



OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES E LABORATORIAIS PARA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE *SPOROTHRIX*

Danielle B. Almeida¹; Nayara F. L. Diniz²; Flávia S. Fernandes²; João V. B. Souza².

¹ Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

² Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

E-mail: dani.barreto.almeida@gmail.com

Palavras-Chave: Diagnóstico molecular, PCR, Extração de DNA.

Introdução

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

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



O'Donnell (1993), que estabeleceram a base para o uso dos marcadores ITS, CAL e rDNA em análises moleculares de fungos.

Embora métodos moleculares tenham sido validados em outros contextos, a falta de estudos direcionados às populações locais de *Sporothrix* dificulta a aplicação prática desses métodos na Amazônia (Machado et al., 2025). Questões como o desempenho de diferentes métodos de extração de DNA, sensibilidade e especificidade dos marcadores moleculares e a reprodutibilidade dos resultados permanecem sem respostas claras (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2014a). Além disso, a ausência de validação experimental e *in silico* para combinações de marcadores e enzimas de restrição limita a implementação de técnicas como a RFLP-PCR, que poderia oferecer soluções rápidas e acessíveis para identificação de espécies em cenários clínicos e ambientais (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015b).

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

Material e Métodos

Tipo de Estudo

O presente trabalho caracteriza-se como uma pesquisa laboratorial experimental, de natureza descritiva e analítica. Foram empregadas técnicas de biologia molecular que incluíram a extração de ácidos nucleicos, PCR convencional, digestão enzimática (*in silico*) e análises filogenéticas, com o objetivo central de validar uma abordagem molecular viável para a identificação de espécies patogênicas de *Sporothrix* em Manaus, Amazonas.

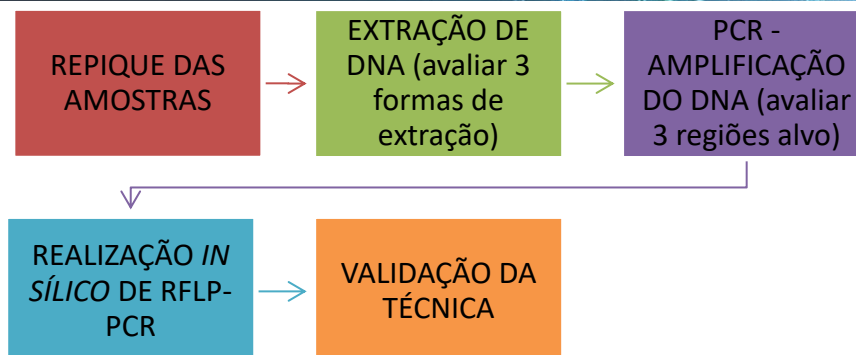


Figura 1 - Fluxograma da metodologia e dos procedimentos

Cepas Padrão

Foram utilizadas cepas padrão de *Sporothrix* para fins de comparação e identificação das espécies. As cepas que foram utilizadas são *Sporothrix schenckii* (ATCC CFP 00746), e *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4606), obtidas do American Type Culture Collection (ATCC), além de *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404 como controles. Também foram incluídos isolados regionais de *Sporothrix* pertencentes ao acervo do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), provenientes de felinas atendidos em clínica veterinária da cidade de Manaus, Amazonas.

Procedimentos de Extração de DNA

Avaliação da eficácia de três diferentes métodos de extração de DNA

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

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

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



com superfícies de sílica sob alta força iônica, permitindo eficiente purificação mesmo na presença de contaminantes celulares.

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

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

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

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

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

Após o período de precipitação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, mantendo o pellet de DNA. A purificação foi realizada com duas lavagens em etanol 70%: em cada uma, adicionou-se 500 µL de etanol, seguido de



homogeneização por inversão e centrifugação a 13.500 rpm por 15 minutos. O etanol residual foi completamente eliminado utilizando pipeta de 200 µL. Para remoção de vestígios de álcool, os microtubos permaneceram semiabertos em termobloco a 65 °C por 10 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de tampão de eluição TE, sendo os microtubos devidamente identificados com informações sobre a amostra, data e concentração. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até completa eluição e, posteriormente, armazenadas em geladeira específica para DNA extraído.

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (Gene Quant pro RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 260 nm, onde uma unidade de absorbância é equivalente a 50 µg/ml. A pureza do DNA foi avaliada pela relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Uma diluição 1:50 foi preparada utilizando 4 µL do DNA bruto e 196 µL de água MilliQ. A leitura foi realizada na função “DNA”, com ajuste prévio do fator de diluição. Os parâmetros de concentração (ng/µL) e razão de pureza (A260/280 e A260/230) foram anotados. Após a quantificação, o DNA foi diluído para a concentração desejada para uso em PCR, de acordo com a fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$. As amostras diluídas foram armazenadas em tampão TE, em microtubos de 500 µL, devidamente rotulados e mantidos na geladeira de DNA extraído.

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

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

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

Quadro 1 - Referências de primers para cada região alvo

REGIÃO	PRIMER FORWARD	SEQUÊNCIA DO PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	SEQUÊNCIA DO PRIMER REVERSE	REFERÊNCIA
ITS	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3'	White et al., 1990



ITS/LSU	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGT AACAAG-3'	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3'	Santos et al., 2010
D1/D2 do 28S (LSU rRNA nuclear)	NL1	5'-GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG-3'	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3'	Kurtzman et al., 2006

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

Para cada marcador, o limite de detecção foi meticulosamente avaliado, empregando uma série de diluições de DNA em dez concentrações distintas, variando de 100 ng/μL a 1 pg/μL. As amostras foram submetidas à PCR em um termociclador padrão, sob condições rigorosamente otimizadas para cada marcador, como está descrito na Quadro 2, consistindo em um protocolo de 35 ciclos de amplificação.

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

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



GCATATCAA TAAGCGGAG GAAAAG-3' Reverse (NL4): 5'- GGTCCGTGTT TCAAGACGG- 3'	Tampão 1x = 3 µL MgCl ₂ = 1,2 µL dNTPs = 3 µL Primer F = 1,5 µL Primer R = 1,5 µL Taq polimerase = 0,3 µL Em cada tubo: Mix = 25 µL Amostra = 5 µL	94 °C por 3 minutos 35 ciclos: • Desnaturação: 94 °C por 1 minuto • Anelamento: 50 °C por 1 minuto • Extensão: 72 °C por 2 minutos Extensão Final: 72 °C por 7 minutos
--	---	--

Análise *in silico* de RFLP-PCR

A triagem de polimorfismos na região ITS foi realizada digitalmente no software NEBcutter V3.0 (New England Biolabs). Foram inseridas sequências do tipo TYPE obtidas no GenBank para as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *A. niger* e *C. albicans*. Avaliaram-se as seguintes endonucleases de restrição: *HaeIII*, *MspI*, *HinfI*, *DdeI* e *RsaI*, mapeando os tamanhos teóricos dos fragmentos em pares de bases (pb) e comparando os perfis de restrição gerados para validar o potencial de discriminação taxonômica.

Confirmação Filogenética

A validação taxonômica final dos isolados foi efetuada pelo alinhamento de sequências ITS de quatro clínicas locais com sequências de referência do NCBI. A reconstrução filogenética foi conduzida no software MEGA X utilizando o método Neighbor-Joining e suporte bootstrap com 1.000 réplicas, adotando *A. niger* e *C. albicans* como grupos externos.

Análise Estatística

Os experimentos foram executados em triplicata biológica e técnica. Os dados numéricos de rendimento de extração foram computados para média e desvio padrão. As diferenças de eficiência e intensidade de bandas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) por meio do Microsoft Excel, fixando o critério de significância estatística em $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Eficiência Comparativa dos Métodos de Extração

A avaliação espectrofotométrica revelou que o protocolo adaptado por fenol-clorofórmio superou significativamente os demais em termos de rendimento quantitativo, fornecendo as concentrações mais elevadas de DNA genômico. Na Figura 2 apresenta as concentrações médias e os índices de pureza obtidos pelos métodos fenol-clorofórmio, coluna de sílica e precipitação por acetato. As médias de maior destaque ocorreram em *S. schenckii* ($86,81 \pm 81,61$ ng/ μ L) e *C. albicans* ($44,55 \pm 21,35$ ng/ μ L). O método de precipitação por acetato demonstrou rendimento intermediário *C. albicans* ($15,91 \pm 10,29$ ng/ μ L), enquanto o método de colunas de sílica resultou nos menores valores quantitativos em todas as amostras estudadas, registrando seu ápice em isolados regionais de *Sporothrix* ($7,69 \pm 8,34$ ng/ μ L).

Apesar das disparidades em massa recuperada, todas as três técnicas preservaram índices de pureza satisfatórios, operando em intervalos de razão (260/280 nm) de 1,6 e 2,25. Estudos anteriores corroboram esse achado. Kumar e Mugunthan (2018) destacam que a extração por fenol-clorofórmio é altamente eficiente devido à sua capacidade de remover contaminantes e proteínas. Fernandes et al. (2023) também observaram que este método produz DNA de melhor qualidade para análises moleculares, sendo preferível para PCR. No entanto, a manipulação de reagentes tóxicos pode ser uma limitação prática. Em comparação, o estudo de Fernandes et al. (2023) sugere que o uso de colunas de sílica pode ser mais seguro, ainda que gere menor rendimento. A elevada eficácia do fenol-clorofórmio pode ser atribuída à sua habilidade de fracionar proteínas e polissacarídeos, garantindo recuperação seletiva do DNA. Futuras adaptações poderiam mitigar a toxicidade sem comprometer a eficiência.

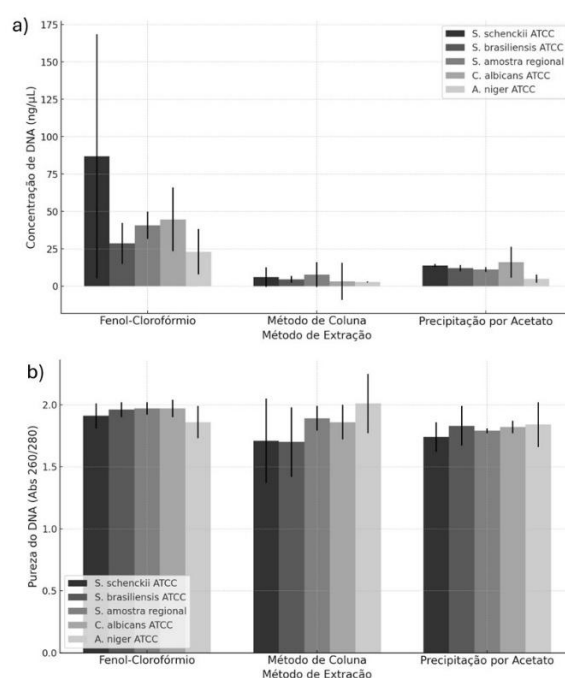


Figura 2 – Avaliação comparativa dos métodos de extração de DNA aplicados aos isolados fúngicos *Sporothrix schenckii* ATCC CFP-00746, *Sporothrix brasiliensis* ATCC MYA-4606, *Sporothrix* amostra regional, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. (a) Concentração média de



DNA (ng/ μ L) obtida pelos métodos Fenol-Clorofórmio, Coluna de Sílica e Precipitação por Acetato. (b) Pureza média do DNA extraído, expressa pela razão das absorbâncias a 260/280 nm. As barras de erro representam o desvio padrão das medidas realizadas em triplicata.

Amplificação com diferentes marcadores moleculares

A eficiência da amplificação de DNA de *Sporothrix brasiliensis* foi avaliada utilizando três pares de primers direcionados a diferentes regiões do DNA ribossomal (Figura 3). Os ensaios de PCR convencional demonstram comportamentos distintos de sensibilidade conforme o par de iniciadores selecionados. O marcador ITS1-ITS4 mostrou-se o mais sensível do estudo, sustentando amplificações inequívocas e bandas perfeitamente visíveis ao longo de toda a curva de diluição, operando desde 20 ng até o limite mínimo analítico de 0,0002 ng.

O par direcionado à região D1/D2 (NL1- NL4) revelou eficiência satisfatória, exibindo sinal robusto até a concentração limiar de 0,0002ng. Em contrapartida, a combinação expandida ITS5-NL4 mostrou o menor desempenho analítico, apresentando bandas discerníveis somente até a diluição de 0,02ng. Tais achados consagram os marcadores ITS1-ITS4 e NL1-NL4 como as principais escolhas para o desenho de diagnósticos moleculares sensíveis direcionados a *S. brasiliensis* em amostras de baixa carga biológica.

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

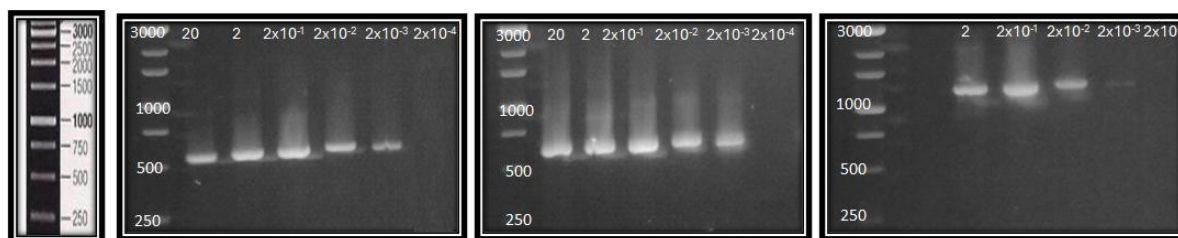




Figura 3 - Amplificação por PCR de regiões do DNA ribossomal de *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA-4606) utilizando os pares de primers ITS1–ITS4 (a), NL1–NL4 (b) e ITS5–NL4 (c), em uma curva de diluição seriada do DNA genômico (20 ng a 2×10^{-4} ng).

Análise de RFLP-PCR experimental e *in silico*

Os dados obtidos por meio da plataforma NEBcutter V3.0 expuseram fragilidades importantes para o emprego da técnica PCR-RFLP na especiação do complexo *Sporothrix*. Como evidenciado na Tabela 1, a proximidade de tamanho entre fragmentos clivados impede a resolução visual na rotina em gel convencional. Com variações teóricas que raramente excedem 2 a 15pb entre as três espécies fúngicas (*S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*), a distinção molecular torna-se impraticável por essa abordagem.

A título de exemplo, a enzima HaeIII gerou fragmentos dominantes de 276pb para *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, mudando sutilmente para 277 pb em *S. globosa*. O mesmo comportamento de sobreposição foi registrado para MspI, HinfI, DdeI e RsaI. No entanto, todas as endonucleases mostraram-se perfeitamente capazes de discriminar os gêneros de controle (*A. niger* e *C. Albicans*), indicando que a utilidade clínica do ensaio se restringe à triagem genérica de infecções fúngicas cruzadas e triagem epidemiológica primária de baixo custo, demandando ferramentas confirmatórias de sequenciamento genético para a especiação de *Sporothrix*.

Estudos de Rodrigues et al. (2015) já haviam relatado que a técnica de PCR-RFLP enfrenta dificuldades na diferenciação de *Sporothrix* devido à similaridade genética entre as espécies. Estudos como os de Etchecopaz et al. (2021) também indicam que o polimorfismo de restrição pode ser pouco informativo para espécies do clado patogênico de *Sporothrix*. Além disso, Nava-Pérez et al. (2022) apontam que variações menores que 20 pb podem não ser suficientes para caracterizar uma espécie em análises laboratoriais práticas. A dificuldade na diferenciação por PCR-RFLP pode estar relacionada à alta conservação genética entre as espécies de *Sporothrix*, especialmente *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. Isso indica que, para aplicações clínicas, métodos alternativos como sequenciamento completo ou PCR com primers específicos podem ser mais eficazes para a identificação de espécies. No entanto, a PCR-RFLP continua sendo uma opção viável para estudos epidemiológicos devido ao seu custo reduzido e facilidade de implementação em laboratórios de rotina.



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

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

A análise filogenética baseada na região ITS gerou uma árvore de alta confiabilidade estrutural. Na figura 4 – Análise filogenética com base na região ITS utilizando o método Neighbor-Joining com suporte de bootstrap, todos os quatro isolados clínicos felinos originários da região Amazônica agruparam-se em um clado monofilético estrito junto à cepa de referência *S. brasiliensis* NR 147565.1 e outros isolados homólogos mapeados no GenBank. Essa descoberta reforça a hipótese de que surtos de esporotricose na Amazônia são predominantemente causados por *S. brasiliensis*. Esses achados se alinham com estudos anteriores, como os de Gremião et al. (2021), que identificaram *S. brasiliensis* como a principal espécie responsável por surtos zoonóticos no Brasil. Além disso, Lima Barros et al. (2011)



demonstraram que *S. brasiliensis* possui maior capacidade de transmissão em gatos, o que pode explicar sua prevalência na Amazônia, dada a alta incidência da doença em felinos na região. A identificação molecular precisa dos isolados regionais pode facilitar o monitoramento epidemiológico e auxiliar na formulação de estratégias de controle da doença.

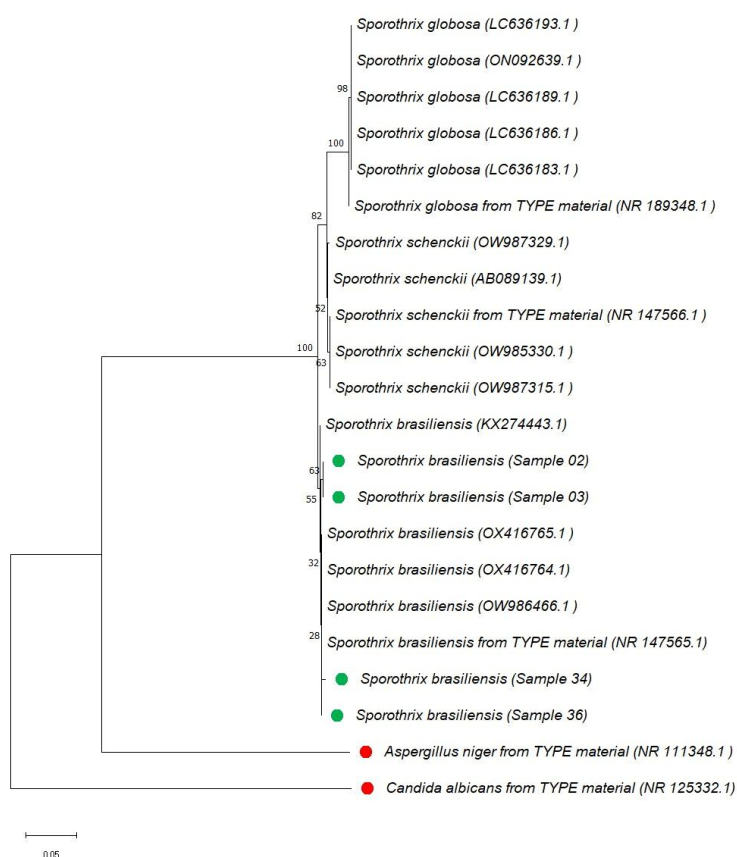


Figura 4 - Análise filogenética com base na região ITS utilizando o método Neighbor-Joining com suporte de bootstrap no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), construída para o marcador molecular espaçador transcrito interno (ITS). A árvore foi construída a partir do alinhamento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

Conclusões

O presente estudo contribuiu para a otimização de metodologia moleculares aplicadas ao diagnóstico da esporotricose. Entre os métodos avaliados, a extração de DNA por fenol-clorofórmio apresentou o melhor desempenho quanto ao rendimento e à qualidade do material



genético. Os marcadores ITS1-ITS4 e NL1-NL4 demonstram maior sensibilidade na amplificação do DNA de *Sporothrix brasiliensis*, evidenciando seu potencial para aplicação em protocolos diagnósticos.

A análise *in silico* da PCR-RFLP revelou limitações na diferenciação das espécies do complexo *Sporothrix*, em razão da elevada similaridade entre os perfis de restrição obtidos. Por outro lado, a análise filogenética confirmou que os isolados amazônicos pertencem ao clado de *S. brasiliensis*, reforçando a predominância dessas espécies na região.

Em conjunto, os resultados fornecem subsídios para o aprimoramento do diagnóstico molecular e para o fortalecimento das ações de vigilância epidemiológica da esporotricose na Amazônia.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo suporte laboratorial e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (PPGCF-UFAM) pelo apoio institucional. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- BRUNS, T. D. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/223397588>>.
- CHENG, Yi *et al.* Molecular diagnostics and pathogenesis of fungal pathogens on bast fiber crops. PathogensMDPI AG, 1 mar. 2020.
- DE LIMA BARROS, Mônica Bastos; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. Clinical Microbiology Reviews, out. 2011.
- ETCHECOPAZ, Alejandro *et al.* *Sporothrix brasiliensis*: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. Journal of FungiMDPI AG, , 1 mar. 2021.
- EZEONUEGBU, Blessing Amaka *et al.* Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. Scientific Reports, v. 12, n. 1, p. 2094, 8 fev. 2022.
- FERNANDES, Blenda *et al.* Sporotrichosis: In silico design of new molecular markers for the *Sporothrix* genus. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 56, 2023.
- FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. Journal of Clinical Microbiology, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.
- GONÇALVES, Nelson Veiga *et al.* Occurrence of sporotrichosis in Belém, Pará, Brazil: a metaphor for unsustainable socioeconomic development. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 28, n. 5, p. 103872, set. 2024.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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