii* cluster. Regardless of this discrepancy, the T3B profiling showed a high correspondence between clusters and *Sporothrix* species, with all isolates clustering with their respective control strain (Fig. 2). The T3B fingerprinting identification was confirmed by comparison with the CAL gene partial sequences obtained along with sequences from the NCBI database, AM398393.1 (*S. mexicana*), AM398382.1 (*Sporothrix albicans*), AM116908 (*S. globosa*), and AM117444.1 (*S. schenckii*). The phylogenetic tree of the CAL locus analyzed by neighbor joining revealed five distinct clades represented by the five species (Fig. 3). Overall, there was 100% agreement between T3B PCR fingerprinting and CAL locus sequencing on species identification. Comparing these results with phenotypic analysis, 14 of the 15 isolates with inconclusive phenotypes

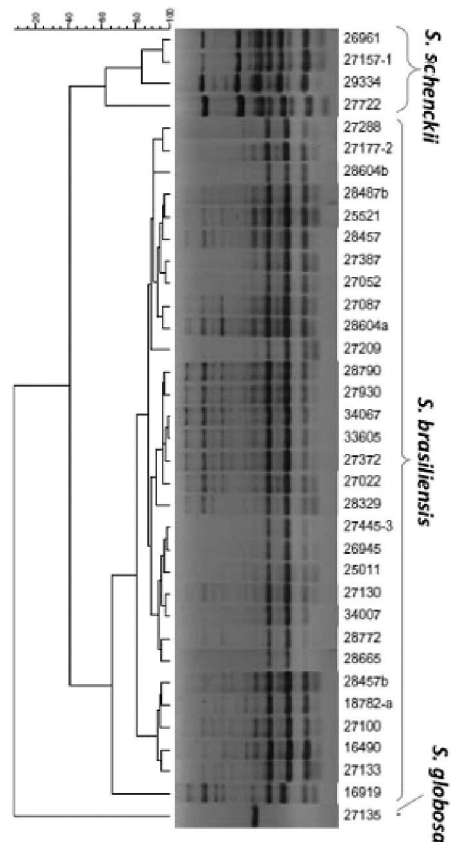


FIG 2 Dendrogram showing the degrees of similarity of T3B fingerprinting profiles among the *Sporothrix* isolates by using the Dice coefficient and the UPGMA cluster method. The cophenetic correlation coefficient (0.97) indicates a very good fit for this analysis.

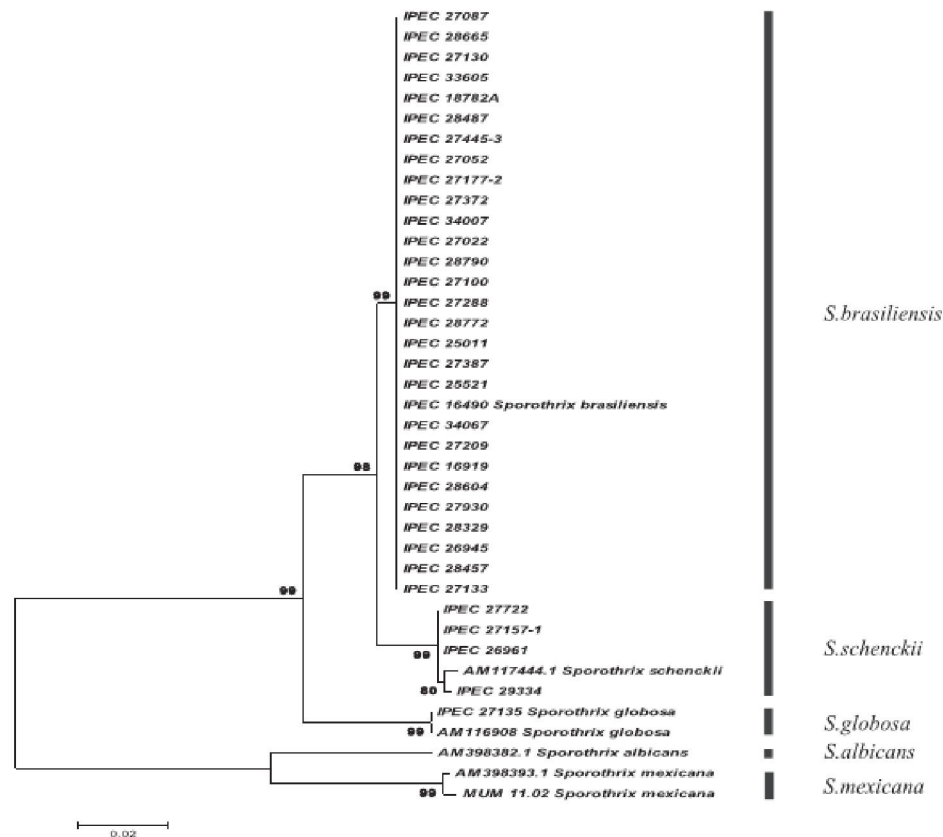


FIG 3 Consensus tree of *Sporothrix* based on partial calmodulin (CAL) gene sequences of 35 strains and the NCBI public GenBank sequences AM398393.1 (*S. mexicana*), AM398382.1 (*S. albicans*), and AM117444.1 (*S. schenckii*) that was constructed with MEGA version 4.0.2 and 1,000 bootstrap replicates.

grouped within the *S. brasiliensis* cluster and IPEC27135 grouped within the *S. globosa* cluster. The genotypic analyses also allowed the correction of phenotypic misidentifications, such as for the isolate IPEC27722, which was phenotypically characterized as *S. mexicana* but grouped within the *S. schenckii* cluster, as well as for the isolates IPEC27133, IPEC27100, and IPEC28329, which identified as *S. schenckii* but clustered with *S. brasiliensis*.

Identification of the *Sporothrix* species complex has been based on a polyphasic approach using a combination of phenotypic methodologies and sequencing (13, 14, 18, 19). The proposed identification key based on phenotypic tests (13) was reported as easy and reliable for species differentiation without the need of molecular techniques. However, the results are often inconclusive or ambiguous, and some species are too closely related to show phenotypic differences. This work describes the assessment of DNA polymorphism within the *Sporothrix* complex by genomic DNA amplification with the single nonspecific primer T3B. The T3B PCR profiles were highly informative and generated clearly distinct banding patterns for each species, allowing their differentiation. *S. brasiliensis* strains showed bands

sharing similarity higher than 80%, but intraspecies variation was observed. This variation was previously demonstrated for *Candida* (2), and band-sharing values observed are within the variation range (70 to 85%) expected for strains within the same species (16).

Comparison of the inconclusive phenotypic identification of isolates with the results obtained by T3B PCR fingerprinting demonstrated the sensitivity of the latter, since species of those strains could all be determined. This proposed identification technique is simple, reliable, rapid, and cheaper and requires less technical expertise than sequencing. The generated, computer-scanned PCR profiles can form the basis of a database which can be used for future identifications of atypical or unidentifiable *Sporothrix* isolates. Furthermore, these advantages are especially valuable in a laboratory with limited facilities, making it an ideal identification methodology for clinical mycology laboratories.

**Nucleotide sequence accession numbers.** All sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers GU456632, HQ426928 to HQ426962, and JN995604 to JN995610.



## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by FAPERJ (grant proc. E-26/111.619/2008). R.M.Z.-O. is supported in part by CNPq 350338/2000-0. M.M.E.D.O. was supported in part by a Cytel Grant (RED MICOMOL-CYTED C1FG8231770) for his work at CBMA, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

We thank M. M. Muniz and R. Franco-Duarte for their assistance and N. Lima for kindly supplying the *S. mexicana* isolate.

Automated sequencing was done using the genomic platform/DNA sequencing platform at Fundação Oswaldo Cruz—PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), Brazil.

## REFERENCES

- Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. 1992. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:169–171.
- Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C. 2004. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42:5899–5903.
- Dias NM, Oliveira MME, Santos C, Zancope-Oliveira RM, Lima N. 2011. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1975–1976.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Freitas DF, Valle ACF, Almeida-Paes R, Bastos FI, Gutierrez-Galhardo MC. 2010. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin. Infect. Dis.* 50:453.
- Hajjeh R, et al. 1997. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *J. Infect. Dis.* 176:499–504.
- Hay RJ, Morris-Jones R. 2008. Outbreaks of sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:119–121.
- Hu S, et al. 2003. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41:1414–1418.
- Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. 2001. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses* 44:261–265.
- Liu X, et al. 2003. Characterization of *Sporothrix schenckii* by random amplification of polymorphic DNA assay. *Chin. Med. J.* 116:239–242.
- Lopez-Romero E, et al. 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* 6:85–102.
- Madrid H, et al. 2009. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev. Iberoam. Micol.* 26:218–222.
- Marimon R, et al. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 45:3198–3206.
- Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J. 2008. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol.* 46:621–625.
- McClelland M, Petersen C, Welsh J. 1992. Length polymorphisms in tRNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *J. Clin. Microbiol.* 30:1499–1504.
- Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC. 2001. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 39:185–193.
- O'Donnell K, Aoki NHT, Cigelnik E. 2000. A multigenic phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61–78.
- Oliveira MME, et al. 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia* 169:359–363.
- Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. 2011. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia* 172:257–267.
- Otto TD, et al. 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet. Mol. Res.* 7:861–871.
- Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobon A, Restrepo A. 2011. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* 49:225–236.
- Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. 2007. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* 25:181–187.
- Schubach A, Barros MB, Wanke B. 2008. Epidemic sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:129–133.
- Thanos M, et al. 1996. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:615–621.
- Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J. Clin. Microbiol.* 31:463–464.

Determinação do perfil proteômico do complexo *Sporothrix*, utilizando metodologia baseada em espectrometria de massa.

Neste capítulo apresentamos resultados preliminares da padronização da metodologia do MALDI-TOF ICMS (espectrometria de massa em célula intacta), para identificação de espécies do complexo *Sporothrix*.

Nos últimos anos, taxonomistas têm buscando ferramentas de identificação mais rápidas e confiáveis. O MALDI-TOF ICMS é uma metodologia recentemente descrita para caracterização e diferenciação de microorganismos em nível de espécie, sendo uma ferramenta complementar para este propósito. Esta técnica requer um número relativamente pequeno de células microbianas intactas [ $10^6$ - $10^7$ ] (Croxatto et al., 2012). Em micologia, o MALDI-TOF ICMS tem sido aplicado a fim de gerar espectros que permitam a caracterização de cada gênero e espécies de fungos estudados. A reprodutibilidade notável desta técnica baseia-se na determinação das proteínas expressas abundantes e constantemente em um intervalo de massa entre 2.000 e 20.000 Da, sendo esta a faixa de análise onde as proteínas ribossomais importantes podem ser utilizadas como possíveis biomarcadores. A metodologia utilizada para fungos filamentosos foi analisada e descrita em detalhe por Santos e colaboradores (2009). Já a descrição do MALDI- TOF ICMS para a identificação de leveduras foi apresentada em detalhe por Santos e colaboradores (2011). No entanto, a identificação das espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix* tem sido negligenciada na literatura quanto a utilização do MALDI-TOF ICMS, sendo que nas bases de dados disponíveis para a identificação por essa metodologia, somente temos disponível espectros de referência para a espécie *S. schenckii*.

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar isolados de referência para espécies do complexo *Sporothrix*, com base em seus perfis de proteômica por MALDI -TOF ICMS. Além disso, a identificação proteômica foi comparada por análise molecular com sequenciamento parcial do gene da calmodulina, onde houve concordância em ambas. Esta é a

primeira vez que esta tecnologia é utilizada para identificar e gerar uma biblioteca das massas de proteínas e espectros de referência, de isolados clínicos e ambientais do complexo *Sporothrix*.

Durante a padronização dessa metodologia utilizamos as duas formas fúngicas, leveduras e filamentos, sendo selecionada a forma leveduriforme após testes iniciais quanto a rapidez e reprodutibilidade dos ensaios, utilizando diferentes temperaturas de crescimento (25°C, 30°C, 36°C e 37°C) e meios de culturas ( PDA, BHI, Mycosel).

As análises dos espectros no MALDI foram realizadas no sistema LNR Axima (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipado com laser de azoto (337 nm), no qual a intensidade do laser foi fixada imediatamente acima do limiar para a produção de íons como previamente descrito (Santos et al., 2011). Resumidamente, doze proteínas ribossomais definidas e provenientes das células intactas de *Escherichia coli* DH5 (4.365,40 , 5.096,80 , 5.381,40 , 6.241,40 , 6.255,40 , 6.316,20 , 6.411,60 , 6.856,10 , 7.158,80 , 7.274,50 , 7.872,10 , 9.742,00 e 12.227,30 Da) foram utilizadas como calibradores externos. A taxa de massas entre 2.000-20.000 Da foi registrada utilizando o modo linear, com um atraso de 104 ns e uma tensão de aceleração de 20 kV.

A matriz selecionada para o estudo foi CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) e os espectros finais foram gerados, somando dois disparos de laser acumulados por perfil e 100 perfis produzidos por amostra, levando a 200 disparos de laser por espectro resumidamente. As listas de pico resultantes foram exportados para o pacote de software SARAMIS® (Spectral Archiving and Microbial Identification System; AnagnosTec, Potsdam - Golm, Alemanha) e serão inseridas como espectros de referência na base.

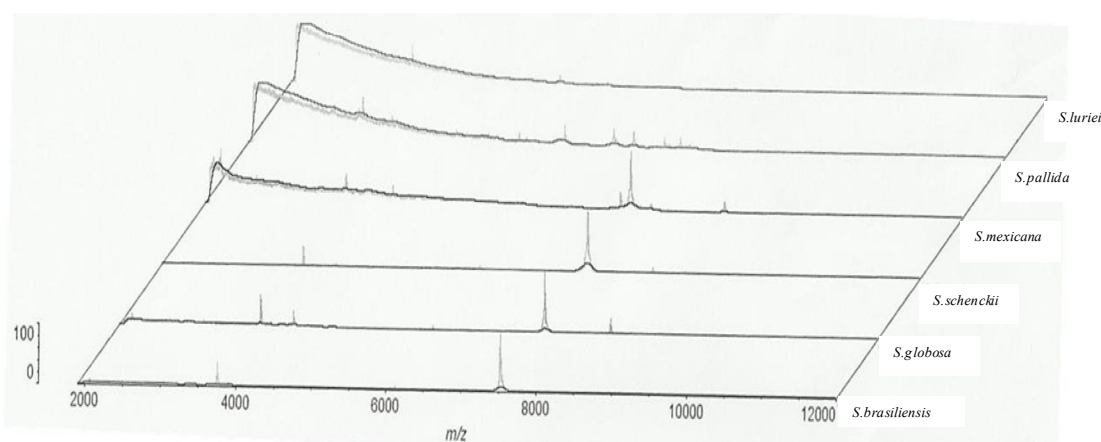
Utilizamos seis isolados do complexo *Sporothrix* caracterizados em nível de espécie em estudos anteriores conforme a tabela 2. Segundo testes prévios citados acima, definimos como tempo mínimo de cultivo, com resultados reprodutíveis, 3 dias à temperatura de 37°C. As células leveduriformes foram então cultivadas em placas de meio BHI durante 72 horas, a 37°C. Uma alça de células leveduriformes ( $10^6$ ) foi diretamente transferida do meio de cultura para cada posição da placa-alvo de 48 poços, e 0,5  $\mu$ L de 25% de ácido fórmico foi imediatamente misturado com as leveduras. Depois da evaporação, 0,5  $\mu$ L de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) foi adicionado e suavemente misturado. Todas as amostras preparadas foram secas ao ar à temperatura ambiente. Cada isolado foi analisado em triplicata.



**Tabela 2. Cepas do complexo *Sporothrix* utilizadas no estudo.**

| Cepa       | Origem    | Espécie                | Referência            |
|------------|-----------|------------------------|-----------------------|
| IPEC 16490 | Clínica   | <i>S. brasiliensis</i> | Marimon et al., 2007  |
| IPEC 27135 | Clínica   | <i>S. globosa</i>      | Oliveira et al., 2010 |
| IPEC 27722 | Clínica   | <i>S. schenckii</i>    | Oliveira et al., 2011 |
| MUM 11.02  | Clínica   | <i>S. mexicana</i>     | Dias et al., 2011     |
| SPA 8      | Ambiental | <i>S. pallida</i>      | Romeo et al., 2011    |
| CBS 937.72 | Clínica   | <i>S. luriei</i>       | Marimon et al., 2009  |

A análise dos espectros obtidos para as espécies do complexo *Sporothrix*, permitiram a diferenciação das espécies, conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1. MALDI-TOF ICMS espectros das seis cepas do complexo *Sporothrix* na fase leveduriforme: Cepa tipo *S. luriei* CBS 937.72, cepas de referência: *S. pallida* SPA8, *S. mexicana* MUM11.02., *S. schenckii* IPEC27722, *S. globosa* IPEC27135; e a cepa tipo de *S. brasiliensis* IPEC16490 (CBS 120.339).**

O MALDI-TOF ICMS parece ser uma poderosa técnica proteômica com alto rendimento e potente poder de discriminação entre as espécies do complexo *Sporothrix*, o que somente é possível por meio da utilização de técnicas moleculares. Essa metodologia apresentou rápida identificação das espécies do complexo *Sporothrix*, com concordância total com o sequenciamento parcial do gene da calmodulina. O equipamento é simples para operar e apresenta baixo custo por amostra individual. Estes resultados são preliminares, pois no momento estamos em fase de finalização das análises e do manuscrito.

## 8. DISCUSSÃO

---

A esporotricose tem aumentado significativamente no Brasil, em especial no estado do Rio de Janeiro nas últimas décadas, com a ocorrência de uma epidemia relacionada à transmissão zoonótica, que envolve gatos doentes e humanos (Schubach et al., 2008). Sabe-se que os pacientes envolvidos nesta epidemia habitam áreas com condições sócio-econômicas desfavoráveis e contam com um precário serviço de saúde (Silva et al., 2012). Além disso, o aumento do número de casos de esporotricose no estado do Rio de Janeiro nos últimos anos está diretamente relacionado à íntima relação de humanos com gatos infectados (Schubach et al., 2008). A transmissão zoonótica de *Sporothrix* spp. tem acarretado em mudanças nas manifestações clínicas usuais da esporotricose, tal como o acometimento primário da mucosa nasal (Schubach et al., 2003), eritema nodoso (Gutierrez-Galhardo et al., 2002), eritema multiforme (Gutierrez-Galhardo et al., 2005), conjuntivite primária (Schubach et al., 2005a), dacriocistite aguda (Freitas et al., 2013) e Síndrome de *Sweet* associada a esporotricose (Freitas et al., 2012a). Também é elevado o número de casos de esporotricose cutânea disseminada, uma forma clínica tradicionalmente menos comum da doença (Barros et al., 2003).

Até 2007, *Sporothrix schenckii* era considerado o agente etiológico da esporotricose e a única espécie patogênica para o homem e animais (Schubach et al., 2005b), embora o gênero *Sporothrix* englobasse várias espécies morfológicamente semelhantes.

Análises prévias utilizando metodologias baseadas na análise de ácidos nucléicos, tais como RAPD e sequenciamento parcial de alguns genes (Reis, 2004; Marimon et al., 2006; Gutierrez-Galhardo et al., 2008) demonstraram o agrupamento de cepas de *Sporothrix* isoladas durante a epidemia do estado do Rio de Janeiro, em clados diferenciados de outros isolados provenientes de outras regiões geográficas no Brasil e de outros países. Alto grau de similaridade genética foi observado entre os isolados provenientes da epidemia, embora tenha sido possível discriminar entre 5 a 10 perfis genotípicos, sugerindo-se mais de uma população de *S. schenckii* circulante (Reis, 2004). Estes resultados sugeriram uma fonte comum de infecção entre humanos e gatos, estes últimos atuando como fontes de infecção do fungo. Mais recentemente, foram demonstrados alguns padrões fenotípicos baseados na

susceptibilidade a fármacos antifúngicos e genotípicos baseados no sequenciamento parcial da reação ITS dos isolados de *S. schenckii* provenientes da endemia do Rio de Janeiro, associados a manifestações clínicas raras da esporotricose e sua correlação com as diferentes formas clínicas (Gutierrez-Galhardo et al., 2008). Novamente, estes dados sugeriram uma fonte comum de infecção.

Marimon e colaboradores (2007) sugeriram que *S. schenckii* não deveria ser considerada a única espécie causadora da esporotricose, uma vez que através da combinação de características fenotípicas e genéticas estudadas em 127 isolados de *S. schenckii* foi proposta à criação de três novas espécies dentro deste complexo: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*, sendo que *S. brasiliensis* seria a cepa circulante responsável pela ocorrência da endemia em nosso estado. Posteriormente, o mesmo grupo descreve *S. luriei* como uma nova espécie (Marimon et al., 2008). Entretanto, apenas 25 isolados oriundos de pacientes com esporotricose provenientes desta endemia foram incluídos no estudo relacionado de Marimon e colaboradores (2007). Esta amostragem não é representativa da endemia de esporotricose do Estado do Rio de Janeiro, uma vez que até o presente, aproximadamente 2.094 isolados estão sendo mantidos em nosso laboratório. Com isso, o nosso grupo percebeu a importância da confirmação taxonômica destes isolados relacionados à endemia de esporotricose que vem ocorrendo no estado do Rio de Janeiro, e sua circulação em nosso meio. Portanto, foi feito um estudo contínuo inicialmente, de caracterização em nível de fenótipo utilizando características macroscópicas e microscópicas, fisiológicas e bioquímicas dos cultivos, os quais segundo Marimon e colaboradores (2007, 2008) permitem a caracterização de espécies do gênero *Sporothrix*.

Finalizamos a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados utilizados no estudo, totalizando 246 isolados obtidos de pacientes com esporotricose atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatologia do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC), entre o ano de 1998-2008 e um isolado ambiental (Oliveira et al., 2011). Nesse estudo foram descritas como espécies do complexo *Sporothrix* acometendo pacientes atendidos no IPEC: *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*, sendo este último o primeiro relato de caso de esporotricose por *S. globosa* no Brasil (Oliveira et al., 2010). Em 25 (10,1%) isolados não foi possível finalizar a classificação taxonômica dos isolados em nível de espécie somente com a caracterização fenotípica, sendo os mesmos classificados como *Sporothrix* spp. Esses

isolados foram sequenciados utilizando o gene parcial da calmodulina e 24 foram classificados como *S. brasiliensis* e um como *S. globosa* (Oliveira et al., 2010). Conforme descrito em nossos estudos (Oliveira et al., 2010, 2011), para a caracterização das espécies do complexo *Sporothrix* deve ser utilizada a taxonomia polifásica. Recentemente, os estudos de Rodrigues e colaboradores (2013) e Zhou e colaboradores (2013) também corroboram nossos dados demonstrando a necessidade da associação de ferramentas fenotípicas e genotípicas na identificação das espécies do complexo *Sporothrix* spp.. A caracterização de espécies do complexo *Sporothrix* foi a maior reportada na literatura especializada até o presente.

Objetivando realizar a comparação fenotípica e genotípica dos isolados do complexo *Sporothrix* obtidos no estado do Rio de Janeiro com isolados obtidos em outras regiões geográficas, recebemos um isolado oriundo de um paciente de Vila Nova de Famalicão, Portugal. Na identificação presuntiva baseada nas características fenotípicas este isolado foi caracterizado como *S. mexicana*, porém apresentava perfil morfológico atípico segundo os critérios descritos por Marimon e colaboradores (2007). Esse isolado apresentou crescimento da colônia à 30°C de 40mm, ao invés de maior o igual a 50mm, conforme determinado na chave de identificação. A caracterização como *S. mexicana* foi confirmada pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina, sendo este o primeiro relato de caso de esporotricose humana causada por *S. mexicana* no mundo (Dias et al., 2011). Realizamos também a caracterização morfológica e molecular de isolados recebidos de um surto de esporotricose no estado do Espírito Santo (ES), sendo os casos clínicos descritos por Falqueto e colaboradores (2012). Nesse estudo relatamos o primeiro surto familiar de esporotricose por *S. brasiliensis* fora da área endêmica de esporotricose no Rio de Janeiro. Nesse trabalho as cepas foram obtidas de três membros de uma família com idades de 30, 14 e 10 anos; e do gato da família. Os pacientes desenvolveram lesões de pele com bordos irregulares e microabcessos localizados nas nádegas, coxa e pescoço. Com o intuito de realizar a caracterização das cepas do surto em nível de espécie, realizamos identificação polifásica (Oliveira et al., 2013a). Nos testes fenotípicos os isolados foram presuntivamente identificados como *Sporothrix* spp. e realizando o estudo genotípico, com o sequenciamento parcial do gene da calmodulina, todas as cepas foram classificadas como

*S. brasiliensis*. Esses isolados foram obtidos conforme relatado acima, de indivíduos moradores de zona rural do ES, estado vizinho do estado do RJ, o qual é zona endêmica de esporotricose zoonótica. Este surto apresentou similaridade com os casos da epidemia de esporotricose no RJ, incluindo o fato que nessa epidemia a maioria dos pacientes são mulheres que desenvolvem atividades domésticas, contato com gatos doentes e vivendo em zona de baixo poder econômico (Freitas et al., 2010). Essas similaridades sugerem que esta é uma doença emergente e que pode estar se dispersando pelo Brasil, tendo os felinos como reservatórios em potencial.

No ano de 2011, conforme descrito anteriormente, publicamos um trabalho com o primeiro caso de esporotricose em Portugal causado por *S. mexicana* (Dias et al., 2011). Porém esse caso ocorreu em um paciente com história de viagem a Malásia no ano de 2003. Portanto não podemos afirmar que seja um caso autóctone. Na busca de maior conhecimento da esporotricose em Portugal, realizamos a caracterização de um novo caso de esporotricose humana em Lisboa. Esse caso ocorreu em um paciente imunocompetente, no qual foi observada lesão de pele na mão direita com esporotricose linfocutânea localizada. Durante a identificação presuntiva, a cepa foi identificada no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa, como *S. schenckii*. Com a realização dos testes fenotípicos e genotípicos em nosso laboratório caracterizamos essa cepa com *S. globosa* aplicando a taxonomia polifásica, com sequenciamento parcial dos genes da calmodulina e beta-tubulina (Oliveira et al., 2013b). Este relato de caso indica que esporotricose pode estar sendo subdiagnosticada e negligenciada, particularmente no Sul da Europa, e sugere Portugal como uma área emergente para esta infecção fúngica.

O teste padrão de referência no diagnóstico da esporotricose é a cultura do microrganismo, entretanto, a sorologia, exames histopatológicos e ferramentas moleculares têm sido implementadas no diagnóstico dessa micose. Entretanto, ainda são poucos os métodos moleculares utilizados no diagnóstico da esporotricose e na detecção do DNA de *S. schenckii* em materiais clínicos e para identificação das espécies do complexo *Sporothrix* em cultura. Com a descrição do complexo *Sporothrix*, uma importante questão que surgiu foi a busca de métodos rápidos para tipagem e identificação das espécies. Com intuito de responder

essa questão, desenvolvemos uma PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B, metodologia amplamente utilizada na identificação de bactérias (McClelland et al., 1992) e leveduras do gênero *Candida* (Thanos et al., 1996; Meyer et al., 2001; Correia et al., 2004), para a distinção entre as espécies do complexo *Sporothrix* (Oliveira et al., 2012). A PCR T3B *fingerprinting* apresentou perfis de bandas distintos entre as espécies, apresentando correta identificação de todos os 35 isolados utilizados no estudo a nível de espécie, identificação esta que foi confirmada pelo sequenciamento parcial do gene da calmodulina. Observamos 100% de concordância na identificação das espécies em ambas metodologias genotípicas utilizadas. Com a metodologia da PCR *fingerprinting* foi possível também a identificação de cepas que tinham suas espécies identificadas incorretamente pelas análises fenotípicas. A técnica de identificação proposta é simples, confiável, mais rápida, mais barata e exige menor experiência técnica que o sequenciamento. Os perfis das cepas-tipo para cada espécie do complexo *Sporothrix* gerados pela PCR podem ser escaneados e gerar uma base de dados no computador, os quais podem ser utilizados para futuras identificações de isolados atípicos ou não identificados. Esta metodologia é ideal para ser empregada na identificação das espécies do complexo *Sporothrix* em laboratórios de micologia clínica, particularmente nos com limitados recursos ou conhecimentos técnicos. Posteriormente utilizamos essa técnica para a caracterização de um isolado de *S.globosa* em Portugal (Oliveira et al., 2013b).

Realizamos também estudos iniciais para implementação da metodologia do MALDI-TOF ICMS na caracterização e identificação das espécies do complexo *Sporothrix*, onde foram elaborados espectros de referência para as seis espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Essa elaboração de espectros de referência foi comparada à análise molecular através do sequenciamento parcial do gene da calmodulina, onde foi observada 100% de concordância entre as duas metodologias.

A elaboração dos espectros de referência foi necessária, uma vez que nas bases dados de identificação pelo MALDI-TOF ICMS somente foi encontrado espectro de referência para a espécie *S. schenckii*, sendo que o mesmo foi depositado anteriormente a nova classificação do complexo *Sporothrix* (Marimon et al., 2007). Esta foi a primeira vez que esta tecnologia foi utilizada para identificar e gerar uma biblioteca das massas de proteínas e espectros de referência, de isolados clínicos e ambientais do complexo *Sporothrix*.

Embora nossos resultados ainda sejam preliminares, nos parece que o MALDI-TOF ICMS poderá ser uma poderosa técnica proteômica com alto rendimento e potente poder de discriminação entre as espécies do complexo *Sporothrix*. Essa diferenciação final em nível de espécies somente era possível por meio da utilização de técnicas moleculares baseadas no sequenciamento parcial de genes constitutivos.

## 9. CONCLUSÕES

---

- 1 A taxonomia polifásica é fundamental para a identificação em nível de espécies do complexo *Sporothrix*.
- 2 A correlação entre análises fenotípicas e moleculares demonstrou que *S. brasiliensis* foi a espécie mais isolada em humanos na endemia no estado do Rio de Janeiro.
- 3 A identificação de *S. globosa* e *S. mexicana* em Portugal sugere que a esporotricose deve estar sendo subdiagnosticada neste país e que esta micose poderia ser considerada uma doença emergente no sul da Europa.
- 4 Foi descrito o primeiro surto de esporotricose causada por *S. brasiliensis* fora da zona endêmica do Rio de Janeiro.
- 5 A PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* T3B é um método confiável e necessita de um menor tempo para sua realização e caracterização das espécies do complexo *Sporothrix*.
- 6 As diferentes espécies do complexo *Sporothrix* apresentam distintos perfis proteômicos, o que foi evidenciado pela geração dos espectros de referência por MALDI-TOF ICMS.



## **10. PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

1. Avaliação do perfil proteômico, através da inclusão de maior número de isolados, das espécies do complexo *Sporothrix*, com o intuito de seleção de biomarcadores.
2. Comparação do perfil proteômico de *Sporothrix brasiliensis* provenientes da epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro com outras espécies do complexo *Sporothrix*.
3. Caracterização de possíveis proteínas com expressão diferencial nas diferentes espécies do complexo *Sporothrix*.
4. Inclusão de novas metodologias utilizadas na caracterização de espécies, utilizando análises proteômicas.

## 11. REFERÊNCIAS

---

Agudelo SP, Restrepo S, Velez ID. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:1002-1004.

Albornoz MB, Villanueva E, Torres ED. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. *Mycopathologia* 1984; 85: 177-183.

Almeida-Paes R, Pizzini CV, Pimenta, MA, Bailão AM, Soares, CMA, Peralta JM, Zancopé-Oliveira RM. Immunoproteomic analysis of cell-free antigens of the yeast form of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. In: Anais do IX Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose; 2005 Out 02-05; Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Pizzini CV, Monteiro PC, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin Vaccine Immunol* 2007a; 14(3):244-249.

Almeida-Paes R, Pimenta MA, Monteiro PC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clin Vaccine Immunol* 2007b; 14(9):1149-1157.

Almeida-Paes R. Antígenos e anticorpos na esporotricose: caracterização e aplicações diagnósticas. Rio de Janeiro; 2007c. Curso de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz. Tese de Mestrado-Fundação Oswaldo Cruz.

Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PC, Gutierrez Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Microb Infect* 2009; 11(5):554-562.

Almeida-Paes R. Fatores de virulência e antígenos de *Sporothrix* spp. relacionados à endemia de esporotricose: no Estado do Rio de Janeiro; 2012a. Curso de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz. Tese de Doutorado-Fundação Oswaldo Cruz.

Almeida-Paes R, Frases S, Araújo Gde S, Oliveira MME, Gerfen GJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Appl Environ Microbiol* 2012b; 78(24):8623-8630.

Al-Tawfiq JA, Wools KK. Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1403-1406.

Arenas R, Miller D, Campos-Macias P. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. *Int J Dermatol* 2007; 46:177-179.

Barros MBL, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazéra MS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Marzochi KBF, Wanke B, Valle ACF. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 777-779.

Barros MBL, Schubach AO, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TMP, Reis RS, Conceição MJ, Valle ACF. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol* 2003, 42: 677- 681.

Barros MBL, Schubach AO, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TMP, Reis RS, Wanke B, Marzochi KBF, Conceição MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 2004, 38: 529-535.

Barros MB, Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24(4):633-654.

Berbee ML, Taylor JW. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. *Exp Mycol* 1992; 16: 87-91.

Bernardes-Engemann AR, Costa RC, Miguens BR, Penha CV, Neves E, Pereira BA, Dias CM, Mattos M, Gutierrez MC, Schubach A, Oliveira Neto MP, Lazéra M, Lopes-Bezerra LM. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. *Med Mycol* 2005; 43(6):487-493.

Blumer SO, Kaufman L, Kaplan W, McLaughlin DW, Kraft DE. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. *Appl Microbiol* 1973; 26: 4-8.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Angkuster J, Alviano CS, Silva CL. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia* 1992; 117: 139-144.

Carlos IZ, Sgarbi DB, Santos GC, Praceres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Scand J Immunol* 2003; 57: 214-220.

Carrada-Bravo T. New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69:267-273.

Carvalho MT, de Castro AP, Baby C, Werner B, Filus Neto J, Queiroz-Telles F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(6): 655-659.

Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun*. 1995; 63:4211-4218.

Casadevall A, Pirofski LA. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv Immunol* 2006; 91:1-44.

Casserone S, Conti-Diaz IA, Zanetta E, Pereira MEP. Serologia de la esporotricosis cutânea. *Sabouraudia* 1983; 21: 317-321.

Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases. Wolfe Medical Publications Ltd 1980; pp. 112-115.

Chua SS, Momany M, Mendoza L, Szaniszlo PJ. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. *Curr Microbiol* 1994; 29: 151-156.

Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR, Kondracki SF, Salkin IF, Dixon DM, Chang HG, Duncan RA, Hurd NJ, Morse DL. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 475-487.

Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* 1989; 108: 113-116.

Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol* 1992a; 30: 169-171.

Cooper CR, Breslin BJ, Dixon DM, Salkin IF. DNA typing of isolates associated with the 1998 sporotrichosis epidemic. *J Clin Microbiol* 1992b; 30: 1631-1635.

Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5899-5903.

Criseo G, Zungri D, Romeo O. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. *J Clin Microbiol* 2008; 46(11): 3870- 3871.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(2): 380-407.

Cruz R, Vieille P, Oschilewski D. Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo-cutánea. Rev Chilena Infectol 2012; 29:401-405.

Davis JL. Species concepts and phylogenetic analysis. Introduction. Syst Bot 1995; 20: 555-559.

de Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, de Hoog GS, Vismer HF, Wingfield MJ. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. Mycologia 2008; 100:647-661.

Dias NM, Oliveira MME, Santos C, Zancoppe-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. Emerg Infect Dis 2011; 17:1975-1976.

Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, Hurd NJ, Haines JH, Kemna ME, Coles FB. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 1106-1113.

Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1992; 30: 951-954.

Dooley DP, Bostic PS, Beckius ML. Spook house sporotrichosis. A point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in Halloween haunted-house. Arch Intern Med 1997; 157: 1885-1887.

dos Santos IB, Schubach TM, Leme LR, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Quintella LP, de F Madeira M, dos S Coelho F, Reis R, de O Schubach A. Sporotrichosis: the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. Vet Parasitol 2007;143(1):1-6.

Falqueto A, Maifrede SB, Ribeiro MA. Unusual clinical presentation of sporotrichosis in three members of one family. *International Journal of Dermatology* 2012;51(4):434-438.

Feeney KT, Arthur IH, Whittle AJ, Altman SA, Speers DJ. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8):1228-1231.

Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Schubach TM, Dias MA, Pereira SA, de Camargo ZP. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. *Vet Microbiol* 2011; 147(3-4):445-449.

Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA. Two dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 2001; 3:535-542.

Freitas D, Moreno G, Saliba A, Bottino J, Mós E. Esporotricose em cães e gatos. *Rev Fac Med Vet S Paulo* 1965; 7: 381-387.

Freitas DF, do Valle AC, de Almeida Paes R, Bastos FI, Galhardo MC. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis* 2010; 50:453.

Freitas DF, Valle AC, Cuzzi T, Brandão LG, Zancopé-Oliveira RM, Galhardo MC. Sweet Syndrome associated with sporotrichosis. *Brit J Dermatol* 2012; 166:212-213.

Freitas DF, Lima IA, Curi CL, Jordão L, Zancopé-Oliveira RM, Valle AC, Galhardo MC, Curi AL. Acute dacryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; “in press”.

Frisvad JC. Secondary metabolites and species models in *Penicillium* and *Aspergillus*. Department of Biotechnology (now BioCentrum-DTU). Technical University of Denmark 1998. apud Smedsgaard J, Nielsen J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot* 2004; 56(410): 273- 286.

Frisvad JC, Samson RA. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Syst Appl Microbiol* 2004; 27(6): 672-680.

Gosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 2002; 45:449- 454.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(3):454-500.

Gutierrez-Galhardo MC, de Oliveira Schubach A, de Lima Barros MB, Moita Blanco TC, Cuzzi-Maya T, Pacheco Schubach TM, dos Santos Lazéra M, do Valle AC. Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Int J Dermatol* 2002; 41(2): 114-116.

Gutierrez-Galhardo MC, Barros MB, Schubach AO, Cuzzi T, Schubach TM, Lazéra MS, Valle AC. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19(4):507-509.

Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Valle AC, Almeida-Paes R, Silva-Tavares PM, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 2008; 46:141-151.



Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, Licitra C, Hankins M, Toth B, Padhye A, Kaufman L, Passarelli L, Cooper CR, Hutwagner L, Hopkins R, McNeil M. Outbreak of sporotrichosis among three nursery workers. *J Infect Dis* 1997; 176: 499-504.

Hardman S, Stephenson I, Jenkins DR, Wiselka MJ, Johnson EM. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J Infect* 2005;51(3):e73-77.

Hay RJ, Morris-Jones R. Outbreaks of sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(2): 129-133.

Hekton L, Perkins CF. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *J Exp Med* 1900; 5: 77-91.

Hildmann C, Riester D, Schwienhorst A. Histone deacetylases - an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75:487-497.

Hintz WE. Sequence analysis of the chitin synthase A gene of the Dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* indicates a close association with the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Gene* 1999; 237: 215- 221.

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 469-488.

Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, Lu SC, Kuo TT, Hong HS. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1414-1418.

Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Vismer H, Muir D. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in South Africa and Australia. *Med Mycol* 2000; 38:433-436.

Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 708-717.

Jin X, Zhang H, Hiruma M, Yamamoto I. Mother-and-child cases of sporotrichosis infection. *Mycoses* 1990; 33: 33-36.

Kanbe T, Natsume L, Goto I, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H, Kikuchi A. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. *J Dermatol Sci* 2005; 38:99-106.

Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses* 2001; 44:261-265.

Kano R, Watanabe K, Murakami M, Yanai T, Hasegawa A. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. *Vet Rec* 2005; 156:484-485.

Kano R, Anzawa K, Mochizuki T, Nishimoto K, Hiruma M, Kamata H, Hasegawa A. *Sporothrix schenckii* (sensu strict *S. globosa*) mating type 1-2 (MAT1-2) gene. *J Dermatol* 2013; 40(9):726-730.

Karlin JV, Nielsen HS. Serologic aspects of sporotrichosis. *J Infect Dis* 1970; 121: 316-327.

Kasten MM, Stillman DJ. Identification of the *Saccharomyces cerevisiae* genes STB1-STB5 encoding Sin3p binding proteins. *Mol Gen Genet* 1997; 256:376-386.

Korf RP. Reinventing taxonomy: a curmudgeon's view of 250 years of fungal taxonomy, the crisis in biodiversity, and the pitfalls of the phylogenetic age. *Mycotaxon* 2005; 93: 407-415.

Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol* 2008; 46:53-56.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Sporotrichosis In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992; p 707-729.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res 2006; 6(4): 574-587.

Lin J, Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, You G, Li R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. Mycopathologia 1999, 148:69-72.

Liu X, Zhang Z, Hou B, Wang D, Sun T, Li F, Wang H, Han S. Rapid identification of *Sporothrix schenckii* in biopsy tissue by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012; in press.

Lober C, Kaplan R, Herron C. *Sporothrix schenckii* inoculation on the abdomen. South Med J 1980; 73(12):1637-1638.

Lopes-Alves L, Travassos LR, Previato JO, Mendonça-Previato L. Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. Glycobiology 1994; 4: 281-288.

Lopes J, Alves S, Mari C, Brum L, Westphalen J, Altermann M, Prates F. Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32: 541-545.

López-Romero E, Reyes-Montes MR, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, Flores-Carreón A, Toriello C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. Future Microbiol 2011; 6(1):85-102.

Lutz A, Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. Rev Med S Paulo 1907; 21: 433-450.

Lynch PJ, Voorhes JJ, Harrell RE. Systemic sporotrichosis. Ann Intern Med 1970; 73: 23-30.

Madrid H, Cano J, Gene J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. Rev Iberoam Micol 2009; 26:218-222.

Madrid H, Gene J, Cano J, Silvera C, Guarro J. *Sporothrix brunneoviolacea* and *Sporothrix dimorphospora*, two new members of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 2010; 102:1193-1203.

Madrid IM, Mattei A, Martins A, Nobre M, Meireles M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses Public Health* 2010; 57(2):151-154.

Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Nobre Mde O, Meireles MC. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia* 2012; 173(4):265-273.

Maia DC, Sassa MF, Placeres MC, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 2006; 161(1): 11-19.

Malliaris DS, Steenbergen JN, Casadevall AC. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med Mycol* 2004; 42: 149-158.

Marimon R, Gené J, Cano J, Sutton DA, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3251-3256.

Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 2007; 45(10): 3198-3206.

Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* 2008; 46(6):621-625.

Marques SA, Franco SRVS, Camargo RMP, Dias LDF, Naddad-Junior V, Fabris VE. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): Transmissão humana. Rev Inst Med Trop S Paulo 1993; 35: 327-30.

McClelland M, Petersen C, Welsh J. Length polymorphisms in tRNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. J Clin Microbiol 1992; 30:1499-1504.

Mendoza M, Alvarado P, Dias de Torres E, Lucena L, de Albornoz MC. Physiological compartment and in vivo sensitivity of *Sporothrix schenckii* isolates maintained for 18 years by two preservation methods. Rev Iberoam Micol 2005; 22(3): 151- 156.

Mendoza M, Brito A, Schaper DA, Spooner VA, Alvarado P, Castro A, Fernandez A. Evaluación de la técnica PCR anidada para el diagnóstico de la esporotricosis experimental. Rev Iberoam Micol 2012; 29:120-125.

Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, Toriello C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J Clin Microbiol 2002; 40: 3004-3011.

Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Med Mycol 2001; 39:185-193.

Miranda LH, Quintella LP, dos Santos IB, Menezes RC, Figueiredo FB, Gremião ID, Okamoto T, de Oliveira RV, Pereira SA, Tortelly R, Schubach TM. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). Mycopathologia 2009; 168(2):1228-1231.

Miranda LH, Quintella LP, Menezes RC, dos Santos IB, Oliveira RV, Figueiredo FB, LopesBezerra LM, Schubach TM. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Vet J* 2011; 190(3):408-411.

Mora-Cabrera M, Alonso RA, Ulloa-Arvizu R, Torres-Guerrero H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol* 2001;39:439-444.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatology* 2002; 27: 427-431.

Morris-Jones R, Youngchim S, Gomes BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, Casadevall A, Hamilton AJ. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun* 2003; 71: 4026-4033.

Nascimento RC, Almeida SR. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 241-247.

Neyra E, Fonteyne PA, Swinne D, Fauche F, Bustamante E, Nolard N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1348-1352.

Nosanchuk JD, Steenbergen JN, Shi L, Deepe GS, Casadevall A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest* 2003; 112:1164-1175.

Nosanchuk JD. Protective antibodies and endemic dimorphic fungi. *Curr Mol Med* 2005; 5(4):435-442.

O'Hara RJ. Population thinking and tree thinking in systematics. *Zoologica Scripta* 1997; 26(4): 323-329.

Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Barros MBL, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia* 2010; 169:359-363.

Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia* 2011; 172:257-267.

Oliveira MME, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2159-2162.

Oliveira MME, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancoppe Oliveira RM. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013a; 108(7): 936-938.

Oliveira MME, Veríssimo C, Sabino R, Aranha J, Zancoppe Oliveira RM, Sampaio P, Pais C. First autochthonous case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013b: "in press".

O'Reilly LC, Altman SA. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2547-2552.

Pappas PG, Tellez I, Deep A E, Nolasco D, Holgado W, Bustamanate B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 65-70.

Pupo JA. Frequência da Sporotrichose em São Paulo. *Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia* 1917; 8(3): 53-68.

Quintal D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *J Cutan Med Surg* 2000; 4: 51-54.

Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. Clin Dermatol 2007; 25(2):181-187.

Reed KD, Moore FM, Geiger GE. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. Clin Infect Dis 1993; 16: 384-387.

Reis RS. Análise genotípica de amostras de *Sporothrix schenckii* isoladas em epidemias de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] Fundação Oswaldo Cruz; 2004.

Rippon JW. Sporotrichosis. In: Medical Mycology. Philadelphia: WB Saunders Company 1998; p. 325- 352.

Rodrigues MT, Resende MA. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. Mycopathologia 1996; 135: 89-98.

Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TM, Pereira SA, Fernandes GF, Bezerra LM, Felipe MS, de Camargo ZP. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7(6):e2281

Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. Mycopathologia 2011; 172:179-186.

Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect Immun 2000; 68: 3696-3703.

Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. J Am Acad Dermatol 2005; 52(3): 451-459.



Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2913-2919.

Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 1-11.

Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry (MALDI-TOF-ICMS) to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Micr Infec Dis* 2011; 71: 304-308.

Schenck BR. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1898; 9: 286-290.

Schubach A, de Lima Barros MB, Schubach TM, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Sued M, de Matos Salgueiro M, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, Marzochi KB, Wanke B, Conceição-Silva F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea* 2005a; 24(4):491-493.

Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL, Wanke B. Esporotricose In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005b. p. 1161- 1162.

Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(2):129-133.

Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DF, Barros MBL, Brustein R, Zancopé-Oliveira RM, Monteiro PCF, Wanke B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 2002; 153: 83- 86.

Schubach TMP, Schubach AO, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PCF, Gutierrez-Galhardo MC, Wanke B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats of Rio de Janeiro. *Vet Rec* 2003; 152: 172- 175.

Scott EN, Muchmore HG. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(2):300-304.

Sigler L, Harris JL, Dixon DM, Flis AL, Salkin IF, Kemna M, Duncan RA. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. *J Clin Microbiol* 1990; 28(5): 1009-15.

Silva MB, Costa MM, Torres CC, Galhardo MC, Valle AC, Magalhães MA, Sabroza PC, Oliveira RM. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 2012; 28(10):1867-1880.

Smedsgaard J, Nielsen J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot* 2004; 56(410): 273- 286.

Smith TM, Batenburg-van der Vegte WH. Ultrastructure . *Antonie Van Leeuwenhoek* 1985; 51(1): 121-128.

Song Y, Yao L, Zhong SX, Tian YP, Liu YY, Li SS. Infant Sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases. *Int J Dermatol* 2011; 50:522-529.

Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. Interacion of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 2004; 72:3478-3488.

St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. California: Star Publishing Company 1996.

Suzuki K, Kawasaki M, Ishizaki H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia* 1988; 103:147-151.

Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol* 1999; 37: 397-404.

Takeda Y, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia* 1991; 116:9-14

Talhari S, Cunha MGS, Schettini APM, Talhari AC. Deep Mycoses in Amazon Region. *Int J Dermatol* 1988; 27(7): 481- 484.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 2000; 31(1): 21-32.

Teixeira PA, De Castro RA, Ferreira FR, Cunha MM, Torres AP, Penha CV, Rozental S, Lopes-Bezerra LM. L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Med Mycol* 2010; 48(5):687-695.

Thanos M, Schonian G, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell TG, Presber W, Tietz HJ. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34:615-621.

Xu TH, Lin JP, Gao XH, Wei H, Liao W, Chen HD. Identification of *Sporothrix schenckii* of various mtDNA types by nested PCR assay. *Med Mycol* 2010; 48:161-165.

Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2004; 45:165-175.

Zancopé-Oliveira RM, Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, Gutierrez-Galhardo MC. New diagnostic applications in sporotrichosis. In: Skin biopsy perspectives. Rijeka: InTech Europe; 2011 p 53-72.

Zhang Z, Liu X, Yang G, Gao X, Jin L, An L. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. Mycoses 2006; 49:305-310.

Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, de Hoog GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. Fungal Diversity 2013; “in press “.