

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Sporothrix schenckii* EM PAÍSES DO CONTINENTE AMERICANO

GENETIC DIVERSITY OF *Sporothrix schenckii* ISOLATES FROM COUNTRIES OF AMERICAN CONTINENT

JOANA ÉRICA LIMA ROCHA¹, RONEY DA SILVA SOUSA², FERNANDA MACHADO FONSECA^{3*}

1. Biomédica. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí; 2. Biomédico. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí; 3. Docente do Departamento de Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí.

* Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso. Avenida São Sebastião 2819, Reis Veloso, Parnaíba, Piauí. CEP: 64204-035 fmachadofonseca@gmail.com

Recebido em 15/06/2016. Aceito para publicação em 21/08/2016

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea com ampla distribuição mundial causada por fungos do gênero *Sporothrix*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de isolados de *S. schenckii* no Brasil e em países do Continente Americano. Foram selecionadas sequências dos genes *calmodulina (cal)* e *beta-tubulina* de *S. schenckii* provenientes de diversos países do Continente Americano, obtidos no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). O alinhamento múltiplo foi realizado pelo software Clustal W e a análise filogenética foi realizada no software Mega 5.0®. Foram incluídas 70 sequências do gene *cal* e 50 sequências do gene *beta-tubulina*. De acordo com o gene *cal*, as amostras brasileiras demonstraram similaridade e se agruparam no mesmo clado daquelas provenientes de países da América do Sul. O gene *beta-tubulina* demonstrou que apesar de serem provenientes da mesma região geográfica, as amostras brasileiras demonstraram grande diversidade genética.

PALAVRAS-CHAVE: *Sporothrix*; Esporotricose; Filogenia; *Calmodulina*.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis with worldwide distribution caused by fungi of the genus *Sporothrix*. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of isolates of *S. schenckii* in Brazil and in countries of American Continent. Were selected sequences of the genes *calmodulin (cal)* and *beta-tubulin* of *S. schenckii* from several countries of American Continent obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The multiple alignment was performed by the Clustal W software and the phylogenetic analysis was performed by Mega 5.0® software. A total of 70 sequences of the gene *cal* and 50 sequences of the *beta-tubulin* gene were included. According to the *cal* gene, Brazilian samples showed similarity and was clustered in the same clade than those from countries in South America. The *beta-tubulin* gene showed that despite being from the same geographical region, the Brazilian samples presented high genetic diversity.

KEYWORDS: *Sporothrix*; *Sporotrichosis*; Phylogeny; *Calmodulin*.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Sporothrix* compreende um grupo de fungos termodimórficos que causam esporotricose em humanos e animais. A infecção se inicia a partir de um trauma na pele decorrente do contato com o solo e matéria vegetativa em decomposição (plantas, lascas de madeira, espinhos)¹. Adicionalmente, contaminação pode ocorrer pela inalação, podendo levar à forma pulmonar da doença, entretanto esta via de infecção é rara².

A esporotricose é a micose cutânea e subcutânea mais frequente em áreas urbanas. Apesar da ampla distribuição mundial, países tropicais e subtropicais são considerados áreas endêmicas e com altas prevalências da doença, como Brasil, México, Peru, China e África do Sul^{1,3,4,5}.

No Brasil, a esporotricose é mais frequente nas regiões Sul e Sudeste sendo São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul os estados que possuem a maior incidência e prevalência^{6,7}. Nas últimas décadas, a prevalência da doença tem se modificado, assim como o modo de transmissão e a distribuição geográfica. Alguns fatores ambientais, a melhora no diagnóstico e da urbanização, são fatores que explicam tais alterações⁸.

Estudos moleculares tem demonstrado que várias espécies de *Sporothrix* têm sido isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes com esporotricose^{9,10}. Nesse sentido, a identificação molecular da espécie causadora da doença se faz necessário, uma vez que diferentes espécies apresentam diferentes interações com o hospedeiro e uma identificação incorreta resulta diretamente no tratamento e evolução clínica tanto de humanos como de animais infectados.

Os métodos moleculares têm sido utilizados para aumentar as taxas de detecções das infecções, principalmente nos casos de culturas que são negativas devido ao baixo número de células ou em casos de infecções secundárias^{11,12}. Em relação à esporotricose, a codifica-

ção das proteínas *calmodulina* (*cal*) e *beta-tubulina* funcionam como um método padrão-ouro para a análise filogenética na identificação do *S. schenckii*^{10,13}. A elevada conservação das sequências de aminoácidos faz com que, principalmente, a *beta-tubulina* seja considerada um excelente marcador molecular. Adicionalmente, os genes que codificam estas proteínas possuem uma elevada conservação entre espécies similares, mas variam em relação a fungos de outros filos, o que contribui para a sua utilização no diagnóstico molecular da esporotricose^{14,15}.

Considerando os métodos de diagnóstico disponíveis, a biologia molecular vem se destacando uma vez que as técnicas empregadas apresentam maior sensibilidade e especificidade do que os métodos fenotípicos de identificação¹⁶. O conhecimento do perfil molecular dos microrganismos circulantes causadores da esporotricose contribui para o tratamento, uma vez que as amostras com grande diversidade genética podem também implicar em uma maior resistência as drogas utilizadas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética dos genes *calmodulina* (*cal*) e *beta-tubulina* assim como comparar as fontes de obtenção de isolados de *Sporothrix schenckii* provenientes do Brasil e de diversos países do continente americano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram selecionadas amostras sequenciadas de *S. schenckii* para os genes *calmodulina* (*cal*) e *beta-tubulina* com aproximadamente 700pb, provenientes de diversos países do Continente Americano. Esses dados estão disponibilizados e foram obtidos no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*) pelo site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

As amostras selecionadas foram incluídas em um banco de dados e foram renomeadas para padronização dos dados e posterior análise filogenética. As informações sobre a fonte de isolamento das amostras selecionadas foram obtidas por meio de consulta aos artigos científicos dos quais as amostras eram provenientes. Estes dados também foram obtidos no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análise filogenética

Inicialmente, foi realizado o alinhamento múltiplo das amostras selecionadas pelo software *Clustal W*¹⁷. A confirmação da espécie foi realizada pela da submissão das mesmas no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – NIH).

A análise filogenética para cada marcador gênico (*cal* e *beta-tubulina*) foi realizada no software MEGA 5.0®¹⁸ com o método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbour Joining*, NJ)¹⁹ sob o modelo *Kimu-*

ra-2-parâmetros (K2P)²⁰ para correção das distâncias nucleotídicas. A confiabilidade de cada nó da árvore filogenética foi estimada pelo método de *Bootstrap* com 1000 réplicas²¹.

3. RESULTADOS

Foram selecionadas 70 amostras de *S. schenckii* sequenciadas para o gene *cal* e 50 amostras sequenciadas para o gene *beta-tubulina*. Os isolados de *S. schenckii* foram agrupados de acordo com região geográfica e a fonte de obtenção das amostras foi classificada de acordo com a forma clínica em linfocutânea (LC), cutânea (C), disseminada (D), forma clínica não especificada (N/E), não aplicável (N/A) quando a fonte era desconhecida ou esta informação não esteve presente nos dados analisados e ainda, esporotricose felina (EF) e fonte ambiental (A) quando a amostra foi isolada a partir do ambiente.

Dentre as 70 amostras do gene *cal*, 27 (38,6%) eram provenientes do Brasil, 25 (35,7%) eram provenientes da Venezuela, 11 (15,7%) eram provenientes dos Estados Unidos (EUA), seis (8,6%) eram provenientes do Peru e apenas uma (1,4%) era proveniente do México. Considerando as 50 amostras do gene *beta-tubulina*, 29 (58%) eram provenientes do Brasil, 13 (26%) eram provenientes do Peru, três (6%) eram provenientes dos EUA, três (6%) eram provenientes da Argentina, uma (2%) era proveniente da Bolívia e uma (2%) era proveniente da Colômbia. A tabela 1 demonstra a fonte de obtenção das amostras de *S. schenckii* sequenciadas para os genes *cal* e *beta-tubulina*.

De acordo com a análise filogenética gene *cal*, a similaridade das amostras variou de 23% a 99% (Figura 1). As amostras provenientes de países da América do Norte como EUA e México demonstraram similaridade de 97%. Curiosamente, foi possível detectar somente uma amostra brasileira (SCC69) neste mesmo clado.

Considerando as amostras da América do Sul, observamos que a maioria das amostras se agrupou em um mesmo clado, demonstrando similaridade de 64%. Dois isolados (SSC40, SSC41) brasileiros demonstraram similaridade de 99% entre si. De modo geral, a análise filogenética demonstrou que as amostras se agruparam com aquelas provenientes de países próximos, ou seja, da mesma região geográfica (Figura 1).

Após a análise filogenética do gene *cal*, considerando apenas os isolados brasileiros, foi possível observar uma variação entre 61% a 100% de similaridade entre as amostras (Figura 2). Os isolados do estado do Piauí (SSC05) e Pará (SSC16) demonstraram similaridade de 93% entre si. A maioria dos isolados era proveniente das regiões Sul e Sudeste do país e se agruparam em um mesmo clado, com exceção de um isolado do Distrito Federal (DF) que demonstrou 63% de similaridade com amostras de São Paulo (SP) e Paraná (PR). De forma

geral, as amostras brasileiras demonstraram ser parecidas entre si, independente da região geográfica.

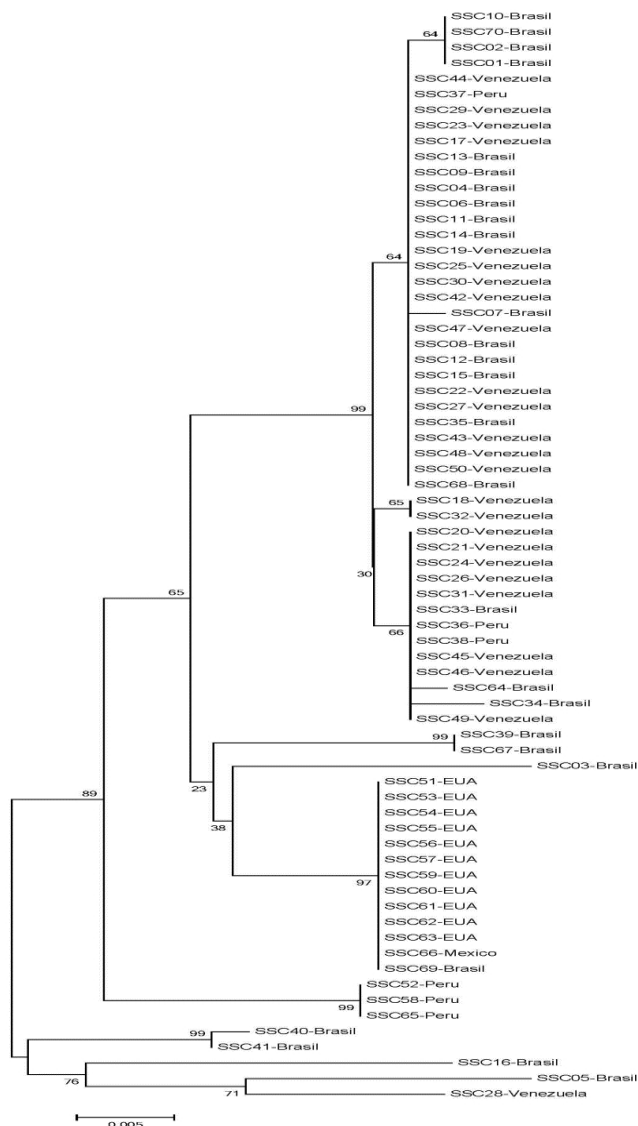


Figura 1. Análise filogenética dos isolados de *S. schenckii* provenientes de diversos países do Continente Americano construída pelo software MEGA 5.0® pelo método *Neighbor-Joining* para o gene *cal*. A porcentagem de replicatas da árvore nas quais os clados foram agrupados no teste de Bootstrap (1000 replicatas) está demonstrada próximo aos braços. A árvore foi desenhada para escala, com o tamanho dos braços nas mesmas unidades daquelas da distância evolucionária (calculada pelo método Kimura 2 parâmetros) utilizada para inferir a árvore filogenética.

A análise filogenética do gene *beta-tubulina* demonstrou uma grande diversidade entre os isolados dos diversos países do Continente Americano. Uma similaridade de 100% foi detectada entre as amostras brasileiras, enquanto que os isolados do Peru (SSC33) e Colômbia (SSC48) apresentaram baixa similaridade (20%) em relação ao isolado da Argentina (SSC47) (Figura 3). As amostras provenientes de países da América do Sul

com proximidade geográfica incluindo as amostras do Peru (SSC32, SSC45, SSC34, SSC46) e Bolívia (SSC35) demonstraram uma similaridade de 66% enquanto que amostras do Peru (SSC33) e Colômbia (SSC48) demonstraram uma similaridade maior (88%). Os isolados dos EUA se agruparam em um caldo isolado assim como as amostras do Peru e demonstraram similaridade de 95% e 70%, respectivamente (Figura 3).

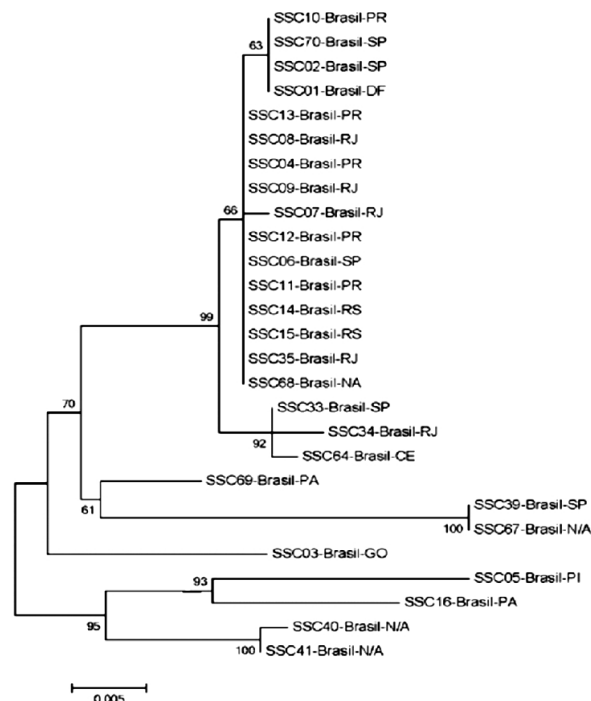


Figura 2. Análise filogenética dos isolados brasileiros de *S. schenckii* construída pelo software MEGA 5.0® pelo método *Neighbor-Joining* para o gene *cal*. A porcentagem de replicatas da árvore nas quais os clados foram agrupados no teste de Bootstrap (1000 replicatas) está demonstrada próximo aos braços. A árvore foi desenhada para escala, com o tamanho dos braços nas mesmas unidades daquelas da distância evolucionária (calculada pelo método Kimura 2 parâmetros) utilizada para inferir a árvore filogenética. N/A: Não aplicável (informação sobre procedência não disponível).

A análise filogenética para o gene *beta-tubulina*, considerando apenas isolados brasileiros, demonstrou que a similaridade variou entre 31% a 81%. Todos os isolados eram provenientes da região Sudeste, mais especificamente dos estados do Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP). A maioria das amostras do Rio de Janeiro se agruparam no mesmo clado (Figura 4). De modo geral, os isolados brasileiros demonstraram grande diversidade entre si apesar de ser de regiões geográficas próximas. Somente duas amostras (SSC11 e SCC12) provenientes do estado do RJ demonstraram similaridade de 81%.

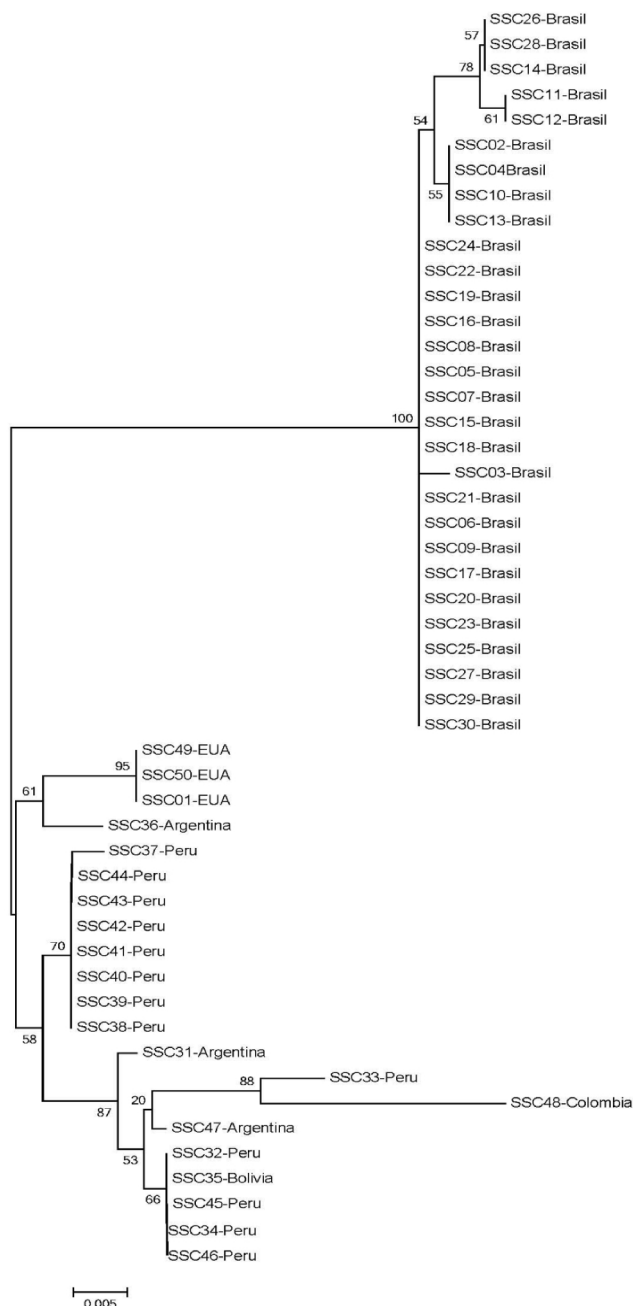


Figura 3. Análise filogenética dos isolados de *S. schenckii* provenientes de diversos países do Continente Americano construída pelo software MEGA 5.0® pelo método *Neighbor-Joining* para o gene *beta-tubulina*. A porcentagem de replicatas da árvore nas quais os clados foram agrupados no teste de *Bootstrap* (1000 replicatas) está demonstrada próximo aos braços. A árvore foi desenhada para escala, com o tamanho dos braços nas mesmas unidades daquelas da distância evolucionária (calculada pelo método *Kimura 2* parâmetros) utilizada para inferir a árvore filogenética.

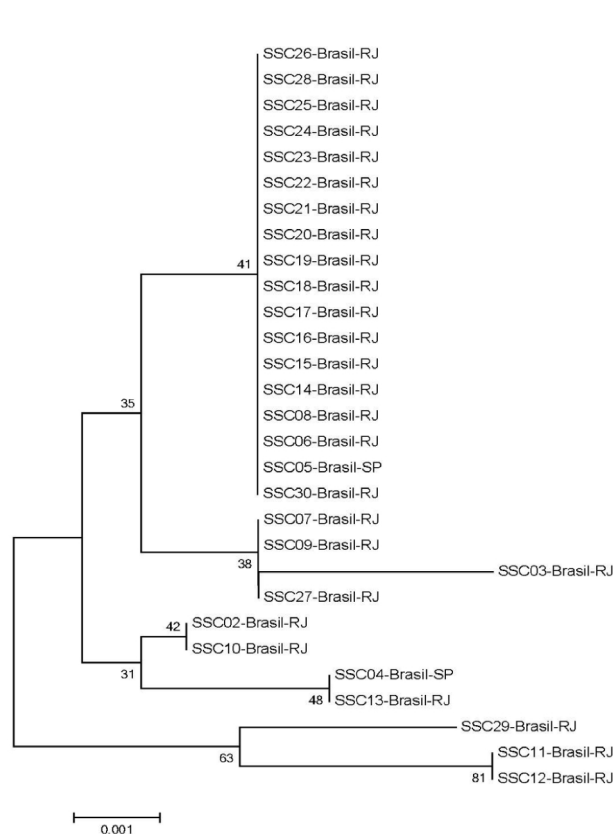


Figura 4. Análise filogenética dos isolados brasileiros de *S. schenckii* construída pelo software MEGA 5.0® pelo método *Neighbor-Joining* para o gene da *beta-tubulina*. A porcentagem de replicatas da árvore nas quais os clados foram agrupados no teste de *Bootstrap* (1000 replicatas) está demonstrada próximo aos braços. A árvore foi desenhada para escala, com o tamanho dos braços nas mesmas unidades daquelas da distância evolucionária (calculada pelo método *Kimura 2* parâmetros) utilizada para inferir a árvore filogenética.

4. DISCUSSÃO

O aprofundamento de estudos sobre a esporotricose tem levantado questionamentos devido ao surgimento de novos conhecimentos sobre a doença. Sabe-se que existem diversas espécies patogênicas dentro deste complexo e com ampla distribuição geográfica. O aparecimento de novos tipos transmissão (zoonótica por arranhaduras e espirros de felinos), como também a quantidade do inóculo, da imunidade do hospedeiro, da virulência da amostra e da temperatura que se encontra no ambiente, podem favorecer e influenciar as diferentes manifestações clínicas⁴.

Em países como a Colômbia a forma clínica predominante é a cutânea enquanto que no México, a forma linfática é a mais frequente²². No nosso estudo, considerando as amostras do gene *cal*, a forma clínica predominante foi a linfocutânea. No estudo de Rodrigues *et al.* (2013)⁴ a maioria dos isolados obtidos era proveniente

de esporotricose felina e de amostras clínicas de esporotricose humana. Considerando as amostras do gene *beta-tubulina*, a forma clínica predominante foi a cutânea. Adicionalmente, foi observada uma maior variedade de fontes de obtenção das amostras, incluindo formas mais severas da doença, como a esporotricose disseminada, quando comparadas as sequências gênicas isoladas a partir do gene *cal*.

A esporotricose era considerada uma doença crônica que tinha exclusivamente *S schenckii* como agente etiológico. A partir do sequenciamento de genes foi demonstrado que o complexo *Sporothrix* é composto por espécies crípticas, ou seja, idênticas morfológicamente, porém distintas geneticamente incluindo as espécies *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *Sporothrix mexicana* e *S. schenckii*²⁴. A prevalência da esporotricose em países do Continente Americano e o descobrimento de diversas espécies patogênicas têm levado ao aprofundamento de estudos genéticos com a finalidade de uma identificação precisa do agente etiológico. Neste estudo foram utilizados os genes *cal* e *beta-tubulina* como marcadores moleculares para avaliar a variabilidade genética em isolados brasileiros e entre isolados de alguns países do Continente Americano.

Conceitualmente a análise filogenética é a relação histórica, resultante da evolução de espécies, representada em forma de uma árvore filogenética²⁵. Vários microrganismos possuem constitutivamente o gene *cal*, entretanto, especialmente em *Sporothrix*, este gene possui pouca variação nas regiões codificantes de proteínas e quando ocorrem são substituições sinônimas, garantindo a preservação da função original da proteína²⁶. Por este motivo, o gene *cal* vem sendo utilizado para a identificação molecular de isolados de *S. schenckii* e desta forma, cada vez mais sequências estão disponíveis nas bases de dados públicas.

De acordo com os resultados da análise do gene *cal*, observamos uma similaridade relativamente alta entre os isolados de países geograficamente próximos como no caso das amostras dos EUA e México assim como Brasil e Venezuela. Uma grande similaridade entre os isolados também foi observada quando avaliamos apenas as amostras brasileiras, o que nos leva a especular que as amostras circulantes no país, assim como as amostras circulantes em países próximos, são provenientes de um mesmo clone. Marimon *et al.* (2007)¹⁰ avaliaram a diversidade genética do gene *cal* em isolados de *S. schenckii* e encontraram similaridade de 100% entre amostras obtidas nos EUA. Assim como no nosso estudo, Fernandes *et al.* (2013)²⁷ também demonstraram alta similaridade (87%) entre isolados brasileiros avaliados para o gene *cal* o que reforça a ideia de que os isolados brasileiros não possuem grande diversidade genética entre si.

Em relação ao gene *beta-tubulina*, observamos que as amostras provenientes dos EUA permaneceram agru-

padas em um mesmo clado, enquanto que uma similaridade menor (20%) foi encontrada entre isolados de alguns países da América do Sul como Argentina, Peru e Colômbia. Entretanto, quando avaliamos apenas as amostras brasileiras, observamos uma maior variabilidade genética quando comparado ao gene *cal*. No estudo de Marimon *et al.* (2006)⁹ foi detectado uma alta similaridade para o gene *beta-tubulina* entre isolados de *S. schenckii* no Peru. Desta forma, acreditamos que o gene *cal* funcione como um melhor marcador molecular do que o gene *beta-tubulina* entre as amostras de *S. schenckii* brasileiras.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que as amostras de *S. schenckii* circulantes tendem a ser mais parecidas geneticamente com os isolados da mesma região geográfica. O estudo molecular dos isolados de *S. schenckii* é uma ferramenta importante no diagnóstico da esporotricose, uma vez que contribui para o conhecimento da amostra e permite uma melhor conduta terapêutica nos casos de amostras resistentes ao tratamento convencional. Cabe ressaltar que sem tratamento adequado, a doença pode evoluir para as manifestações graves em seres humanos e animais. Desta forma, o diagnóstico preciso e precoce assim como programas de educação e tratamento adequado contribui para a contenção e propagação da doença.

REFERÊNCIAS

- [1] Barros MBL, Almeida-Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2011 Out; 24(4): 633-654.
- [2] Rodrigues AM, De Hoog GS, Zhang Y, Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect* 2014 Mai; 3(5): e32.
- [3] Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 2006 Jan; 78(2): 293-308.
- [4] Rodrigues AM, De Hoog GS, Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol* 2013 Mai; 51(4): 405-412.
- [5] Govender NP, Maphanga TG, Zulu TG, Patel J, Walaza S, Jacobs C, *et al.* An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2015 Set; 9(9): e0004096.
- [6] Schubach AO, Barros MBL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008 Abr; 21(2): 129-133.
- [7] Barros MBL, Schubach TP, Coll JO, Gremiao ID, Wanke B. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam Salud Publica* 2010 Jun; 27(6): 455-460.
- [8] Almeida JRF. Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de *Sporothrix sp.* na esporotricose experimental. [tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2013.

- [9] Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006 Set; 44(9): 3251-3256.
- [10] 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 Out; 45(10):3198–206.
- [11] Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthases 1 gene. Mycoses 2001 Out; 44(7-8): 261-265.
- [12] Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J Clin Microbiol 2001 Out; 39(10): 3505-3511.
- [13] Rodrigues AM, De Hoog GS, Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of *calmodulin*. Diagn Microbiol Infect Dis 2014 Abr; 78(4): 383–387.
- [14] Kawchuk LM, Hutchison LJ, Verhaeghe CA, Lynch DR, Bainsp S, Holley JD. Isolation of the *B-tubulin* gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. Plant Pathology 2002 Fev; 24(2):233-238.
- [15] Stefan GRW Ralf TV, Reto B, Kurt WM. Cloning of *b-tubulin* and succinate dehydrogenase genes from *Uromyces fabae* and establishing selection conditions for their use in transformation . Plant Pathology 2004 Out; 110(8):767-777.
- [16] Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. Mycopathologia 2011 Out; 172(4): 257-267.
- [17] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 1994 Nov; 22(22): 4673-4680.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA. 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 2011 Out; 28(10): 2731–2739.
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 1987 Jul; 4(4): 406-425.
- [20] Kimura MA simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Molecular Evolution 1980 Dez; 16(2):111-120.
- [21] Felsenstein JF. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985 Jul; 39(4):783-791.
- [22] Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúniga G, *et al.* Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J Clin Microbiol 2002 Ago; 40(8): 3004–3011.
- [23] Rodrigues AM, De Melo Teixeira M, De Hoog GS, Schubach TMP, Pereira AS, Fernandes GF, Bezerra LML, Felipe MS, Caramrgo ZP. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. PLoS Negl Trop Dis 2013 Jun; 7(6): e2281.
- [24] Cruz LCH. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. Vet. e Zootec., Botucatu 2013 Jan; 20: 8-28.
- [25] Oliveira MME. Identificação e análise filogenética de espécies do gênero *Sporothrix* isoladas em área endêmica de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro. [tese] Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas; 2009.
- [26] Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. PLoS Negl Trop Dis 2015 Dez; 9(12): e0004190.
- [27] Fernandes GF, Santos PO, Amaral CC, Rodrigues AM, Sasaki AA, Camargo ZP. Characteristics of virulence profile protein secretion an immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. Virulence 2013 Abr; 4(3): 241–249.