



MARCELA DE SOUZA

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA
IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *FUSARIUM* DE AMOSTRAS
CLÍNICAS

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARCELA DE SOUZA

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA
IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *FUSARIUM* DE AMOSTRAS
CLÍNICAS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. PLINIO TRABASSO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
MARCELA DE SOUZA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. PLINIO TRABASSO.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89c Souza, Marcela de, 1988-
Comparação de técnicas moleculares para identificação das espécies de *fusarium* de amostras clínicas / Marcela de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Plínio Trabasso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Fusarium*. 2. Micoses. 3. Identificação. I. Trabasso, Plínio, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma:

Comparison of molecular techniques for identification of *fusarium* species from clinical samples

Palavras-chave em inglês:

Fusarium

Mycoses

Identification

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Plínio Trabasso [Orientador]

Mariângela Ribeiro Resende

Luci Corrêa

Data de defesa: 13-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARCELA DE SOUZA

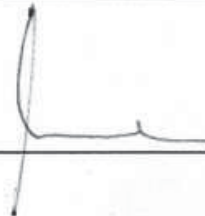
ORIENTADOR: PROF. DR. PLINIO TRABASSO

MEMBROS:

1. PROF. DR. PLINIO TRABASSO



2. PROF. DR. MARIANGELA RIBEIRO RESENDE



3. PROF. DR. LUCI CORRÊA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Sérgio e Célia e minha irmã Juliana
por todo o apoio e incentivo. Ao meu namorado
Ricardo pelo amor e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu orientador prof. Dr. Plínio Trabasso por ter acreditado em mim, e ter me proporcionado a concretização de um grande sonho, a realização do meu mestrado. O meu imenso e eterno agradecimento por todo o ensinamento, dedicação e pelas sabias palavras.

Aos meus pais Sérgio L. de Souza e Célia R. Remp, pelos valores passados durante a minha criação, pelo incondicional amor e incessante estímulo.

À minha irmã Juliana R. de Souza por todo o carinho e companheirismo.

Ao meu namorado Ricardo por todo o amor e compreensão e por me apoiar de forma incondicional no desenvolvimento desse trabalho.

À profa. Dra. Maria Luiza Moretti por todo apoio, incentivo, pela companhia e amizade no momento que mais precisei e por ter me acolhido em seu laboratório.

Ao pesquisador Dr. Matsuzawa, por todo o ensinamento, compreensão e pelo grande auxílio para a realização desse trabalho.

Às funcionárias Ariane F. B. Lopes e Éri van Ribeiro do laboratório de Epidemiologia Molecular e Fungos da FCM- UNICAMP, pelo auxílio na parte experimental do meu trabalho, por todo o carinho e pela grande amizade.

Às pós graduandas Franqueline Reichert Lima e Adenilza C. S. Fonseca, por toda nossa amizade e companheirismo.

À profa. Angélica Zaninelli Schreiber e a Luzia Lyra meus profundos agradecimentos por toda a colaboração e disponibilidade do Laboratório de Investigação em Fungos da FCM- UNICAMP.

À Eliene Pinheiro por ter me ajudado inúmeras vezes com a parte burocrática e por todo o carinho e amizade.

Ao professor Carlos Emílio Levy e a toda a equipe do laboratório de Microbiologia FCM – UNICAMP pela disponibilidade do laboratório e pela grande colaboração, meu muito obrigada.

Às enfermarias de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea do HC- UNICAMP por todo apoio, dedicação e colaboração para a coleta das amostras.

Às professoras Dra. Sílvia Figueiredo Costa, Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, Dra. Anna Sara Levin, e a toda a equipe do laboratório do Laboratório de Microbiologia do HC- FMUSP pela grande colaboração em nos ceder as amostras.

Às minhas amigas Érica Caria, Carla S. Chamouton, Luísa R. Dall'Agnol, Juliana Hulshof, Ana Paula Francisconi, Flávia Rezende, Daniela P. Basqueira e Débora Sant Anna por todo incentivo e amizade.

À todos os pesquisadores do projeto JICA pelos treinamentos e pela amizade.

À FAPESP e à JICA meu muitíssimo obrigada pelo auxílio financeiro, o qual foi fundamental para que esse trabalho fosse desenvolvido.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo comparar o desempenho das técnicas de microarranjo de DNA (DNA *microarray*), amplificação circular isotérmica (*Loop mediated isothermal amplification* (LAMP)), PCR em tempo real e sequenciamento de DNA para a identificação das espécies de *Fusarium*, agentes de infecção da corrente sanguínea, isolados de pacientes com doenças onco-hematológicas do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp) e do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em um estudo de corte retrospectivo. Foram selecionados 21 amostras de *Fusarium* isoladas de sangue, sendo 17 amostras da micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM-Unicamp) e três amostras da micoteca do Laboratório de Microbiologia da FMUSP. As metodologias de DNA *microarray*, LAMP e PCR em tempo real, identificaram 17 das 21 amostras como complexo *Fusarium solani* e quatro como complexo *Fusarium* não - *solani*, apresentando um alto desempenho, uma concordância de 100% entre elas e uma sensibilidade de 100% para as metodologias DNA *microarray*, LAMP e PCR em tempo real e uma especificidade de 100% para a metodologia de LAMP. Esses dados foram validados pela metodologia de sequenciamento de DNA, a qual identificou 17 amostras como complexo *Fusarium solani* e quatro como *Fusarium* complexo não – *solani*, sendo três *Fusarium napiforme* e um *Fusarium oxysporum*, concordando com os resultados encontrados nas três metodologias aplicadas neste trabalho. A técnica de LAMP demonstrou ser mais acessível do que as técnicas de DNA *microarray* e PCR em tempo real por ser mais rápida, indicando ser uma metodologia promissora para ser utilizada na rotina de diagnóstico de fungos filamentosos, auxiliando em uma terapia apropriada de uma forma rápida e específica, proporcionando assim uma melhora na assistência prestada ao paciente.

ABSTRACT

This study aimed to compare the performance of the techniques of DNA microarray, loop mediated isothermal amplification (LAMP), real-time PCR and DNA sequencing for identification of species of *Fusarium* as agents of bloodstream infection, isolated from patients with hematologic malignancies cared for at the university hospital of State University of Campinas and the university hospital of University of Sao Paulo, in a retrospective cross study. In the study, 21 *Fusarium* isolates from blood were selected, being 17 samples of mycology collection of the Laboratory for Research on Fungi (LIF), Faculty of Medical Sciences, Campinas (FCM-Unicamp) and three samples of mycology collection of the Laboratory of Microbiology of FMUSP. The techniques of DNA microarray, LAMP and Real-Time PCR identified 17 of the 21 samples as *Fusarium solani*, and 4 isolates as *Fusarium non-solani* complex, showing a high performance, a 100% agreement among them and a sensitivity of 100% for the DNA microarray, LAMP and real-time PCR methods and a 100% specificity for the LAMP method. These data were validated by the DNA sequencing technique, which identified 17 isolates as *Fusarium solani* complex and not four as *Fusarium non-solani* complex, being three *Fusarium napiforme* and one *Fusarium oxysporum*, agreeing with the findings in the three methodologies applied in this work. The LAMP technique proved to be more accessible than the techniques of DNA microarray and real-time PCR to be faster, indicating a promising methodology to be used in routine diagnosis of filamentous fungi, aiding in proper therapy rapid and specific manner, thereby providing an improvement to the care of patients.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: <i>Fusarium</i> de cultura de sangue do HC UNICAMP de 2006 a 2012	42
Tabela 2: <i>Fusarium</i> de cultura de sangue do HC USP	42
Tabela 3: Resultados da técnica de sequenciamento comparados nos bancos de dados.	46
Tabela 4: Resultados da sensibilidade e da especificidade das três técnicas moleculares	47
Tabela 5: Resultados da comparação das três técnicas moleculares	47
Tabela 6: Comparação dos estudos com a metodologia de DNA microarray	53
Tabela 7: Comparação dos estudos com a metodologia de LAMP	54
Tabela 8: Comparação dos estudos com a metodologia de PCR em tempo real	56
Tabela 9: Comparação dos estudos com a metodologia de Sequenciamento de DNA	58

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Desenho de quatro pares de *primers* da técnica de LAMP, reconhecendo seis regiões distintas do gene alvo. Figura retirada do site *Eiken Genome*. Disponível a partir de <http://loopamp.eiken.co.jp/e/LAMP/index.html>. Acesso em: 19 de dezembro de 2012. 22
- Figura 2:** Mapa de construção do *array*. 35
- Figura 3:** Representativo padrão de hibridização do complexo *Fusarium* não-*solani* (1), complexo *Fusarium solani* (2) e do controle positivo utilizado na técnica DNA microarray. 43
- Figura 4:** produtos da reação de LAMP observados no gráfico do aparelho medidor de turbidez em tempo real (Loopamp EXIA; Eiken). 44
- Figura 5:** Gráficos de amplificação da sonda (a) complexo *Fusarium* não-*solani* e de não amplificação da sonda (b) complexo *Fusarium solani*, tendo como resultado *Fusarium* complexo não *solani*. 44
- Figura 6:** Gráficos de amplificação das sondas (a) complexo *Fusarium* não-*solani* e (b) complexo *Fusarium solani*, tendo como resultado *Fusarium* complexo *solani*. 45
- Figura 7:** Árvore filogenética mostrando a relação entre as espécies de *Fusarium* de sangue. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequência do gene EF1 α , utilizando o método *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições. 48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PCR	Reação em cadeia da polimerase
ERIC-PCR	Consenso de repetição intergênica de enterobactéria.
PCR- RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
REP-PCR	Técnica de PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas
AFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados
MLST	Tipagem sequencial de multilocus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LAMP	Amplificação circular isotérmica
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
HC-UNICAMP	Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas
HC-FMUSP	Hospital de Clínicas da Univeridade de São Paulo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
NaOH	Hidróxido de sódio
Tris-HCl	Tris-Ácido clorídrico
GENBANK	Centro nacional de informação biotecnológica
MLST <i>Fusarium</i>	Banco de dados de <i>Fusarium</i>
BIOEDIT	Programa de computador para alinhamento de sequências
ITS	Internal transcribed spacer (espaçador interno transcrito)
TBE	Tris/Borato/EDTA
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ATSQ	Programa para alinhamento de sequências
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
JICA	Agência de cooperação internacional do Japão

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Epidemiologia das infecções por <i>Fusarium</i> spp.	17
1.2. Métodos moleculares para identificação de <i>Fusarium</i> spp.	20
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS	28
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
4.1. Período do estudo	31
4.2. Desenho do estudo	31
4.3. Caracterização do local de estudo.	31
4.4. População de estudo e seleção da casuística.....	31
4.4.1. Seleção dos casos	31
4.5. Avaliação dos casos	31
4.5.1. Métodos laboratoriais microbiológicos.....	31
4.5.1.1. Identificação das Cepas.....	31
4.5.1.2. Crescimento dos microrganismos isolados.....	32
4.5.1.3. Técnica de extração de DNA.....	32
4.5.1.4. Técnica de DNA <i>microarray</i>	32
4.5.1.5. Técnica de amplificação circular isométrica (<i>Loop – mediated isothermal amplification</i> (LAMP)).	35
4.5.1.6. Técnica de PCR em Tempo real	36

4.5.1.7.	Técnica de Sequenciamento.....	38
4.5.1.8.	Árvore Filogenética.....	40
4.6.	Suporte financeiro.....	40
5.	RESULTADOS	41
5.1.	População de estudo	42
5.2.	Identificação molecular das espécies de <i>Fusarium</i> spp.	43
5.2.1.	Técnica de DNA <i>microarray</i>	43
5.2.2.	Técnica de amplificação circular isométrica (Loop – mediated isothermal amplification (LAMP).....	43
5.2.3.	Técnica de PCR em Tempo real.....	44
5.2.4.	Técnica de Sequenciamento.....	45
5.2.5.	Comparação entre as técnicas de identificação molecular.	46
5.2.6.	Árvore Filogenética	48
6.	DISCUSSÃO.....	49
7.	CONCLUSÃO	61
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9.	ANEXOS	83
9.1.	Anexo1. Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.	84
9.2.	Anexo 2. Termo de consentimento Livre e Esclarecido.....	87
	Consentimento Livre e Esclarecido.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia das infecções por *Fusarium* spp.

Fungos são microrganismos que podem provocar diversas doenças no ser humano. A gravidade da infecção fúngica varia desde as formas cutâneas leves até quadros graves que levam à septicemia. Aproximadamente 100 mil espécies de fungos são conhecidas e cerca de 300 já foram identificadas como agentes etiológicos de infecções em seres humanos. Os fungos são classificados segundo a sua morfologia em filamentosos, leveduriformes ou dimórficos (1).

Infecções fúngicas representam uma importante complicação para pacientes imunodeprimidos e especialmente pacientes com leucemia aguda após quimioterapia intensiva, a qual a taxa global é de 10% ou com transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas, com uma taxa de 10 á 20% (2, 3, 4). Muitas dessas infecções são de origem endógena e outras podem também ser adquiridas por via exógena, pelas mãos dos trabalhadores da área da saúde, infusões contaminadas, biomateriais e fontes inanimadas ambientais (5).

Micoses em imunocomprometidos são frequentemente causadas por leveduras. Sendo a *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp. os isolados mais frequentes. Recentemente fungos filamentosos têm sido identificados com uma maior frequência nesses pacientes, sendo esse fato atribuído ao uso de antifúngicos profiláticos para prevenir infecções por leveduras, como o uso de profilaxia universal com fluconazol onde muitos centros relataram como resultado uma redução acentuada na incidência de infecções de corrente sanguínea por *Candida*. Os fungos filamentosos geralmente isolados são *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e *Penicillium* e também tem aumentado a incidência dos *Zimomicetos* aceptados. (6, 7). Sendo o *Fusarium* o segundo fungo filamento que mais causa doença infecciosa em imunocomprometido, após o *Aspergillus* (2, 8, 9).

Membros do gênero *Fusarium* são hialohifomicetos pertencentes à ordem Hipocreales (ascomicetos), são saprófitas encontrados no solo sendo patogênicos para plantas, animais e humanos. (10, 11, 12). Contaminação de comida por fungos desse gênero pode causar micotoxicosis em animais e com menor frequência em humanos, com manifestações clínicas que variam desde gastroenterite leve a aplasia de medula óssea. Infecções por *Fusarium* podem ser localizada ou sistêmica, em indivíduos saudáveis geralmente são locais e incluem ceratites, especialmente associadas com trauma ocular, onicomicoses, sinusites alérgicas, paroníquia e dermatomicoses, por outro lado, em pacientes imunocomprometidos podem tornar-se infecções sistêmicas graves, se

disseminadas pela corrente sanguínea, principalmente se o indivíduo tiver neutropenia grave e persistente (12, 13).

Fusariose invasiva é uma das mais graves infecções fúngicas invasivas, com uma taxa de mortalidade alta, que varia de 70% a 90% em pacientes imunocomprometidos, sendo afetados principalmente pacientes com doenças hematológicas malignas e transplantados de células tronco hematopoiéticas. A infecção é adquirida pela inalação de conídios que estão vastamente espalhados pelo meio ambiente com subsequente disseminação hematológica, além disso, a pele pode ser ocasionalmente a porta de entrada com rupturas no tecido ou onicomicoses (11, 14, 15, 16).

Desde o primeiro caso de fusariose invasiva descrito por Cho et al. (17), houve um significativo aumento na incidência de fusariose disseminada em muitos países, provavelmente refletindo no aumento do número de imunocomprometidos e ao uso de profilaxia com azólicos. Nucci et al. (18) em um estudo retrospectivo o qual analisou 84 pacientes (70 portadores de neoplasias hematológicas malignas e 5 portadores de anemia aplásica) com Fusariose em onze centros no Brasil e em um centro nos Estados Unidos, encontrou que 79% desses pacientes apresentaram fusariose invasiva. Em outro estudo realizado por Nucci et al. (11), foram analisadas 61 pacientes transplantados de medula óssea (54 transplantes alogênicos e 7 autólogos) de dois centros nos Estados Unidos e de sete no Brasil de 1985 a 2001 com fusariose invasiva. No Brasil também foram relatados 23 casos de fusariose invasiva em portadores de anemia mieloide aguda, mielodisplasia e transplante alogênico de células tronco em um estudo prospectivo realizado por Nucci et al. (19), em oito centros de maio de 2007 a julho de 2009. Nos Estados Unidos, Campo et al. (20) relataram 44 casos de fusariose disseminada (23 portadores de doenças hematológicas e 21 transplantados de medula óssea) em um estudo realizado entre 1998 e 2009, em um centro do câncer na Universidade de Texas.

Outros países também apresentaram relatos como na Itália Pagano et al. (21), em um estudo retrospectivo de 1999 a 2003 com pacientes portadores de doenças hematológicas em um centro, identificou 15 casos de fusariose invasiva sendo a segunda mais encontrada após a aspergilose dos 346 casos de fungos filamentosos estudados, e Tortorano et al. (22) identificou 75 casos de Fusariose invasiva de 1985 a 2007 em dois hospitais no norte da Itália. Na Austrália, Slavin et al. (23) identificou 5 de fusariose invasiva de 43 casos relatados de infecção invasiva por fungo filamentoso de 1998 a 2000 no banco de dados de micologia da Austrália. E Hsiue et al. (24) em um estudo

retrospectivo de 2000 a 2008 para identificação de fungos filamentosos não *Aspergillus* em um hospital em Taiwan, identificou 12 casos de fusariose invasiva dos 27 casos positivos para fungos filamentosos não *Aspergillus*.

Aproximadamente 70 espécies de *Fusarium* vêm sendo envolvidas em infecções em humanos, sendo as principais espécies relatadas *F. solani*, *F. chlamydosporum*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, and *F. verticillioides*, entre outras (8, 13, 25). Entretanto, *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, são as espécies mais envolvidas frequentemente em fusariose (26, 27, 28).

Espécies de *Fusarium* são relativamente resistentes ao tratamento com agentes antifúngicos (29). As drogas que vem sendo mais efetivas contra fusariose são voriconazol, anfotericina B e posaconazol, embora em geral, a resposta clínica a eles devem ser considerados apenas modesta (8, 20). Consequentemente, um diagnóstico rápido, precoce e preciso do fungo patogênico é crucial para uma intervenção imediata e uma seleção da terapêutica antifúngica apropriada, que pode ser fundamental para uma melhoria nos desfechos (2, 30).

O diagnóstico definitivo de fusariose requer o isolamento de *Fusarium* spp de amostras clínicas como sangue, pele, mama e pulmão. A cultura é fundamental para a identificação desse organismo, porque esse fungo e outros membros da família hialohifomicoses dividem características microscópicas e histopatológicas similares, onde a morfologia da colônia de *Fusarium* é inicialmente branca e coberta por um micélio aéreo plumoso que ao se maturar, produz pigmentos de cores variadas na superfície e no verso. Em sua micromorfologia apresentam hifas hialinas septadas, microconídeos de 2 a 3 um de diâmetro e macroconídeos com forma de “banana” ou de “foice” (9, 12, 31, 32). O diagnóstico definitivo desse fungo também requer outros critérios que incluem quadro clínico compatível, uma exame micológico direto com hifas septadas típicas, crescimento a 45° e o isolamento de *Fusarium* em duas culturas sucessivas com a ausência de outros fungos (12).

Métodos tradicionais para a diferenciação de espécies de *Fusarium* são demorados e requerem um alto nível de conhecimento. Várias espécies de *Fusarium* morfologicamente similares são agrupadas em espécies complexas de *Fusarium solani* (ECFS), porém maior caracterização genotípica das espécies com esse complexo é necessária e geralmente não é feito rotineiramente em laboratórios clínicos. Membros dessas espécies complexas são geralmente relatados na literatura como *Fusarium solani* (33). A este respeito métodos moleculares podem contribuir para o reconhecimento

desses isolados e para a identificação das espécies morfológicamente indistinguíveis (34).

1.2. Métodos moleculares para identificação de *Fusarium* spp.

Métodos baseados em ácidos nucleicos são frequentemente usados em laboratórios para identificar *Fusarium* spp. Vários métodos diferentes têm sido utilizados para tipagem molecular de isolados de fungos associados a surtos. Segundo Jureen et al apud Godoy et al (33). mostraram que o consenso de repetição intergênica de enterobactéria (ERIC-PCR) e o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) foram úteis para a genotipagem de isolados de *Fusarium*. Outros métodos vêm sendo utilizados incluindo: a técnica de PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR), polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), e tipagem sequencial de multilocus (MLST). Recentemente, genotipagem baseada em microesfera *array* também foi descrito (33).

Microarranjo de DNA (“ DNA microarray”)

Em um curto período de tempo, a tecnologia de microarranjo de DNA ("DNA *microarray*") se tornou uma ferramenta fundamental para a detecção e análise da sequência de ácido nucleico (35).

Essencialmente, a tecnologia de microarranjo de DNA, é utilizada para a identificação de fragmentos de DNA, tais como os produtos de PCR, e pode ser útil para a identificação e diferenciação de um grande número de microrganismos em paralelo (36). Um *array* de captura de oligonucleotídeos para a identificação gênero, espécies ou subespécies específicas, representando o microrganismo a ser identificado são imobilizados em uma superfície sólida como uma lâmina de vidro ou de plástico, esta lâmina pode ser produzida com DNA marcado a partir amostra clínica de interesse, utilizando sondas consensos para amplificar e marcar e as sondas hidridizadas, tornando possível a diferenciação de um grande número de organismos a partir de um único PCR (35, 37).

Atualmente a tecnologia de microarranjo do DNA vem sendo utilizada em muitos estudos para a identificação de microrganismos de importância clínica como: vírus e bactérias de doenças respiratórias (38), bactérias patogênicas (36), *Gibberella zeae* (39), fungos filamentosos patogênicos (40, 41), procariotos, vírus e eucariotos (42), fungos de

doenças respiratórias (43), fungos de micoses invasivas e superficiais (44, 45), fungos patogênicos para pacientes neutropênicos (3), fungos patogênicos (46), fungos e bactérias causadores de infecção sanguínea (47), espécies de *Candida* não *albicans* (48), *Fusarium* (3, 43, 44, 49).

Além da diferenciação de um grande número de organismos em um único teste, a técnica de microarranjo de DNA, também apresenta outras vantagens: é um método rápido, tendo a análise na plataforma de microarranjo a partir do DNA extraído em uma duração de 5 horas em comparação com os 3 ou mais dias utilizados nos métodos convencionais; fácil de realizar; no passo de hibridação a sequencia específica dos agentes patogênicos não é detectada ambigualmente, pois são removidos os artefatos resultados da amplificação de PCR e para análise de amostras de sangue são necessários somente 10 microlitros, enquanto que para testes bioquímicos são necessários mais de 2 ml (37, 46, 50).

Em contraste a técnica também apresenta suas desvantagens: a tecnologia de microarranjo de DNA ainda não é bem estabelecida para ser utilizada na rotina de diagnósticos clínicos; baixa sensibilidade na detecção de menores números de cópias do DNA alvo; a fase de hibridização é restrita a superfície da lâmina, o que reduz a sua eficiência; é necessário desenhar mais de uma sonda por espécie para evitar reação cruzada e o desenho das sondas específicas é o passo mais crítico onde requer um profissional com um alto entendimento da composição genética de organismos causadores de doenças (45, 51).

Amplificação circular isotérmica (*Loop – mediated isothermal amplification* (LAMP)).

Amplificação circular isotérmica (*Loop – mediated isothermal amplification* (LAMP)) foi primeiramente descrita e inicialmente avaliada para detecção do DNA do vírus da hepatite B (52). Atualmente vem sendo aplicada como uma técnica de alta especificidade e sensibilidade na detecção de DNA de patógenos. Bactérias: *Enterococcus faecalis* (53), *Pseudomonas aeruginosa* (55), *Streptococcus pneumoniae* (56), *Vibrio parahaemolyticus* (57), *Bordetella pertussis* (58), *Bordetella holmesii* (59), *Chlamydia pneumoniae* (6), *Clostridium difficile* (61), *Mycoplasma pneumoniae* (62), *Brucella* spp. (63), *Mycobacterium tuberculosis* (64), *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (65). Vírus: influenza A (66), papilomavírus (67), vírus da hepatite C (68). Fungos: *Fonsecaea* spp. (52), *Pneumocystis pneumoniae* (69), *Paracoccidioides*

brasiliensis (70) e Parasitas: *Acanthamoeba* (71), *Entamoeba histolytica* (72); *Cryptosporidium* e *Giardia* (73). Também vem sendo utilizada para a identificação de *Fusarium*, porém somente para os fitopatogênicos. (74, 75, 76, 77).

Esta nova técnica pode amplificar o DNA com alta especificidade e eficiência, baixo custo e rapidez sob condições isotérmicas que variam de 60°C a 65 °C durante cerca de 60 minutos, com a utilização de uma DNA polimerase chamada de *Bst polymerase*, a qual faz o deslocamento da fita de DNA e com a utilização de quatro ou seis pares de *primers* reconhecendo entre seis a oito regiões distintas do gene alvo, resultando na acumulação de 10^9 a 10^{10} cópias desse alvo (78, 79, 80). Figura 1 (81).

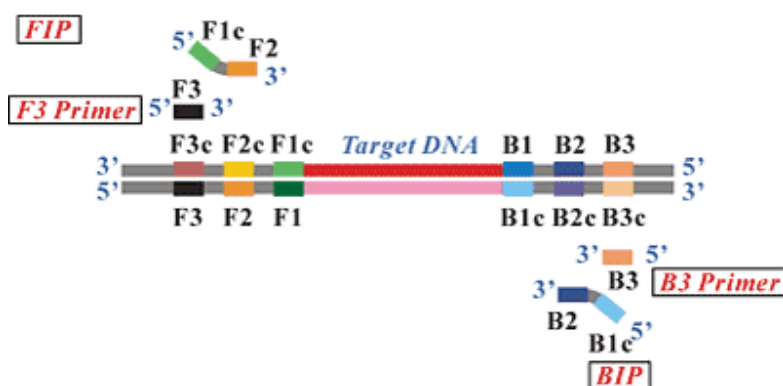


Figura 1: Desenho de quatro pares de *primers* da técnica de LAMP, reconhecendo seis regiões distintas do gene alvo. Figura retirada do site *Eiken Genome*. Disponível a partir de <http://loopamp.eiken.co.jp/e/LAMP/index.html>. Acesso em: 19 de dezembro de 2012.

A amplificação dos produtos resultantes do método de LAMP pode ser detectada não somente pelo uso de equipamentos especializados, mas também pela observação visual da turvação ou fluorescência (69, 82). Além disso, não é necessária a realização do gel de agarose, porque o método LAMP sintetiza grandes quantidades de DNA que podem ser facilmente detectadas pela fluorescência ou turvação (79).

A sensibilidade do LAMP não parece ser afetada pela presença de DNA não alvos nas amostras, nem por inibidores de PCR conhecidos, tais como sangue, soro, plasma, heparina e ingredientes alimentares, por essa razão o método é muito promissor como uma ferramenta para a detecção de microrganismos (52, 83).

Além das vantagens descritas: rapidez; baixo custo; alta especificidade; observação visual do resultado; amplificação de 10^9 a 10^{10} cópias do alvo e não alteração da sensibilidade por componentes de amostras clínicas, a técnica de LAMP também apresenta outras vantagens como: a amostra a ser analisada não necessita de

purificação, o que é trabalhoso e pode levar horas para ser concluído; pode ser utilizada na linha final do cuidado, especialmente em locais com poucos recursos; é uma técnica de detecção de sinal, o que facilita sua adoção para diagnóstico clínico. Porém a técnica de LAMP também apresenta algumas desvantagens como: dificuldade de projetar *primers* viáveis o que desencoraja seu uso prático; além disso, para aumentar sua sensibilidade é essencial a utilização de marcadores fluorescentes que são caros (51).

PCR em Tempo real

Avanços recentes nas técnicas baseadas em DNA, tais como o PCR em tempo real estão fornecendo novas ferramentas para a detecção e quantificação de fungos na detecção e quantificação de seus DNAs (84).

A técnica de PCR em tempo real vem sendo descrita para identificação de diversos microrganismos patogênicos como vírus: hepatite C (85), influenza A/H1N1 (86), bocavírus (87), metapneumovírus (88), astrovírus (89), hepatite E (90), febre amarela (91), herpesvírus 7 (92), dengue (93), e herpesvírus 6 (94). Bactérias: *Salmonella* (95), *Chlamydia pneumoniae* (96), *Shigella* spp (97), *Campylobacter jejuni* (98), *Escherichia coli* enteropatogênica (99), *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* (100), *Staphylococcus aureus* (101), *Streptococcus pneumoniae* (102); *Clostridium difficile* (103), *Pseudomonas aeruginosa* (104) *Mycobacterium immunogenum* (105). Fungos: *Aspergillus* (106), *Pneumocystis jirovecii* (107), *Exserohilum rostratum* (108). Parasitas *Cryptosporidium cuniculus* (109), *Plasmodium knowlesi* (110), *Toxoplasma gondii* (111).

Métodos de PCR em tempo real também vêm sendo descritos para a identificação de várias espécies de *Fusarium*, incluindo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae* e para a correlação entre DNA de um único *Fusarium*, de um grupo de espécies de *Fusarium* e suas correspondentes micotoxinas (112).

A técnica de PCR em tempo real utiliza sondas de hibridização, o que apresenta alta especificidade, sensibilidade e combina uma rápida amplificação do DNA *in vitro* com imediata detecção de fluorescência, permitindo a quantificação do DNA. Neste método, a sonda selecionada é marcada com um corante fluorescente no final 5' da fita e a sonda do doador com uma fluoresceína no final 3' da fita. Quando as sondas receptoras e doadoras se hibridizam com as regiões adjacentes do DNA alvo, pode ocorrer uma interação na transferência de energia de ressonância por Fluorescência (FRET), assim a molécula doadora é excitada por uma fonte de luz externa, a qual subsequentemente transfere essa energia para um fluoróforo, o fluoróforo então emite luz de uma diferente onda, a

qual pode ser detectada e medida por um instrumento *LightCycler* (113). E a técnica PCR em tempo real, pode ser realizado com a utilização de vários kits, como por exemplo SYBR® Green I dye e TaqMan® (84).

Além das vantagens descritas como: alta especificidade; sensibilidade; rápida amplificação do DNA *in vitro* com imediata detecção de fluorescência; quantificação do DNA, a técnica de PCR em tempo real apresenta outra vantagem como: determinar a presença do DNA alvo (51, 114). E algumas desvantagens como: risco de resultados falsos negativos, por possuir uma elevada sensibilidade e especificidade e riscos de resultados falsos positivos por contaminação ambiental, ou de reação cruzada entre os *primers* e as sondas da PCR com fungos ou outros organismos não alvo (51, 115).

Sequenciamento

Sequenciamento de ácidos nucleicos tornou-se uma importante ferramenta, sendo útil para a identificação de bactérias aeróbicas, anaeróbicas, micobactérias, vírus e fungos, incluindo espécies de leveduras. Bactérias: *Escherichia coli* (116), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (117). Vírus: influenza A (118). Fungos: *Histoplasma capsulatum* (119); *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucorales* (120); *Candida não albicans* (48), Espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Kloeckera*, *Malassezia*, *Pichia*, *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*, *Trichosporon* (121); fungos filamentosos hialinos e demácios (122), *Candida*, outras leveduras não *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e dermatófitos (123), Leveduras (*Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula* e outras) (124). E também foram encontrados estudos de sequenciamento em algumas espécies de *Fusarium* com: *F. solani*, *F. chlamydosporum*, *F. verticillioide* (122), *F. solani* (123), *F. fujikuroi*, *F. napiforme*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans* e *F. verticillioide*, *F. oxysporum* (125), *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. avenecum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides* (126), *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. dimerum*, *Fusarium semitectum*, *F. solani*, *F. chlamydosporum* (127).

Essa técnica parece oferecer uma separação mais objetiva do gênero e espécies dos microrganismos do que as técnicas convencionais que não podem identificar totalmente as características morfológicas, especialmente aqueles que não esporulam com 48 horas de cultura (121, 122).

Em relação aos fungos a técnica de sequenciamento vem sendo relatada por identifica-los de uma maneira rápida, mostrando ser uma grande promessa e na última

década, desenvolveu-se principalmente em aplicações de pesquisas tornando-se uma ferramenta de diagnóstico clínico valiosa (128, 129).

O sequenciamento de DNA basicamente envolve cinco passos: 1º preparação das amostras de DNA, 2º geração dos fragmentos complementares à fita molde do DNA, normalmente através dos protocolos de Sanger de terminação de cadeia, 3º separação destes fragmentos por uma técnica de eletroforese em gel, 4º detecção dos fragmentos e 5º análise de dados (130).

Com o uso de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (como 454 pirosequenciamento, Illumina e Ion Torrent), a demanda por sequências de referências de alta qualidade tem aumentado rapidamente. Essas tecnologias geram grandes quantidades de sequências de dados, centenas de milhares a bilhões de leituras dentro de poucas horas ou dias, de tal forma que tecnologias automatizadas para análise dos dados representam a única opção viável. Vários *softwares* estão disponíveis para supervisionar o procedimento de análise, agrupar as sequências e atribuir a taxonomia, entretanto, a identificação de uma taxonomia satisfatória mantém-se problemática no reino fungi, devido a uma grande diversidade de fungos não explorada e a falta de sequências de referências confiáveis (131).

Além das vantagens apresentadas: separação mais objetiva do gênero e espécies dos microrganismos do que as técnicas convencionais; rápida e utilização em pesquisas e desvantagem: taxonomia problemática no reino fungi, devido a uma grande diversidade de fungos não explorada e a falta de sequências de referências confiáveis. Essa técnica também apresenta outras vantagens como: ser considerada o padrão ouro para identificação de fungos, e necessitar de profissionais com uma experiência mínima em tecnologia, em contraste aos métodos morfológicos tradicionais que necessitam de profissionais com uma vasta experiência (120, 123). Em contraste também apresenta outras desvantagens como: o gene alvo deve conter uma região altamente conservada para que ocorra a devida ligação com os *primers*; alguns organismos podem exigir o sequenciamento de mais de um gene alvo, antes de ser feita a identificação definitiva do mesmo; os pontos de corte para a identificação da espécie do microrganismo é arbitrário e pode variar de acordo com inúmeros fatores incluindo, qualidade da sequência, número e acurácia dos registros existentes em banco de dados das mesmas espécies e mesmos loci, comprimento do fragmento da sequência e o programa de software utilizado; erros acima de 20% encontrados nas sequências de fungos dentro do *GenBank* (120, 122, 129).

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho propõe a construção de um *array* da técnica de microarranjo de DNA (DNA microarray) e de *primers* da técnica de amplificação circular isotérmica (*Loop – mediated isothermal amplification* (LAMP)), e utilização das técnicas de PCR em tempo real e sequenciamento de DNA para identificação de *Fusarium* spp. de amostras clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC- Unicamp) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC – FMUSP). Esse conhecimento é interessante tanto para um diagnóstico precoce da infecção por *Fusarium*, quanto para a identificação da espécie específica desse fungo auxiliando assim na terapia antifúngica que é fundamental para uma melhoria dos pacientes.

3. OBJETIVOS

Principal

- Comparar o desempenho das técnicas de microarranjo de DNA (DNA *microarray*), amplificação circular isotérmica (*Loop mediated isothermal amplification* (LAMP)), PCR em tempo real para a identificação das espécies de *Fusarium*, agentes de infecção da corrente sanguínea, isolados de pacientes com doenças onco-hematológicas do Hospital de Clínicas da UNICAMP e do Hospital de Clínicas da FMUSP.

Específicos

- Avaliar o desempenho de *primers* para a identificação de *Fusarium* spp. a partir da cultura de amostras clínicas de sangue de pacientes com doenças onco-hematológicas, através da técnica de LAMP.
- Avaliar o desempenho de um *array* para a identificação de *Fusarium* spp. a partir da cultura de amostras clínicas de sangue de pacientes com doenças onco-hematológicas, através da técnica de DNA *microarray*.
- Determinar a sensibilidade das técnicas de LAMP, DNA *microarray*, PCR em tempo real e a especificidade da técnica de LAMP.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Período do estudo

De fevereiro de 2012 a fevereiro de 2014.

4.2. Desenho do estudo

Corte retrospectivo.

4.3. Caracterização do local de estudo.

O trabalho experimental foi desenvolvido no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Fungos, da Disciplina de Moléstias infecciosas da FCM-UNICAMP.

4.4. População de estudo e seleção da casuística

4.4.1. Seleção dos casos

Foram selecionadas cepas de *Fusarium* spp., isolados de culturas de sangue, da micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos da Faculdade de Ciências da UNICAMP, e da micoteca do Laboratório de Microbiologia do HC-FMUSP.

4.5. Avaliação dos casos

4.5.1. Métodos laboratoriais microbiológicos

Após a seleção das amostras clínicas elegíveis para o estudo, foram realizados os subcultivos e a identificação pelos métodos de análise em plataforma de sequências de oligonucleotídeos (DNA *microarray*), amplificação circular isotérmica (*Loop – mediated isothermal amplification* (LAMP)), PCR em Tempo real e sequenciamento de DNA.

4.5.1.1. Identificação das Cepas

Todas as cepas foram primeiramente identificadas, de acordo com metodologia clássica, executada no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia do HC-UNICAMP e no Laboratório de Bacteriologia FMUSP, utilizando a combinação de

características macroscópicas e micromorfológicas com realização de exame direto da cultura (133), (134).

4.5.1.2. Crescimento dos microrganismos isolados

As cepas foram repicadas em tubos com ágar Sabouraud Dextrose, ou ágar de extrato de malte à temperatura ambiente. Todas as amostras foram repicadas novamente em meio impedinte de pleomorfismo, composto por 30g de peptona, 18g de ágar e 1000mL de água destilada estéril, com posterior repique em tubos de ágar batata, para isolá-las de contaminantes.

4.5.1.3. Técnica de extração de DNA

A técnica de extração de DNA das amostras de *Fusarium* foi realizada de acordo com o método de hidrólise alcalina conforme descrito no protocolo do Kit de PCR de Verocitotoxin genes (Takara bio®, Japão)

As colônias das culturas de fungos filamentosos foram suspensas em 50 µl de água milli-Q e adicionados 50 µl de 100 mM de NaOH a essa suspensão e homogeneizadas usando um micropistilo. Após a homogeneização as amostras foram aquecidas a 95°C por 15 minutos e adicionadas 11 µl do tampão 1M Tris-HCl pH 7,0. Então as amostras foram centrifugadas por 5000 rpm por 2 minutos a 20° C e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos. Ao término da extração os produtos foram mensurados em espectrofotômetro, armazenados a -20°C e posteriormente submedidos as técnicas de DNA *microarray*, LAMP, PCR em tempo real e sequenciamento de DNA.

4.5.1.4. Técnica de DNA *microarray*

A técnica foi realizada de acordo com Ferrari et al. (48) e consistiu de 5 etapas: *a.* elaboração do *array*; *b.* amplificação do DNA alvo por PCR; *c.* desnaturação do DNA (produto de PCR); *d.* hibridização e detecção; *e.* interpretação .

a.* Elaboração do *array

A elaboração da plataforma de DNA *microarray* foi desenvolvida pelo Centro de Pesquisa de Micologia Médica de Chiba, para a identificação de 13 gêneros e 23

espécies de fungos: *Candida guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus* spp., *Trichosporum cutaneum*, *T. asteroides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. faecale*, *T. mucoides*, *Malassezia furfur*, *Aspergillus nidulans*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Penicillium marneffe*, *Fusarium* complexo *solani*, *Fusarium* complexo não-*solani*, com a coleta do sequenciamento desses fungos nos bancos de dados de sequências genéticas, *GENBANK* (135) e *MLST* base de dados de *Fusarium* (136).

Após a coleta dos sequenciamentos desses fungos, foram selecionadas as sequências de oligonucleotídeos no programa *BIOEDIT* (137), para a construção dos *microarrays*. O mapa de construção dos *microarrays* foi realizado no programa *Microsoft Excel*®.

As sequências alvo de cada fungo foram dispostas e fixadas em lâminas de plástico, no laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas da FCM da Unicamp, de acordo com o formato pré definido no programa *Microsoft Excel*®.

b. Amplificação do DNA alvo por PCR

A realização da metodologia implicou na amplificação do isolado testado a partir da cultura. A solução foi preparada da seguinte forma: 1 µl do DNA extraído da colônia do fungo, 12,5µL de *PCR Master Mix* (Promega), 1,25 µl de cada iniciador a 10µM, ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGC) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e água milli-Q para um volume final de 25µL. A PCR foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: Temperatura (°C) Tempo minutos (m) e segundos (s)

Temperatura (°C)	Tempo: minutos (m) e segundos (s)
98	2 m
98	10 s (40 ciclos)
55	30 s (40 ciclos)
42	30 s (40 ciclos)
72	3 m
4	∞

A seguir, os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% utilizando-se tampão TBE 1X ou TAE 1X.

c. Desnaturação do DNA (produto de PCR)

Foram utilizados 4 µl do produto de amplificação e na sequência procedido a aquecimento a 95°C por 2 minutos e resfriamento por 2 minutos.

d. Hibridização e detecção

Foram adicionados 4 µl de amostra de DNA desnaturado + 16 µl do tampão de hibridização e foram aplicados os 20 µl da solução em uma lâmina de plástico de *array* preparada anteriormente. A lâmina foi então coberta com um filme e colocada em uma caixa úmida a qual foi tampada e incubada a 37° C, por 1 hora para a hibridização. Quando completando 30 minutos da hibridização, foi preparada a solução conjugada conforme a descrição a seguir: 1,5 ml tampão de coloração, 24 µl solução A e 24 µl solução B para cada amostra a ser testada.

A seguir o *array* foi colocado no tampão de lavagem a 37°C, removido o filme protetor e a caixa que continha o *array* com o tampão de lavagem foi tampada e colocada na estufa incubadora a 37° C por 5 minutos. Após os 5 minutos, a lâmina foi repousada em papel toalha e adicionada 1,4 mL da solução conjugada em cada lâmina, por 30 minutos.

Após a remoção da solução conjugada, o *array* foi colocado em uma caixa contendo coloração de hibridização por 5 minutos (repetido esse passo 2 vezes). Na segunda vez foi preparada a solução corante (1,5 ml H₂O destilada + 24 µl de cada uma

das soluções 1, 2, 3 e 4 para cada amostra testada). A lâmina foi colocada sobre o papel toalha e adicionada 1,4 mL da solução corante preparada pelo menos 30 minutos antes em cada lâmina. Após esta etapa foi retirada a solução conjugada inclinando o *array* sobre o papel toalha, que depois foi lavado a fim de remover os resíduos, deixado secar naturalmente por 30 minutos e procedido a leitura dos pontos a olho nu.

e. Interpretação

De acordo com o local da lâmina em que ocorreu a hibridização e coloração apareceram os pontos que permitiram a identificação da espécie do fungo de acordo com a comparação com o mapa de construção do *array* (Figura 2).

biotin	<i>Histoplasma capsulatum</i>	biotin	<i>Candida guilliermondii</i>	biotin	<i>Aspergillus nidulans</i>
biotin	<i>Coccidioides posadasii</i>	biotin	<i>Candida lusitanae</i>	biotin	<i>Aspergillus terreus</i>
biotin	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	biotin	<i>Candida krusei</i>	biotin	<i>Aspergillus niger</i>
				biotin	<i>Aspergillus flavus</i>
biotin	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	biotin	<i>Candida glabrata</i>	biotin	<i>Aspergillus fumigatus</i>
biotin	<i>Cryptococcus neoformans</i>	biotin	<i>Candida parapsilosis</i>	biotin	<i>Trichophyton rubrum</i>
		biotin	<i>Candida tropicalis</i>	biotin	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
biotin	<i>Trichosporon cutaneum</i>			biotin	<i>Trichophyton tonsurans</i>
biotin	<i>T. asteroides : T. inkin</i>	biotin	<i>Candida dubliniensis</i>	biotin	<i>Penicillium mameffei</i>
biotin	<i>T. asahii; T. faecale</i>				
	<i>Reichosporon mucoides</i>	biotin	<i>Candida albicans</i>	biotin	<i>Fusarium sp.</i>
biotin	<i>Malassezia furfur</i>				
		biotin	<i>Candida famata</i>	biotin	<i>Fusarium solani</i>
biotin	<i>Mucor sp.</i>	biotin	<i>Candida kefyr</i>		
				biotin	50-19 50-17
				biotin	51-19 51-17
				biotin	52-19 52-17

Figura 2: mapa de construção do array.

4.5.1.5. Técnica de amplificação circular isométrica (*Loop – mediated isothermal amplification* (LAMP)).

A técnica foi realizada baseada em Sun et al. (52), porém foram feitas algumas alterações. Consistiu-se de três etapas; a. elaboração do *primer* e reação de LAMP; b. t sensibilidade e especificidade do teste; c. observação dos produtos da técnica de LAMP.

a. Elaboração dos *primers* e reação de LAMP

A elaboração dos *primers* foi realizada com a coleta do sequenciamento das espécies dos fungos filamentosos: complexo *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium falciforme*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus flavus* nos bancos de dados de sequências genéticas, *GENBANK* (135) e *MLST Fusarium* (136).

Após a coleta das sequências desses fungos filamentosos, foram alinhadas as sequências de oligonucleotídeos no programa *BIOEDIT* (137), e após o alinhamento das sequências foi realizada a construção dos *primers* (FIP, BIP, F3, B3, LF e LB) utilizando o programa *PrimerExplorer* versão 4 (138).

A reação do teste LAMP foi realizada de acordo com os fabricantes do kit (Eiken Chemical Co., Ltd). Consistiu em uma reação de 25 µl, a qual continha 12,5 µl de 2X Reaction Mix, *Primers*: 40 pmol FIP; 40 pmol BIP; 20 pmol LF; 20 pmol LB; 5 pmol F3 e 5 pmol B3, 1,0 µl da DNA polimerase *Bst*, 2 µl do DNA de interesse, com uma concentração de 2ng/µL previamente quantificado no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e completada com água destilada para um volume total de 25 µl. A mistura da reação foi incubada por 63°C por 60 minutos, e a turbidimetria foi medida a cada 6 segundos utilizando o aparelho medidor de turbidez em tempo real (Loopamp EXIA; Eiken).

b. Sensibilidade e especificidade do teste

Análises de sensibilidade e especificidade foram realizadas utilizando-se DNA de *Penicillium griseofulvum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum theobromicola* provenientes do Centro de Pesquisa em Micologia Médica da Universidade de Chiba, bem como de cepas de complexo *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. napiforme* e *F. delphinoides* provenientes do Hospital de Clínicas da Unicamp (HC - UNICAMP).

c. Observação dos produtos da técnica de LAMP.

Os produtos da reação de LAMP foram observados no gráfico do aparelho medidor de turbidez em tempo real (Loopamp EXIA; Eiken).

4.5.1.6. Técnica de PCR em Tempo real.

Essa técnica foi realizada *in house* e consistiu de duas etapas: *a.* reação de PCR em Tempo real; *b.* observação dos produtos da técnica de PCR em Tempo real.

a. Reação de PCR em Tempo real

Cada amostra foi submetida a dois ensaios distintos: (1) identificação de complexo *Fusarium* não-*solani* e (2) Identificação de complexo *Fusarium solani*. Ambos os ensaios foram realizados simultaneamente no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA), utilizando a tecnologia *Cycling Probe* (Takara, Japão).

O ensaio (1) foi realizado em uma reação contendo, 10 µl de *CyclavePCR® Reaction Mix* (Takara Co., LTD), 0,8 µl de sonda Fprobe1 [5'Eclipse-TCTGGTT(G)GA-FAM3'], 0,8 µl de *primers Mix* específico para o gênero *Fusarium* Fusa28sF1(5'-TgAAATCTggCTCTCggCC-3') e Fusa28sR1 (5'-GCTATCGGTCTCTGGCCGG-3'), 0,8 µl de sonda de controle interno *Lambda- probe1* [5' Eclipse –CGCTC(G)TAA-ROX3'], 0,8 µl de *primers Mix* de controle interno *Lambda-primer1F* (5'-AGCAGAGCATGTTGCGCCAG-3') e *Lambda-primer2R* (5'- CAACAAAGCTGCCTGATAG-3'), 2 µl de DNA de controle interno, 2 µl do DNA da amostra e água milli-Q para um volume final de 20 µl.

O ensaio (2) foi realizado em uma reação contendo, 10 µl de *CyclavePCR® Reaction Mix* (Takara Co., LTD), 0,8 µl de sonda FSprobe1 [5'Eclipse-TTGGTG(A)GG-FAM3'], 0,8 µl de *primers Mix* específico para o gênero *Fusarium* Fusa28sF1 (5'-TgAAATCTggCTCTCggCC-3') e Fusa28sR1 (5'-gCTATCggTCTCTggCCgg-3'), 0,8 µl de sonda de controle interno *Lambda- probe1* [5' Eclipse –CGCTC(G)TAA-ROX3'], 0,8 µl de *primers Mix* de controle interno *Lambda-primer1F* (5'-AGCAGAGCATGTTGCGCCAG-3') e *Lambda-primer2R* (5'- CAACAAAGCTGCCTGATAG-3'), 2 µl de DNA de controle interno, 2 µl do DNA da amostra e água milli-Q para um volume final de 20 µl.

Os dois ensaios foram realizados de acordo com os seguintes parâmetros: Temperatura (°C) Tempo minutos (m) e segundos (s).

Temperatura (°C)	Tempo: minutos (m) e segundos (s)
95	10 s
95	5 s (40 ciclos)
55	10 s (40 ciclos)
72	30 s (40 ciclos)
4	∞

b. Observação dos produtos da técnica de PCR em Tempo real.

Os produtos da reação de PCR em tempo real foram observados no gráfico do aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA).

4.5.1.7. Técnica de Sequenciamento.

A técnica de sequenciamento foi realizada baseada em Moreira-Oliveira et al. (139), porém foram feitas algumas alterações. Utilizou-se os reagentes Bigdye® (Applied Biosystems) seguindo o protocolo recomendado para o equipamento *ABI Prism genetic analyser 3100* (Applied Biosystems) descrito a seguir:

a. Amplificação do DNA alvo por PCR.

A reação de PCR consistiu de 1 µl do DNA extraído da colônia do fungo, 12,5 µL de PCR *Master Mix* (Promega), 1,25 µl de cada iniciador, *forward* HS392 (5'-TCAAATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') e *reverse* HS393 (5'-GCCTGGGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3') e água milli-Q para um volume final de 25µL. A PCR foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: Temperatura (°C) Tempo minutos (m) e segundos (s).

Temperatura (°C)	Tempo: minutos (m) e segundos (s)
95	2 m
95	30 s (30 ciclos)
55	30 s (30 ciclos)
72	1 m
72	5 m
4	∞

A seguir, os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% a 100 volts por 35 minutos, e posteriormente esse gel foi corado com brometo de etídio, para a visualização dos fragmentos amplificados.

Então o produto final da PCR foi purificado pela adição de 2µL da enzima *Exosap-IT* (USB) a cada 5µL de produto de PCR e submetidos a 37°C por 30min e 80°C por 15 min para inativação enzimática.

b. Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 1 µl terminadores *Big Dye*; 1 µl de tampão “save” (2,5X); 1 µl de cada iniciador a 1,6 pmol, HS392 e HS393 e EF11 (5´-GTGGGGCATTACCCCGCC-3´) e EF21 (5´-GAGTGGCGGGGTAAATGCC-3´) para a amplificação do gene *EF1α*; 2 µl de DNA (produto de PCR) e completado com água destilada para 10 µl. As reações foram ao termociclador nas condições de amplificação com os seguintes parâmetros: Temperatura (°C) Tempo minutos (m) e segundos (s).

Temperatura (°C)	Tempo: minutos (m) e segundos (s)
96	1 m
96	10 s (25 ciclos)
55	5 s (25 ciclos)
60	4 m (25 ciclos)
4	∞

c. Precipitação da reação de sequenciamento.

Foram adicionados em cada tubo de reação 5 µl de EDTA a 125 µM e 60 µL de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e deixados a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugados por 30 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. A seguir, os sobrenadantes foram aspirados com pipeta e descartados. Foram adicionado aos “pellets” 60 µl de etanol a 70% e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm a 4 °C e os sobrenadantes foram novamente aspirados com pipeta e descartados. Os sedimentos foram secos a temperatura ambiente, protegidos da luz. As reações foram suspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), agitadas e desnaturadas em 95°C por 1 minuto e colocadas em gelo.

d. Análise do resultado de sequenciamento.

Os fragmentos de DNA amplificados de diferentes amostras foram alinhados no programa ATSQ (Japan Software Inc.) e a homologia com outras sequências disponíveis nos bancos de dados foi avaliada com as ferramentas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (140) e *Fusarium* MLST (136).

4.5.1.8. Árvore Filogenética

Para a análise de similaridade genética entre as 21 cepas de *Fusarium* em estudo, a história evolucionária foi realizada utilizando o método *Neighbor – Joining* com uma análise de *bootstrap* de 1000 replicações. As distâncias evolucionárias foram computadorizadas utilizando o método *Maximum Composite Likelihood* no programa MEGA5 e no final da análise dos dados existiu um total de 582 posições (141 – 144).

4.6. Suporte financeiro.

Este projeto recebeu auxílio-pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2011/16205-5 e da Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA).

5. RESULTADOS

5.1. População de estudo

Foram selecionados 22 *Fusarium* spp. isolados de culturas de sangue sendo que dos 21, 18 pertenciam a micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos da FCM–UNICAMP, 3 a micoteca do Laboratório de Microbiologia do HC-FMUSP (Tabela 1) , (Tabela 2).

Tabela 1: *Fusarium* de cultura de sangue do HC UNICAMP de 2006 a 2012.

NºLIF	DATA	PACIENTE	ESPÉCIME CLÍNICO	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA no LIF/FCM
916	21/out	RARS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
917	09/nov	AGSA	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
952	28/nov	MACS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1103	20/jul	CJBO	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1196	29/mar	MDLS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1202	27/mar	JAP	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1207	23/jul	MCJ	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1372	16/nov	NFS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1549	09/dez	EA	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1601	11/dez	ER	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1603	02/mar	JWG	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1554	19/jan	JV	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1631	28/jul	VSJJ	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
1750	03/jun	MDMM	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
2008	29/nov	MMSS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
2009	30/nov	MMSS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
2010	25/nov	MMSS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
2020	26/jun	WLO	sangue	<i>Fusarium</i> spp.

*Nº LIF: Número de identificação da cepa pelo Laboratório de investigação fungica do HC UNICAMP.

Tabela 2: *Fusarium* de cultura de sangue do HC FMUSP.

NºLIM *	DATA **	PACIENTE	ESPÉCIME CLÍNICO	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA no LIM/FM
56	ND	SS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
57	ND	SS	sangue	<i>Fusarium</i> spp.
65	09/mar	JCC	sangue	<i>Fusarium</i> spp.

*Nº LIM: Número de identificação da cepa pelo Laboratório de bacteriologia do HC FMUSP. ** ND: informação não disponível.

5.2. Identificação molecular das espécies de *Fusarium* spp.

5.2.1. Técnica de DNA *microarray*

A técnica de DNA *microarray* identificou dezessete amostras como pertencentes ao complexo *Fusarium solani* e quatro como complexo *Fusarium* não-*solani* (Figura 3).

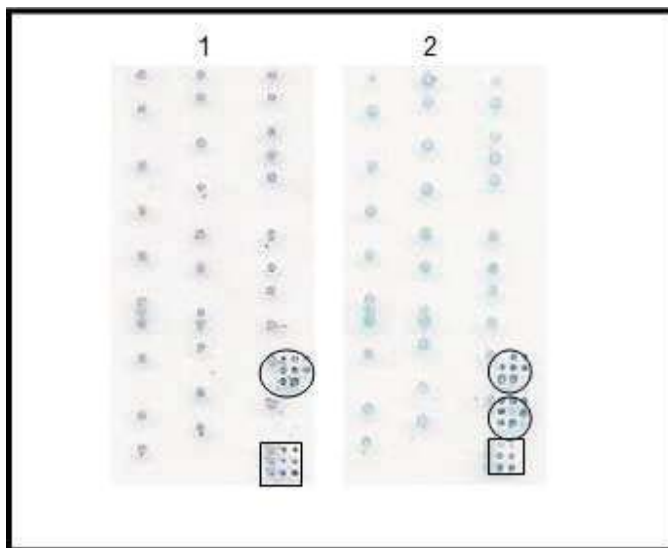


Figura 3. Representativo padrão de hibridização do complexo *Fusarium* não-*solani* (1), complexo *Fusarium solani*(2) e do controle positivo utilizado na técnica DNA *microarray*. Sendo um grupo de pontos de hibridização específica visualizados dentro do círculo e o restante dos pontos representativos da hibridização da biotina (negativo para as outras espécies) e o controle positivo pode ser visualizado dentro do quadrado. O controle positivo representa uma sequência comum para as espécies de fungos.

5.2.2. Técnica de amplificação circular isométrica (Loop – mediated isothermal amplification (LAMP).

Através da técnica de LAMP foram identificadas dezessete amostras como pertencentes ao complexo *Fusarium solani* e quatro como complexo *Fusarium* não-*solani* (Figura 4).

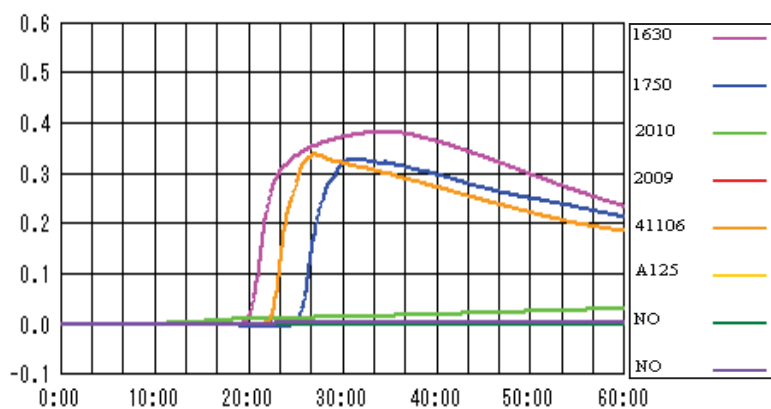


Figura 4: produtos da reação de LAMP observados no gráfico do aparelho medidor de turbidez em tempo real (Loopamp EXIA; Eiken).

5.2.3. Técnica de PCR em Tempo real

A técnica de PCR em Tempo real identificou dezessete amostras como pertencentes ao complexo *Fusarium solani* e quatro como complexo *Fusarium* não-*solani*.

Sendo considerado complexo *Fusarium* não-*solani* quando amplificado somente a sonda de identificação de complexo *Fusarium* não-*solani* (Figura 5) e complexo *Fusarium solani* quando amplificado as duas sondas de identificação complexo *Fusarium* não-*solani* e complexo *Fusarium solani* (Figura 6).

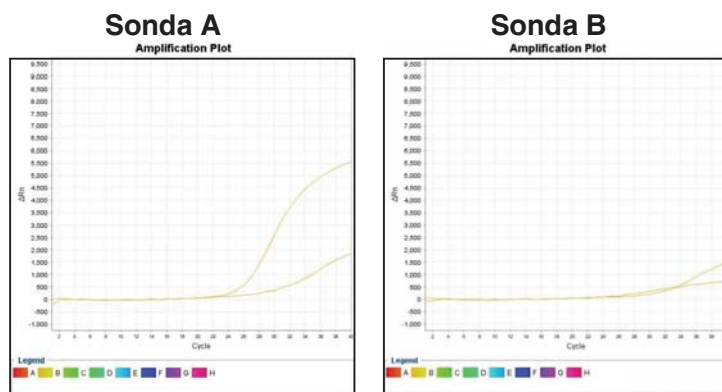


Figura 5. Gráficos de amplificação da sonda (a) complexo *Fusarium* não-*solani* e de não amplificação da sonda (b) complexo *Fusarium solani*, tendo como resultado *Fusarium* complexo não *solani*.

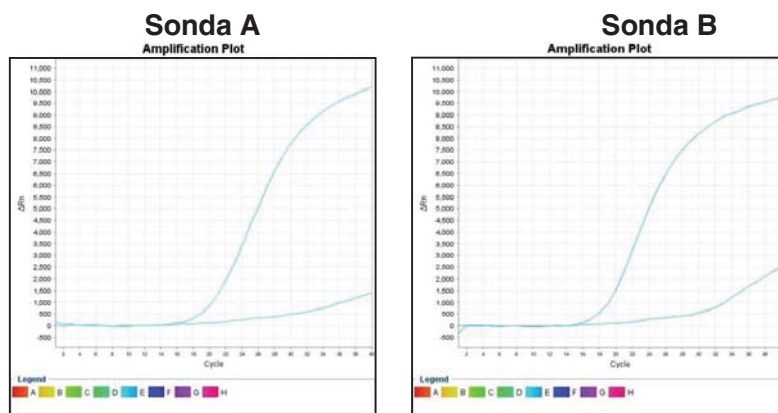


Figura 6. Gráficos de amplificação das sondas (a) complexo *Fusarium* não-*solani* e (b) complexo *Fusarium solani*, tendo como resultado *Fusarium* complexo *solani*.

5.2.4. Técnica de Sequenciamento

Os resultados da técnica de sequenciamento quando comparados nos bancos de dados do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (140) e *Fusarium* MLST (136), identificaram dezessete amostras como complexo *Fusarium solani*, três como *Fusarium napiforme* (complexo *Fusarium* não-*solani*) e uma como *Fusarium oxysporum* (complexo *Fusarium* não-*solani*) (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados da técnica de sequenciamento comparados nos bancos de dados

Nº LIF	Identificação	Banco de dados			
		Genbank (NCBI)		Fusarium (MLST)	
		homologia %	acesso	homologia %	acesso
916	FSSC	100	AB817216.1	100	CBS 490.63
917	FSSC	100	AB817231.1	99	CBS203.32
952	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS203.32
1103	FSSC	100	AB817216.1	100	CBS490.63
1196	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS203.32
1202	FSSC	100	AB817216.1	100	CBS490.63
1207	FSSC	100	AB817216.1	100	CBS490.63
1372	FSSC	100	AB817216.1	99	CBS490.63
1549	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS203.32
1601	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS203.32
1603	FSSC	100	AB817231.1	99	CBS203.32
1554	FSSC	100	AB817222.1	99	CBS239.39
1631	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS203.32
1750	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS203.32
2008	FNSSC (<i>Fusarium napiforme</i>)	98	AF160266.1	98	CBS748.97
2009	FNSSC (<i>Fusarium napiforme</i>)	99	AF160266.1	98	CBS748.97
2010	FNSSC (<i>Fusarium napiforme</i>)	99	AF160266.1	98	CBS748.97
2020	FSSC	100	AB817231.1	100	CBS224.34
56	FSSC	99	HE647957.1	99	CBS174.81
57	FSSC	99	AB817203.1	99	CBS238.39
65	FNSSC (<i>Fusarium oxysporum</i>)	100	KF372592.1	99	CBS743.79

FSSC: complexo *Fusarium solani*, FNSSC: complexo *Fusarium* não-*solani*.

5.2.5. Comparação entre as técnicas de identificação molecular.

As três metodologias demonstraram 100% de especificidade e a técnica de LAMP também demonstrou uma sensibilidade de 100% (Tabela 4). A concordância encontrada entre os resultados das três metodologias comparados com os resultados da técnica de sequenciamento de DNA também foi de 100%, na identificação das espécies de *Fusarium* isolados de cultura de sangue (Tabela 5).

Tabela 4: Resultados da sensibilidade e da especificidade das três técnicas moleculares

METODOLOGIA	SENSIBILIDADE	%	ESPECIFICIDADE	%
DNA <i>microarray</i>	complexo <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium napiforme</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	100	ND	ND
LAMP	complexo <i>Fusarium solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. napiforme</i> <i>F. delphinoides</i>	100	<i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Collectotrichium theobromine</i>	100
PCR em tempo real	complexo <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium napiforme</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	100	ND	ND
Sequenciamento	complexo <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium napiforme</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	100	ND	ND

ND: não disponível.

Tabela 5: Resultados da comparação das três técnicas moleculares

Nº AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO DNA MICROARRAY	IDENTIFICAÇÃO LAMP	IDENTIFICAÇÃO PCR EM TEMPO REAL	IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAMENTO	CONCORDÂNCIA %
916	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
917	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
952	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1103	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1196	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1202	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1207	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1372	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1549	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1601	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1603	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1554	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1631	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
1750	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
2008	FNSSC	FNSSC	FNSSC	<i>Fusarium napiforme</i> (FNSSC)	100%
2009	FNSSC	FNSSC	FNSSC	<i>Fusarium napiforme</i> (FNSSC)	100%
2010	FNSSC	FNSSC	FNSSC	<i>Fusarium napiforme</i> (FNSSC)	100%
2020	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
56	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
57	FSSC	FSSC	FSSC	FSSC	100%
65	FNSSC	FNSSC	FNSSC	<i>Fusarium oxysporum</i> (FNSSC)	100%

FSSC: complexo *Fusarium solani*, FNSSC: complexo *Fusarium* não-*solani*.

5.2.6. Árvore Filogenética

Após a construção da árvore filogenética, obtivemos os seguintes agrupamentos entre as espécies encontradas neste estudo com a partir da técnica de sequenciamento.

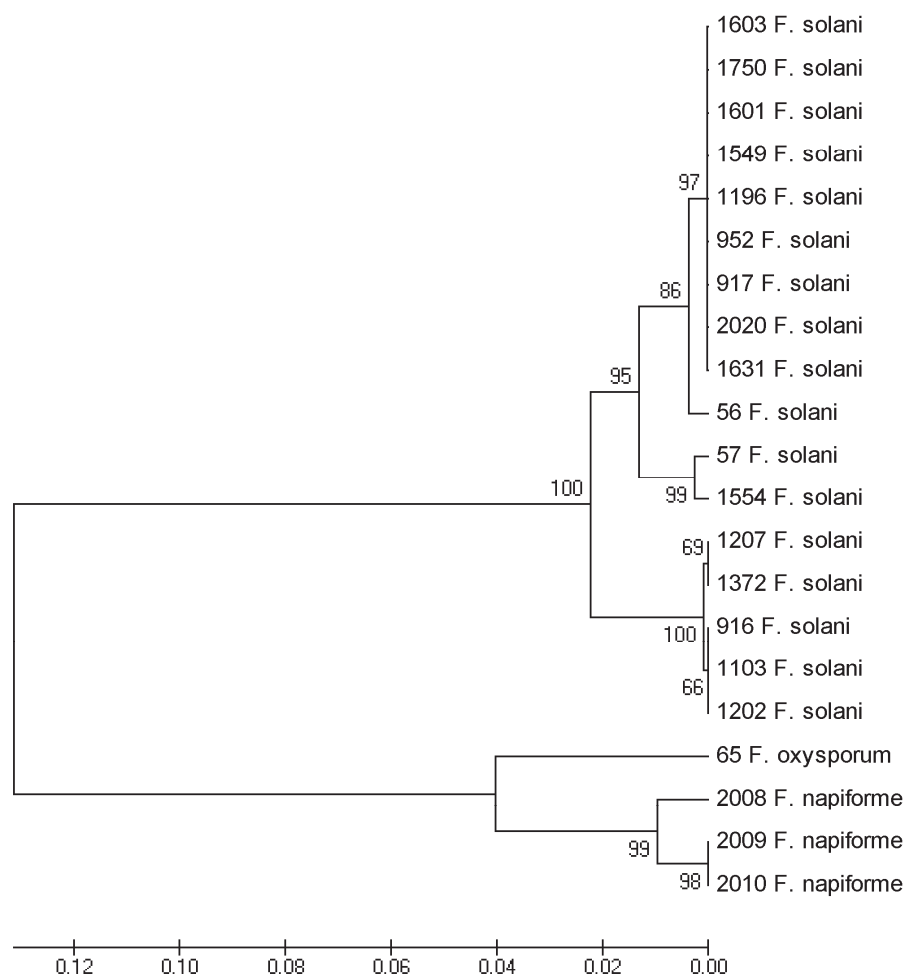


Figura 7: Árvore filogenética mostrando a relação entre as espécies de *Fusarium* de sangue. A árvore foi construída baseada em fragmentos de sequência do gene EF1 α , utilizando o método *neighbor-joining*. Uma análise de *bootstrap* foi feita com 1000 repetições.

6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, encontramos que a maioria de nossas amostras 81% pertenciam a espécie complexo *Fusarium solani* e 19% ao complexo *Fusarium* não – *solani*. Dados esses que concordam com estudo de Galimberti et al. (12), *apud* Nelson et al.(14), Negroni et al. (145), Dignani et al. (9), onde relatam que a espécie do complexo *Fusarium solani* é responsável pela maioria das infecções em humanos (50%), e em menor porcentagem *Fusarium oxysporum* (20%), *Fusarium verticillioides* (20%), *Fusarium moniliforme* e *Fusarium roseum*.

A identificação de *Fusarium* é muitas vezes difícil e requer um laboratório especializado. O diagnóstico de fusariose em laboratório inclui critérios como: um quadro clínico compatível, um exame micológico direto com típicas hifas septadas, ramificação das hifas a 45°C e isolamento de *Fusarium* em duas culturas sucessivas com a ausência de outros fungos (76).

Um diagnóstico precoce de fusariose pode levar a mudanças na terapia antifúngica e ser crucial para a melhora do paciente (2). Métodos baseados em ácidos nucleicos são frequentemente utilizados para identificação de *Fusarium sp* em pesquisas. (33).

A técnica de *microarray* vem sendo utilizada na identificação de microrganismos de importância clínica como vírus, bactérias, fungos e parasitas e tem adquirido uma atenção relevante, devido seu rápido e eficiente potencial de discriminação, identificando sequências de diferentes regiões de seu alvo em um único teste, o que a torna uma técnica de baixo custo. (44, 50).

Nosso estudo visou a identificação das 21 cepas de *Fusarium sp.*, através da técnica de DNA *microarray*, sendo 18 de isolados de sangue de pacientes com doenças onco-hematológicas do ano de 2006 a 2013 pertencentes a micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos da FCM-UNICAMP, 3 da Micoteca do Laboratório de Bacteriologia da FMUSP isoladas entre os anos de 2009 e 2010. A técnica identificou as 21 amostras inclusas de uma forma sensível, em um curto período de 4 horas, sendo 17 delas identificadas como complexo *Fusarium solani* e três como complexo *Fusarium* não – *solani*. Outros estudos também apresentaram relatos de um bom desempenho na utilização da técnica de *microarray* para a identificação das espécies de *Fusarium* de amostras clínicas.

Hsiao et al. (40) realizaram um estudo no qual desenvolveram um *array* para a identificação de 64 espécies com 32 gêneros de fungos filamentosos de importância médica, causadores de infecções superficiais cutâneas, subcutâneas e invasivas,

utilizando a amplificação da região ITS do DNA ribossomal com a utilização dos *primers* ITS1 e ITS2. Neste *array* foi desenhado uma sonda para uma identificação simultaneamente das espécies *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum* e *F. moniliforme*, a qual não permitiu a discriminação entre as três espécies, e uma sonda para a identificação de *F. solani*. Foram testadas 290 cepas alvos neste estudo, sendo 233 cepas de referência obtidas de centros de coleção de culturas (*American Type Culture Collection*, *Bioresources Collection and Research Center* e CBS) e 57 de isolados clínicos e 107 cepas não alvo, sendo 93 cepas de referências e 14 de isolados clínicos, obtendo uma sensibilidade de 98,3% e uma especificidade de 98,1%. E tempo total para a realização desse teste foi de 24 horas a partir da colônia isolada.

Spiess et al. (3) realizaram um estudo no qual fizeram a construção de um *array* para a identificação de 14 espécies de fungos patogênicos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus microsporus*, *Scedosporium prolificans* e *Trichosporon asahii* em 91 amostras de sangue, lavado brônquio alveolar e tecido de 46 pacientes neutropênicos, com a amplificação do gene RNA ribossomal das regiões 18s, 5.8s e ITS1, sendo identificados espécies de *Fusarium* em amostras de lavado brônquio alveolar, onde o *array* para identificação de *Fusarium solani* apresentou um bom resultado com uma hibridação específica; porém o *array* para a identificação de *Fusarium oxysporum* não teve um bom desempenho pois seu limite de detecção ficou abaixo do limite de detecção que era de 500pg, com apenas 10pg.

Em um estudo, Campa et al. (44), realizaram a construção de um *array* para a identificação 24 espécies de fungos frequentemente isolados de infecções invasivas e superficiais (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Candida pulcherrima*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichosporon cutaneum*, *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium solani*, *Microsporum canis*, *Penicillium marneffei* e *Saccharomyces cerevisiae*) para a amplificação da região ITS (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal. Entre esses fungos estava incluso a espécie de *Fusarium solani*, a qual a padronização do *array* foi realizada com uma cepa padrão de *Fusarium solani* (*Fusarium solani* CBS 208.29),

obtendo um resultado satisfatório, identificando a cepa de uma forma sensível e com uma interpretação não ambígua, porém não foram testadas amostras clínicas de *Fusarium* sp.

Hsiue et al. (24) construíram uma *array* para a identificação de 146 espécies de fungos em 116 culturas de sangue, o qual continha uma sonda para uma identificação simultaneamente das espécies *F. oxysporum*, *F. pallidroseum* e *F. moniliforme*, não permitindo a discriminação entre as três espécies, uma sonda para a identificação de *F. solani* e uma sonda para a identificação de *F. moniliforme*. O teste foi realizado em um período entre 16 e 24 horas, a partir do crescimento da cultura de sangue, e as regiões amplificadas foram ITS1 e ITS2 do RNA ribossomal. A especificidade e a sensibilidade encontrada neste estudo foi de 100%, porém não foram identificadas nenhuma das 116 culturas de sangue com a espécie *Fusarium*, sendo as sondas de *Fusarium* testadas somente com amostras padrão.

Com base em nosso estudo e nos estudos já relatados sobre identificação de *Fusarium* de amostras clínicas através da técnica de DNA *microarray*, esta técnica mostrou ter uma grande importância para a identificação de fungos filamentosos, apresentando-se como uma rápida ferramenta e uma alternativa efetiva na identificação convencional de *Fusarium* de infecção sistêmica (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação dos estudos com a metodologia de DNA microarray.

AUTOR, ANO	PLATAFORMA (ESPÉCIES DE FUNGOS)	MATERIAL	DNA ALVO	ESPÉCIES	TEMPO EXECUÇÃO	SENSIBILIDADE %	ESPECIFICIDADE %
Presente estudo	23	sangue	DNA ribossomal (ITS1 e ITS2)	complexo <i>F. solani</i> complexo <i>F. não-solani</i>	4 horas	100	—
Hsiao et al., (2005)	64	infecções cutâneas infecções subcutâneas infecções invasivas	DNA ribossomal (ITS1 e ITS2)	<i>F. oxysporum</i> <i>F. pallidoroseum</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. solani</i>	24 horas	98,30%	98,10%
Spiess et al., (2007)	14	BAL	RNA ribossomal (18s, 5.8s, ITS1)	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	—	<i>F. solani</i> : bom resultado, hibridização específica e sensível <i>F. oxysporum</i> : detecção abaixo do limite 10pg (500pg)	—
Campa et al., (2008)	24	<i>Fusarium solani</i> CBS 208.29	DNA ribossomal (ITS1 e ITS2)	<i>F. solani</i>	—	satisfatório, específico e não ambíguo.	—
Hsiue et al., (2010)	146	culturas de sangue	DNA ribossomal (ITS1 e ITS2)	—	16 a 24	100	100

- : Não disponível

A técnica de amplificação circular isotérmica (LAMP) vem sendo recentemente descrita como uma nova técnica de amplificação de ácido nucleico, como um teste fácil e rápido para um diagnóstico mais rápido de fungos de amostras clínicas (145).

Em nosso estudo na detecção das 21 cepas de *Fusarium* sp. isolados de sangue de paciente com doenças onco-hematológicas do ano de 2006 a 2013 a técnica de LAMP apresentou resultados altamente específicos e sensíveis, amplificando seis regiões distintas do gene alvo em menos de 30 minutos, identificando 17 cepas como *complexo Fusarium solani* e 4 como *complexo Fusarium não-solani*. Outros estudos também obtiveram sucesso no uso da técnica de LAMP para a identificação de DNA de espécies de *Fusarium*.

No estudo de Nissen e Vogal (147), eles utilizaram a técnica de LAMP para a identificação *Fusarium graminearum* em sementes de trigo e cevada, com a utilização de seis pares de *primers* para a amplificação do gene *goaA*, o qual obteve um resultado específico e sensível com um limite de detecção de 2ng/μL em menos de 30 minutos.

Abd-Elsalam et al. (76) realizaram um estudo utilizando a técnica de LAMP para a identificação da espécie *Fusarium graminearum* em amostras de grão branco, com a

utilização de três pares de *primers* para a amplificação de seis regiões distintas do gene *goaA*. Essa identificação foi realizada em um teste de 60 minutos com 100 ng/mg de DNA, apresentando um resultado específico e sensível.

Nissen et al. (148) obtiveram um bom resultado, utilizando a técnica de LAMP para a identificação da espécie *Fusarium tricinctum* em um único grão de cevada, com a utilização de três pares de *primers* para a amplificação de seis regiões distintas do gene *acl1*. Em um teste de 60 minutos, identificou *Fusarium tricinctum* com um limite de detecção de 0,95pg de forma específica e sensível.

Denschlag et al. (149) encontraram um bom resultado na aplicação da técnica de LAMP para a identificação de *Fusarium graminearum* em amostras de malte, através da amplificação de seis regiões distintas do gene *hyd5* utilizando três pares de *primers*, sendo este teste realizado em um período de 30 minutos, com um limite de detecção de 0,74 pg, apresentando ser uma técnica rápida, sensível.

Porém não existem relatos na literatura sobre a aplicação da técnica de LAMP para identificação de espécies de *Fusarium* em amostras clínicas, o que torna ressaltar a importância do nosso estudo, mostrando que a técnica de LAMP pode ser utilizada como uma ferramenta rápida, específica e sensível, para a identificação de *Fusarium* de amostras clínicas (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação dos estudos com a metodologia de LAMP.

AUTOR, ANO	ESTUDO	RESULTADO
Presente estudo	<i>Fusarium</i> spp. (amostras de sangue); gene RPB2 (ITS1 e ITS2)	2ng/μL (< 30 minutos) específico, sensível
Nissen e Vogal, (2010)	<i>Fusarium graminearum</i> (sementes de trigo e cevada); gene <i>goa A</i>	<2ng (30 minutos) específico, sensível
Abd-Elsalam et al., (2011)	<i>Fusarium graminearum</i> (grão branco); gene <i>goa A</i>	— (60 minutos) específico, sensível
Niessen et al., (2012)	<i>Fusarium tricinctum</i> (um único grão de cevada); gene <i>acl1</i> e gene <i>tef-1α</i>	0,95pg (60 minutos) específico, sensível
Denschlag et al., (2012)	<i>Fusarium graminearum</i> (malte); gene <i>hyd5</i>	0,74pg (30minutos) sensível

- : Não disponível

A técnica de PCR em tempo real vem sendo oferecida como uma nova ferramenta que além de detectar o DNA de fungos, também pode realizar sua quantificação, apresentando um maior grau de precisão comparado com a reação de PCR padrão (51, 150).

Em nosso estudo utilizando a técnica de PCR em tempo real, realizamos um ensaio para a identificação da espécie complexo *Fusarium solani* e para a espécie complexo *Fusarium* não – *solani*, através da amplificação do gene 28 s do RNA ribossomal. Com esse ensaio identificamos 17 das 21 amostras como complexo *Fusarium solani* e quatro como complexo *Fusarium* não – *solani*, de uma forma sensível e rápida , em uma reação de aproximadamente 120 minutos de duração. Outros estudos também obtiveram um bom resultado na aplicação da técnica de PCR em tempo real.

Reischer et al. (114), realizaram um ensaio de PCR em tempo real para a identificação de *Fusarium graminearum* em planta, através da amplificação do gene *beta – tubilin*, obtendo um resultado específico e sensível com um limite de detecção menor que cinco cópias do gene alvo por reação.

Bernal – Martinez et al. (151), fizeram um ensaio de PCR em tempo real, com o objetivo de identificar espécies de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em amostras de pulmão e soro de modelo murino, pela amplificação da região ITS1 do gene DNA ribossomal. A sensibilidade encontrada neste ensaio foi de 100% para ambas as espécies e amostras, porém a especificidade encontrada foi variada, sendo que, na espécie *F. solani* nas amostras de pulmão foi de 94% e para as amostras de soro foi de 87%, já para a espécie *F. oxysporum* a especificidade encontrada foi de 87% nas amostras de pulmão e 43% nas amostras de soro. E o limite de detecção obtido neste ensaio foi de 10fg/ ul.

Scauflaire et al. (113), realizaram um ensaio de PCR em tempo real para a identificação de quatro espécies de *Fusarium* em amostras de milho, sendo essas, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum* e *F. verticillioides*. Os genes de escolha para este ensaio foram o *EF1α* e o *Cal* e o limite de detecção encontrado foi menor que 5pg de DNA para a PCR simples e menor que 50pg de DNA para a PCR multiplex, obtendo um resultado específico e sensível.

Haegi et al. (152) realizaram um ensaio de PCR em tempo real para a identificação de *Fusarium oxysporum* em plantas de mamão, através da amplificação do gene *TEF1α*. Este ensaio apresentou resultados altamente específicos sem nenhuma reação cruzada com outras espécies de *Fusarium* ou outros patógenos contaminantes de plantas de mamão e sensíveis identificando o *Fusarium oxysporum* no caule da planta de

mamão assintomática no início do estágio da infecção, com um limite de detecção de 1pg de DNA.

A técnica de PCR em tempo real mostrou em nosso estudo e nos outros estudos relatados ser uma metodologia rápida, sensível e específica, com um bom desempenho para a identificação de *Fusarium*, corroborando com os resultados de sensibilidade da técnica de DNA *microarray* e com os resultados de sensibilidade e especificidade da técnica de LAMP. De acordo com nosso conhecimento, ainda não foram publicados artigos com a técnica de PCR em Tempo real para a identificação de *Fusarium* de amostras clínicas de sangue de humanos, o que torna nosso estudo de grande relevância (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação dos estudos com a metodologia de PCR em tempo real.

AUTOR, ANO	ENSAIO (ESPÉCIES FUNGOS)	MATERIAL	ALVO	ESPÉCIES	TEMPO EXECUÇÃO	LIMITE DETECÇÃO	SENSIBILIDADE %	ESPECIFICIDADE %
Presente estudo	FSSC FNSSC	sangue	RNA ribossomal (28s)	FSSC FNSSC	2 horas	2ng/μL	100	—
Reischer et al., (2004)	<i>F. graminearum</i>	planta	beta - tubulin	<i>F. graminearum</i>	—	< 5 cópias do gene por reação	sensível e específico	—
Bernal - Martinez et al., (2012)	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	modelo murino (pulmão, soro)	DNA ribossomal (ITS1)	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	—	10 fg/ μl	<i>F. solani</i> : 94% pulmão, 87% soro <i>F. oxysporum</i> : 87% pulmão, 43% soro	100%
Scaufaire et al., (2012)	<i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. verticillioides</i>	milho	<i>EF1α</i> e <i>Cal</i>	<i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. verticillioides</i>	—	< 5 pg de DNA : PCR simples < 50 pg de DNA : multiplex PCR	sensível e específico	—
Haegi et al., (2013)	<i>F. oxysporum</i>	planta de mamão	<i>TEF1α</i>	<i>F. oxysporum</i>	—	1pg de DNA	sensível e específico	—

FSSC: complexo *Fusarium solani*, FNSSC: complexo *Fusarium* não-*solani*

Para as técnicas de PCR em tempo real e DNA *microarray* em nosso estudo, não foi realizado o controle de especificidade, somente da técnica de LAMP. Pois os resultados de especificidade das duas técnicas já haviam sido bem estabelecidos pelos pesquisadores da Universidade de Chiba.

A última metodologia aplicada neste estudo foi a técnica de sequenciamento de DNA, a qual vem sendo estabelecida como o padrão ouro para a identificação de fungos, com uma separação objetiva entre o gênero e a espécie (120). Empregamos esta técnica

com o objetivo de validar os resultados encontrados na comparação entre as três metodologias aplicadas em nosso estudo, DNA *microarray*, LAMP e PCR em tempo real.

Em nosso estudo realizamos a técnica de sequenciamento de DNA utilizando *primers* para a amplificação do gene EF1 α , a qual identificou 17 das 21 amostras com complexo *Fusarium solani* e quatro como complexo *Fusarium* complexo não – *solani*, sendo dessas quatro, três foram identificadas como *Fusarium napiforme* e uma como *Fusarium oxysporum*. As sequências encontradas em nossas amostras foram comparadas com os bancos de sequências genéticas *GenBank* e *MLST Fusarium*. No *GenBank* a porcentagem de homologia encontrada foi de 99 a 100% para 20 amostras e de 98% somente em uma amostra e no *MLST Fusarium* a porcentagem de homologia encontrada foi de 99 a 100% para 18 amostras e de 98% para três amostras. O teste foi realizado em um período de 12 horas e obteve um resultado sensível e específico, confirmando assim os resultados encontrados nas três metodologias aplicadas em nosso estudo.

Outros estudos também utilizaram a técnica de sequenciamento de DNA para a identificação de espécies de *Fusarium*, como o estudo de Hennequin et al. (127) o qual, sequenciaram 33 isolados de *Fusarium* com a amplificação da região 28s do RNA ribossomal. Suas sequências encontradas foram comparadas com o banco de sequências genéticas *GenBank*, sendo identificadas as espécies *F. dimerum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. chlamydosporum*, *F. semitectum*, com uma porcentagem de homologia que variou de 98,16 a 100% e o período total da realização da técnica foi de 48 horas.

Hall et al. (122), utilizaram a técnica de sequenciamento de DNA para a identificação de fungos filamentosos e, entre eles, 9 foram identificados como *Fusarium solani* com uma média de variação de homologia de 0 – 0,62%, e um como *Fusarium oxysporum* com uma média de variação de homologia de 1,25%. Os *primers* utilizados foram para a amplificação da região D2 do DNA ribossomal e as sequências encontradas foram comparadas com o banco de sequências genéticas *MicroSeq D2 fungal library*, obtendo um resultado sensível e específico.

Alastruey-Izquierdo et al. (153), identificaram 67 amostras de *Fusarium* spp. através da técnica de sequenciamento de DNA, com a amplificação do gene Efa. Seus resultados foram comparados com o banco de sequências genéticas *GenBank*, onde identificaram as espécies *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti* e *F. reticulatum*, todos com uma porcentagem de homologia de 100%.

Seyfarth et al. (154), utilizaram a técnica de sequenciamento de DNA para a identificação de uma amostra de *Fusarium* isolado de sangue, com a amplificação das regiões ITS1 e 5.8s do DNA ribossomal. Suas sequências encontradas foram comparadas com o banco de sequências genética *GenBank*, onde foi identificada a espécie *Fusarium proliferatum*, com uma porcentagem de homologia de 98%.

Através dos resultados encontrados em nosso estudo e nos outros estudos relatados, podemos observar que a técnica de sequenciamento identificou o gênero e a espécie do *Fusarium* com uma grande porcentagem de homologia comparada com os bancos de dados sendo um teste altamente sensível e específico, validando assim nossos resultados encontrados nas três metodologias (Tabela 9).

Tabela 9: Comparação dos estudos com a metodologia de Sequenciamento de DNA.

AUTOR, ANO	Nº <i>FUSARIUM</i>	MATERIAL	ALVO	ESPÉCIES	TEMPO EXECUÇÃO	BANCO DE SEQUÊNCIA GENÉTICA	% HOMOLOGIA
Presente estudo	21	sangue	<i>EF1α</i>	17 FSSC 4 FNSSC (3 <i>Fusarium</i> <i>napiforme</i> e 1 <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>)	12 horas	<i>GenBank</i>	20 (99 a 100) 1 (98)
						<i>Fusarium MLST</i>	18 (99 a 100) 3 (98)
Hennequin et al., (1999)	33	18 cepas de referências 15 isolados clínicos (infecções superficiais e sistêmicas)	RNA ribossomal (28s)	<i>F. dimerium</i> <i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. chlamydosporum</i> <i>F. semitectum</i>	48 horas	<i>GenBank</i>	(98.16 a 100)
Hall et al., (2004)	10	isolados clínicos	DNA ribossomal (D2)	9 <i>F. solani</i> 1 <i>F. oxysporum</i>	—	<i>MicroSeq D2</i> <i>fungai library</i>	<i>F. solani</i> : média variação 0 - 0.62 <i>F. oxysporum</i> : média variação 1.25
Alastruey - Isquierdo et al., (2008)	67	24 pele ou unha 16 ocular 13 sítio respiratório 7 sangue 1 urina 1 fluido pericárdico 5 origem	<i>EF1α</i>	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. equiseti</i> <i>F. reticulatum</i>	—	<i>GenBank</i>	100
Seyfarth et al., (2008)	1	sangue	RNA ribossomal (ITS1 e 5.8s)	<i>F. proliferatum</i>	—	<i>GenBank</i>	98%

FSSC: complexo *Fusarium solani*, FNSSC: complexo *Fusarium* não-*solani*, - : não disponível.

Em nossa árvore filogenética construída a partir da metodologia de sequenciamento de DNA, observamos um alto índice de confiabilidade nos resultados

com a formação de duas clades, uma do complexo *Fusarium solani* e outra do complexo *Fusarium* não – solani, sendo que no complexo *Fusarium solani* também observamos uma variabilidade genética interna.

Contudo, nosso estudo foi de grande relevância para o conhecimento de novas técnicas de biologia molecular que podem contribuir para um diagnóstico rápido e mais preciso da espécie de *Fusarium* spp, aumentando consideravelmente as chances de melhora do paciente.

Em nosso estudo encontramos algumas limitações como: primeiramente propusemos a identificação de espécies de *Fusarium* de amostras clínicas da enfermaria de Hematologia do HC-UNICAMP, em paciente com leucemias agudas, e na enfermaria de Transplante de Medula Óssea do HC- UNICAMP, em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea alogênico aparentados e não aparentados através da técnica de LAMP. Porém durante o período de coleta, julho de 2012 a julho de 2013, só obtivemos uma amostra positiva de um paciente da enfermaria de Hematologia portador de leucemia mieloide aguda, fato este que nos levou a optar pela inclusão da parte retrospectiva em nosso estudo, incluindo amostras de *Fusarium* da micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos FCM- UNICAMP e da micoteca do Laboratório de Microbiologia da HC-FCMUSP e também pela inclusão de outras técnicas moleculares como o DNA *microarray* e a técnica de PCR em Tempo real.

O número de amostras inclusas no nosso estudo não foi muito expressivo. O controle de especificidade só foi realizado para a metodologia de LAMP, não obtendo resultado de especificidade das técnicas de DNA *microarray* e PCR em tempo real. Também não foi realizada a análise de custo – efetividade de cada uma das nossas metodologias estudadas.

Tendo como base nosso estudo esperamos realizar as seguintes perspectivas em futuros estudos:

- a extração do DNA direto da amostra clínica, sem ter que esperar o crescimento da cultura de fungo o qual varia de uma semana a mais.
- a utilização das nossas metodologias no local de atendimento.

- a construção de uma plataforma de *microarray* para a detecção do gene de resistência do fungo, auxiliando em uma terapia precoce e mais apropriada para o paciente.
- a construção de uma plataforma de *microarray* que possa identificar não somente os fungos mas também vírus e bactérias.
- a realização da análise de custo – efetividade de cada uma de nossas metodologias estudadas.

7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo as três metodologias aplicadas DNA *microarray*, LAMP e PCR em tempo real apresentaram alto desempenho, com uma concordância de 100% entre elas e quando comparadas a técnica de sequenciamento de DNA, a qual vem sendo utilizada como o padrão ouro para a identificação de fungos, a porcentagem de concordância encontrada também foi de 100%, validando assim nossos resultados. Porém a técnica de LAMP demonstrou ser mais acessível do que as técnicas de *DNA microarray* e PCR em tempo real por ser mais rápida.

Na avaliação tanto dos primers da técnica de LAMP quanto do array da metodologia de DNA *microarray*, ambos demonstraram um alto desempenho na identificação *Fusarium* spp. a partir da cultura de amostras clínicas de sangue de pacientes com doenças onco-hematológicas.

A metodologia de LAMP também apresentou uma sensibilidade e uma especificidade de 100% e as metodologias de DNA *microarray* e PCR em tempo real apresentaram uma especificidade de 100%.

Esses resultados indicam que a técnica de LAMP é uma metodologia promissora para ser utilizada na rotina de diagnóstico de fungos filamentosos, auxiliando em uma terapia apropriada de uma forma rápida e específica, proporcionando assim uma melhora ao paciente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Höfling-Lima AL, Forseto A, Duprat JP, Andrade A, Souza LB, Godoy P et al. Estudo laboratorial das micoses oculares e fatores associados às ceratites. Arq Bras Oftalmol . 2005; 68 (1): 21-7.
- 2- Nucci, M.; Anaissi, E. Cutaneous Infection by *Fusarium* Species in Healthy and Immunocompromised Hosts: Implications for Diagnosis and Management. Clin Infect Dis. 2002; 35: 909-20.
- 3- Spiess B, Seifarth W, Hummel M, Frank O, Fabarius A, Zheng C et al. DNA Microarray-Based Detection and Identification of Fungal Pathogens in Clinical Samples from Neutropenic Patients. J Clin Microbiol . 2007; 45 (11): 3743–53.
- 4- Kontoyiannis DP. Invasive mycoses: strategies for effective management. Am J Med. 2012; 125 (1): S25-38.
- 5- Martins-Diniz JN, Silva RAM, Miranda ET, Mendes-Giannini MJS. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. Rev Saude Publica. 2005; 39 (3): 398-405.
- 6- Esnakula AK, Summers I, Naab TJ. Fatal disseminated *Fusarium* infection in a human immunodeficiency virus positive patient. Case Rep Infect Dis. 2013; 2013: 379320.
- 7- Aquino VR, Verçosa EB, Falhauber G, Lunardi LW, Silla L, Pasqualotto AC. Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the Haematological Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Braz J Infect Dis. 2010; 14 (3): 277-80.
- 8- Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32(12):1491-500.
- 9- Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. Clin Microbiol Infect. 2004; 10 (1): 67-75.
- 10- Jossi M, Ambrosioni J, Macedo-Vinas M, Garbino J. Invasive fusariosis with prolonged fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. Int J Infect Dis. 2010; 14 (4): e354-6.

- 11- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010; 51 (5): 561-70.
- 12- Galimberti R, Torre AC, Baztán MC, Rodriguez-Chiappetta F. Emerging systemic fungal infections. *Clin Dermatol*. 2012; 30 (6): 633-50.
- 13- Migheli Q, Balmas V, Harak H, Sanna S, Scherm B, Aoki T et al. Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic fusarial isolates from hospitals in northern and central Italy. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (4): 1076-84.
- 14- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*. 1994; 7 (4): 479-504.
- 15- Ho DY, Lee JD, Rosso F, Montoya JG. Treating disseminated fusariosis: amphotericin B, voriconazole or both? *Mycoses*. 2007; 50 (3): 227-31.
- 16- Varon AG, Nouer SA, Barreiros G, Trope BM, Magalhães F, Akiti T et al. Superficial skin lesions positive for *Fusarium* are associated with subsequent development of invasive fusariosis. *J Infect*. 2013; 68(1):85-9.
- 17- Cho CT, Vats TS, Lowman JT, Brandsberg JW, Tosh FE. *Fusarium solani* infection during treatment for acute leukemia. *J. Pediatr*. 1973; 83: 1028–1031.
- 18- Nucci M, Anaissie EJ, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C et al. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer*. 2003; 98 (2): 315-9.
- 19- Nucci M, Garnica M, Gloria AB, Lehugeur DS, Dias VC, Palma LC et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19 (8): 745-51.
- 20- Campo M, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009. *J Infect*. 2010; 60 (5): 331-7.

- 21- Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006; 91 (8): 1068-75.
- 22- Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008; 52: 2683–2685.
- 23- Slavin MA; Australian Mycology Interest Group. The epidemiology of candidaemia and mould infections in Australia. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49 (1): 3-6.
- 24- Hsiue HC, Ruan SY, Kuo YL, Huang YT, Hsueh PR. Invasive infections caused by non-*Aspergillus* moulds identified by sequencing analysis at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000-2008. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16 (8): 1204-6.
- 25- Hay RJ. *Fusarium* infections of the skin. *Curr. Opin. Infect Dis*. 2007; 20: 115-117.
- 26- Gupta AK, Baran R, Summerbell RC.. *Fusarium* infections of the skin. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2000; 13: 121-128.
- 27- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. . Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol*. 1994; 7: 479-504.
- 28- Tezcan G, Ozhak-Baysan B, Alastruey-Izquierdo A, Ogunc D, Ongut G, Yildiran ST et al. Disseminated fusariosis caused by *Fusarium verticillioides* in an acute lymphoblastic leukemia patient after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol*. 2009; 47: 278-281.
- 29- Jossi M, Ambrosioni J, Macedo-Vinas M, Garbino J. Invasive fusariosis with prolonged fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. *Int J Infect Dis*. 2010; 14 (4): e354-6.

- 30- Liao MH, Lin JF, Li SY. Application of a multiplex suspension *array* for rapid and simultaneous identification of clinically important mold pathogens. *Mol Cell Probes*. 2012; 26 (5): 188-93.
- 31- Koneman, EW, Allen SD, Dowell Jr VR, Sommers HM. Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido. 2ed. São Paulo: Panamericano. 1993; 537-599.
- 32- Raad I, Hachem R. Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. *Clin Infect Dis*. 1995; 20 (3): 709-11.
- 33- Jureen R, Koh TH, Wang G, Thomas E, Chai LYA, Tan AL et al. Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore. *BMC Infectious Diseases*. 2008; 92 (8): 1- 6.
- 34- Jurado M, Marín P, Callejas C, Moretti A, Vázquez C, González-Jaén MT. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol*. 2010; 27 (1): 50-7.
- 35- Kimura N. One-step immobilization of poly(dT)-modified DNA onto non-modified plastic substrates by UV irradiation for microarrays. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 347 (2): 477-84.
- 36- Call DR, Borucki MK, Loge FJ. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J Microbiol Methods*. 2003; 53 (2): 235-43.
- 37- Nicolaisen M, Justesen AF, Thrane U, Skouboe P, Holmstrøm K. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *J Microbiol Methods*. 2005; 62 (1): 57-69.
- 38- Bierbaum S, Königsfeld N, Besazza N, Blessing K, Rücker G, Kontny U et al. Performance of a novel microarray multiplex PCR for the detection of 23 respiratory pathogens (SYMP-ARI study). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(10): 2851-61.

- 39- Lee DY, Lauder H, Cruwys H, Falletta P, Beaudette LA. Development and application of an oligonucleotide *microarray* and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. *Sci Total Environ*. 2008; 398 (1-3): 203-11.
- 40- Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, Barton R, Li HC, Chang TC. Identification of medically important molds by an oligonucleotide *array*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (8): 3760-8.
- 41- Liao MH, Lin JF, Li SY. Application of a multiplex suspension *array* for rapid and simultaneous identification of clinically important mold pathogens. *Mol Cell Probes*. 2012; 26 (5): 188-93.
- 42- Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, Stilwell JL, Carrano AV, Andersen GL. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using *microarray* technology. *Mol Cell Probes*. 2002; 16 (2): 119-27.
- 43- Buelow DR, Gu Z, Walsh TJ, Hayden RT. Evaluation of multiplexed PCR and liquid-phase *array* for identification of respiratory fungal pathogens. *Med Mycol*. 2012; 50 (7): 775-80.
- 44- Campa D, Tavanti A, Gemignani F, Mogavero CS, Bellini I, Bottari F et al. DNA *microarray* based on *arrayed*-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (3): 909-15.
- 45- Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA *microarray* for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (10): 4943-53.
- 46- Huang A, Li JW, Shen ZQ, Wang XW, Jin M. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide *microarray*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (9): 3299-305.

- 47- Yoo SM, Choi JY, Yun JK, Choi JK, Shin SY, Lee K et al. DNA *microarray*-based identification of bacterial and fungal pathogens in bloodstream infections. *Mol Cell Probes*. 2010; 24 (1): 44-52.
- 48- Ferrari MD, Resende MR, Sakai K, Muraosa Y, Lyra L, Gonoi T et al. Accurate visual DNA-*microarray* for the molecular identification of non-albicans *Candida* species isolated from candidemia episodes. *J. Clin. Microbiol*. 2013; 51: 3826-3829
- 49- O'Donnell K, Sarver BA, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ et al. Phylogenetic diversity and microsphere *array*-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (7): 2235-48.
- 50- Kristensen R, Gauthier G, Berdal KG, Hamels S, Remacle J, Holst-Jensen A. DNA *microarray* to detect and identify trichothecene- and moniliformin-producing *Fusarium* species. *J Appl Microbiol*. 2007; 102 (4): 1060-70.
- 51- Yu AC, Vatcher G, Yue X, Dong Y, Li MH, Tam PH et al. Nucleic acid-based diagnostics for infectious diseases in public health affairs. *Front Med*. 2012; 6 (2): 173-86.
- 52- Sun J, Najafzadeh MJ, Vicente V, Xi L, de Hoog GS. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *J Microbiol Methods*. 2010; 80 (1): 19-24.
- 53- Kato H, Yokoyama T, Kato H, Arakawa Y. Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan.
- 54- Kato H, Yoshida A, Ansai T, Watari H, Notomi T, Takehara T. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22 (2): 131-5.

- 55- Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Kasai A, Mizuguchi Y, Araake M et al. Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (3): 979-89.
- 56- Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, Tsuda H, Sato S, Maeno M. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (4): 1581-6.
- 57- Yamazaki W, Kumeda Y, Uemura R, Misawa N. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated seafood samples. *Food Microbiol.* 2011; 28 (6): 1238-41.
- 58- Nakamura A, Sakano T, Nakayama T, Shimoda H, Okada Y, Hanayama R et al. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: direct detection of the *Bordetella pertussis* genome using loop-mediated isothermal amplification. *Eur J Pediatr.* 2009; 168 (3): 347-9.
- 59- Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay. *Microbiol Immunol.* 2012; 56 (7): 486-9.
- 60- Kawai Y, Miyashita N, Kishi F, Tabuchi M, Oda K, Yamaguchi T et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28 (7): 801-5.
- 61- Boyanton Jr BL, Sural P, Loomis CR, Pesta C, Gonzalez-Krellwitz L, Robinson-Dunn B et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *Clostridium difficile* detection. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (3): 640-5.
- 62- Gotoh K, Nishimura N, Ohshima Y, Arakawa Y, Hosono H, Yamamoto Y et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and serology in pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother.* 2012; 18 (5): 662-7.

- 63- Chen S, Li X, Li J, Atwill ER. Rapid detection of *Brucella* spp. Using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Methods Mol Biol.* 2013; 1039: 99-108.
- 64- Kaewphinit T, Arunrut N, Kiatpathomchai W, Santiwatanakul S, Jaratsing P, Chansiri K. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 926230.
- 65- Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using loop-mediated isothermal amplification. *Methods Mol Biol.* 2013; 943: 267-77.
- 66 - Ge Y, Wu B, Qi X, Zhao K, Guo X, Zhu Y et al. Rapid and sensitive detection of novel avian-origin influenza A (H7N9) virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow device. *PLoS One.* 2013; 8 (8): e69941.
- 67- Saetiew C, Limpaboon T, Jearanaikoon P, Daduang S, Pientong C, Kerdsin A, Daduang J. Rapid detection of the most common high-risk human papillomaviruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2011; 178 (1-2): 22-30.
- 68- Kargar M, Askari A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Hepatitis C virus. *Indian J Virol.* 2012; 23 (1): 18-23.
- 69- Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *J Med Microbiol.* 2008; 57 (1): 50-7.
- 70- Tatibana BT, Sano A, Uno J, Kamei K, Igarashi T, Mikami Y et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23 (2): 139-43.

- 71- Ge Z, Qing Y, Zicheng S, Shiyong S. Rapid and sensitive diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (11): 1042-8.
- 72- Singh P, Mirdha BR, Ahuja V, Singh S. Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Entamoeba histolytica* in amoebic liver abscess. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013; 29 (1): 27-32.
- 73- Mahmoudi MR, Kazemi B, Mohammadiha A, Mirzaei A, Karanis P. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts by IFA, PCR and LAMP in surface water from Rasht, Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107 (8): 511-7.
- 74- Niessen L, Vogel RF. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int J Food Microbiol.* 2010; 140 (2-3): 183-91.
- 75- Niessen L, Gräfenhan T, Vogel RF. ATP citrate lyase 1 (*acl1*) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. *Int J Food Microbiol.* 2012; 158 (3): 171-85.
- 76- Abd-Elsalam K, Bahkali A, Moslem M, Amin OE, Niessen L. An Optimized Protocol for DNA Extraction from Wheat Seeds and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) to Detect *Fusarium graminearum* Contamination of Wheat Grain. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(6): 3459-72.
- 77- Niessen L. Loop-mediated isothermal amplification-based detection of *Fusarium graminearum*. *Methods Mol Biol.* 2013; 968: 177-93.
- 78- Dai, TT, Lu, CC, Lu J, Dong S, Ye W, Wang Y et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *Federation of European Microbiological Societies.* 2012; 334: 27–34.

- 79- Qi JY, Zhu R, Zhu X, Bai H, Hu M, Luo Y et al. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the multidrug-resistance gene *cfr*. *Gene*. 2012; 504 (1): 140-3.
- 80- Ravan H, Yazdanparast R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 733 (6): 64-70.
- 81- Eiken Genome Site. Disponível em: <<http://loopamp.eiken.co.jp/e/LAMP/index.html>> Acesso em: 19 de dezembro de 2012.
- 82- Venkatesan G, Bhanuprakash V, Balamurugan V, Singh RK, Pandey AB. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of camelpox virus in clinical samples. *Journal of Virological Methods*. 2012; 183 (1): 34-9.
- 83- Suzuki S, Taketani H, Kusumoto KI, Kashiwagi Y. High-Throughput Genotyping of Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* Based on Colony Direct Polymerase Chain Reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006; 102 (6): 572-74.
- 84- Atoui A, El Khoury A, Kallassy M, Lebrihi A. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *Int J Food Microbiol*. 2012; 154 (1-2): 59-65.
- 85- Huang Q, Yue H, Zhang B, Nie P, Tang C. Development of a real-time quantitative PCR for detecting duck hepatitis A virus genotype C. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (10): 3318-23.
- 86- Yang JM, Liu HX, Hao YX, He C, Zhao DM. Development of a rapid real-time PCR assay for detection and quantification of four familiar species of *Chlamydiaceae*. *J Clin Virol*. 2006; 36 (1): 79-81.

- 87- Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K et al. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (11): 4044-50.
- 88- Chan PC, Wang CY, Wu PS, Chang PY, Yang TT, Chiang YP et al. Detection of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory tract infection using real-time RT-PCR in a hospital in northern Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2007; 106 (1): 16-24.
- 89- Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferré V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol.* 2004; 155 (1): 11-5.
- 90- Meng QL, Qiu F, Shen LP, Bi SL. Establishment and application of TaqMan real-time RT-PCR for the detection of hepatitis E virus. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2012; 26 (6): 486-8.
- 91- Dash PK, Boutonnier A, Prina E, Sharma S, Reiter P. Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*. *Virol J.* 2012; 9: 27.
- 92- Dzieciatkowski T, Przybylski M, Kawecki D, Midak-Siewirska A, Gieryńska M, Łuczak M et al. Application of real-time PCR and LightCycler system for investigating the presence of human herpesvirus 7 DNA. *Med Dosw Mikrobiol.* 2009; 61 (1): 93-8.
- 93- Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J.* 2009; 6: 10.
- 94- Dzieciatkowski T, Przybylski M, Gieryńska M, Luczak M. Real-time PCR as an efficient tool for investigating the presence of human herpesvirus 6 DNA. *Med Dosw Mikrobiol.* 2008; 60 (3): 259-65.

- 95- D'Souza DH, Critzer FJ, Golden DA. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of Salmonella using invA primers. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6 (9): 1097-106.
- 96- Hardick J, Maldeis N, Theodore M, Wood BJ, Yang S, Lin S et al. Real-time PCR for Chlamydia pneumoniae utilizing the Roche Lightcycler and a 16S rRNA gene target. J Mol Diagn. 2004; 6 (2): 132-6.
- 97- Mokhtari W, Nsaibia S, Gharbi A, Aouni M. Real-time PCR using SYBR Green for the detection of Shigella spp. in food and stool samples. Mol Cell Probes. 2013; 27 (1): 53- 9.
- 98- Bui XT, Wolff A, Madsen M, Bang DD. Reverse transcriptase real-time PCR for detection and quantification of viable Campylobacter jejuni directly from poultry faecal samples. Res Microbiol. 2012; 163 (1): 64-72.
- 99- Barletta F, Ochoa TJ, Mercado E, Ruiz J, Ecker L, Lopez G et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for enteropathogenic Escherichia coli: a tool for investigation of asymptomatic versus symptomatic infections. Clin Infect Dis. 2011; 53 (12): 1223-9.
- 100- Leblanc-Maridor M, Beaudeau F, Seegers H, Denis M, Belloc C. Rapid identification and quantification of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. BMC Microbiol. 2011; 11: 113.
- 101- Shariati L, Validi M, Tabatabaiefar MA, Karimi A, Nafisi MR. Comparison of real-time PCR with disk diffusion, agar screen and E-test methods for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol. 2010; 61(6): 520-4.
- 102- Selva L, Esteva C, Gené A, de Sevilla MF, Hernandez-Bou S, Muñoz-Almagro C. Direct detection of Streptococcus pneumoniae in positive blood cultures by real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 66 (2): 204-6.

- 103- Houser BA, Hattel AL, Jayarao BM. Real-time multiplex polymerase. Chain reaction assay for rapid detection of *Clostridium difficile* toxin-encoding strains. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7 (6): 719-26.
- 104- Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, Van Daele S, De Baets F, De Vos D et al. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 244.
- 105- Rhodes G, Fluri A, Gerber M, Henderson A, Ruefenacht A, Pickup RW. Detection of *Mycobacterium immunogenum* by real-time quantitative Taqman PCR. *J Microbiol Methods.* 2008; 73 (3): 266-8.
- 106- Faber J, Moritz N, Henninger N, Zepp F, Knuf M. Rapid detection of common pathogenic *Aspergillus* species by a novel real-time PCR approach. *Mycoses.* 2009; 52 (3): 228-33.
- 107- Bandt D, Monecke S. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jiroveci*. *Transpl Infect Dis.* 2007; 9 (3): 196-202.
- 108- Zhao Y, Petraitiene R, Walsh TJ, Perlin DS. A real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Exserohilum rostratum*, a causative pathogen of fungal meningitis associated with injection of contaminated methylprednisolone. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (3): 1034-6.
- 109- Hadfield SJ, Chalmers RM. Detection and characterization of *Cryptosporidium cuniculus* by real-time PCR. *Parasitol Res.* 2012; 111 (3): 1385-90.
- 110- Babady NE, Sloan LM, Rosenblatt JE, Pritt BS. Detection of *Plasmodium knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(3): 516-8.
- 111- Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis.* 2003; 3: 7.

- 112- Fredlund E, Gidlund A, Sulyok M, Börjesson T, Krska R, Olsen M et al. Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats – Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int J Food Microbiol.* 2013; 167 (2): 276-83.
- 113- Scaufflaire J, Godet M, Gourgue M, Liénard C, Munaut F. A multiplex real-time PCR method using hybridization probes for the detection and the quantification of *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, and *F. verticillioides*. *Fungal Biol.* 2012; 116 (10): 1073-80.
- 114- Reischer GH, Lemmens M, Farnleitner A, Adler A, Mach RL. Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan Probe. *J Microbiol Methods.* 2004; 59 (1): 141-6. Erratum in: *J Microbiol Methods.* 2004; 59 (3): 437.
- 115- Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7 (10): 1201-21.
- 116- Johnson JR, Urban C, Weissman SJ, Jorgensen JH, Lewis JS 2nd, Hansen G et al. AMERECUS Investigators. Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and blaCTX-M-15 among extended-spectrum- β -lactamase-producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (5): 2364-70.
- 117- Wellinghausen N, Kochem AJ, Disqué C, Mühl H, Gebert S, Winter J et al. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (9): 2759-65.
- 118- Lin B, Malanoski AP, Wang Z, Blaney KM, Ligler AG, Rowley RK et al. Application of broad-spectrum, sequence-based pathogen identification in an urban population. *PLoS One.* 2007; 2 (5): e419.
- 119- Frías De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes MR. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for

detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. J Clin Microbiol. 2012; 50 (3): 673-9.

120- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? J Clin Microbiol. 2009; 47 (4): 877-84.

121- Hall L, Wohlfel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for the identification of commonly encountered clinically important yeast species. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 5099–5102.

122- Hall L, Wohlfel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2004; 42 (2): 622-6.

123- Turenne, C, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. J. Clin. Microbiol. 37: 1846–1851

124- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lefe K, Bui U et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. J Clin Microbiol. 2001; 39 (11): 4042-51.

125- Waalwijk C, Koning JRA, Baayen RP, Gams W. Source Discordant Groupings of *Fusarium* spp. from Sections Elegans, Liseola and Dlamini Based on Ribosomal ITS1 and ITS2 Sequences. Mycological Society of America. Mycologia. 1996, 88 (3): 361-368.

126- Duggal A, Dumas MT, Jeng RS, Hubbes M. Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. Mycopathologia. 1997; 140 (1): 35-49.

127- Hennequin C, Abachin E, Symoens F, Lavarde V, Reboux G, Nolard N et al. Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 1999; 37 (11): 3586-9.

- 128- Pryce TM, Palladino S, Kay ID, Coombs GW. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Med Mycol.* 2003; 41 (5): 369-81. Erratum in: *Med Mycol.* 2004; 42 (1): 93.
- 129- Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med.* 2009; 30 (2): 391-408.
- 130- Soper SA, Williams DC, Xu Y, Lassiter SJ, Zhang Y, Ford SM et al. Sanger DNA-sequencing reactions performed in a solid-phase nanoreactor directly coupled to capillary gel electrophoresis. *Anal Chem.* 1998; 70 (19): 4036-43.
- 131- Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AF, Bahram M et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol.* 2013; 22 (21): 5271-7.
- 132- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH and Koljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One.* 2006; e5.
- 133- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz.* 9ª ed., São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.
- 134- Teixeira, ABA. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos e identificação de fungos filamentosos isolados a partir de espécimes clínicos de pacientes com malignidades hematológicas e transplantados de medula óssea e sua correlação com isolados ambientais. [Dissertação] Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- 135- *GenBank*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>>. Acesso em 9 de agosto de 2011.
- 136- *Fusarium* MLST database. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium/>>. Acesso em 9 de agosto de 2011.

137- Bio Edit (Biological sequence alignment editor). Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>. Acesso em: 9 de agosto de 2011.

138- Primer Explorer. Disponível em: <<http://primerexplorer.jp/e/>>. Acesso em: 9 de agosto de 2011.

139- Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005.

140- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 17 de agosto de 2013.

141- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 1987; 4:406-425.

142- Felsenstein. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39: 783-791.

143- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 2004; 101: 11030-11035.

144. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. In press 2011.

145- Negroni R, Martino O, Robles AM, Orduma T, Arechavala A, Brusca S, et al. ULCERA CUTANEA PROVOCADA POR HONGOS DEL GENERO *FUSARIUM*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1997; 30(4):323-328.

146- Martino, P.; Gastaldi, R.; Raccach, R.; Girmenia, C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. Journal of Infection. 1994; 28(1):7-15.

- 147- Niessen L, Vogel RF. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 140: 183-19.
- 148- Niessen L, Gräfenhan T, Voge RF. ATP citrate lyase 1 (*acl1*) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 158:171–185.
- 149- Denschlag C, Vogel RF, Niessen L. Hyd5gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 156: 189–196.
- 150- Atoui A, Khoury AE, Kalassy M, Lebrihi A. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 154:59–65.
- 151- Bernal – Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez – Tudela JL, Cuenca – Estrella M. Detection of invasive infection caused by *Fusarium solani* and non-*Fusarium solani* species using a duplex quantitative PCR-based assay in a murine model of fusariosis. *Medical Mycology*. 2012; 50: 270–275.
- 152- Haegi A, Catalano V, Luongo L, Vitale S, Scotton M, Ficcadenti N, et al. A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible interactions with grafted melon genotypes. *Phytopathology*. 2013; 103 (8):802-10.
- 153- Alastruey- Isquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-Based Survey of Filamentous Fungi and Antifungal Resistance in Spain (FILPOP Study). *Journals.ASM.org*. 2013; 57(7): 3380-3387.

154- The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. Experimental Dermatology 2008; 17: 965–971.

9. ANEXOS

9.1. Anexo1. Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 30/11/11
(Grupo I)

PARECER CEP: Nº 964/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0870.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FUSARIUM DE AMOSTRAS CLÍNICAS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LOOP - MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) E CORRELAÇÃO COM AS ESPÉCIES COMUNS NA VEGETAÇÃO DO SEU ENTORNO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marcela de Souza

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/09/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 30/05/12 e 30/11/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Realização do método LAMP para identificação de fungos das espécies de Fusarium na corrente sanguínea, eventualmente isolados de pacientes com doenças onco-hematológicas. Construção de primers para identificação destes fungos. Correlação com espécies de fungos geralmente encontradas nas plantas ao redor da UNICAMP.

III – SUMÁRIO.

Estudo prospectivo a ser conduzido no setor de micologia e laboratório de epidemiologia molecular e fungos - FCM UNICAMP. Serão efetuadas coletas de amostras de sangue de pacientes com doenças onco-hematológicas com suspeita de fungemia. Estas amostras serão avaliadas para a identificação dos fungos pelo método LAMP. Para tanto, serão anteriormente extraídos o DNA das amostras de fungos filamentosos para elaboração dos primers necessários à utilização do método. Após a identificação das cepas de fungos e respectiva frequência na população estudada serão também levantados os dados de plantio, colheita e identificação da vegetação ao redor da UNICAMP, no que tange às espécies de Fusarium presentes na vegetação e efetuada a correlação destes dados, no sentido de diagnosticar uma possível causa para a incidência destas infecções.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após analisar as respostas às pendências encaminhadas em 09/11/11, todas as questões solicitadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa foram respondidas, com isso o projeto de pesquisa encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O projeto de pesquisa só poderá ser iniciado após a aprovação pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa (CONEP).

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 27/03/12.
(PARECER CEP: Nº 964/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FUSARIUM DE AMOSTRAS CLÍNICAS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LOOP - MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) E CORRELAÇÃO COM AS ESPÉCIES COMUNS NA VEGETAÇÃO DO SEU ENTORNO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marcela de Souza

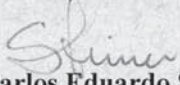
II – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com as adequações solicitadas pelo PARECER CONEP nº 086/2012, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de março de 2012.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

9.2. Anexo 2. Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: Identificação das espécies de *Fusarium* de amostras clínicas do Hospital das Clínicas UNICAMP, através da técnica de *Loop – mediated isothermal amplification* (LAMP) e correlação com as espécies comuns na vegetação localizada ao redor do hospital.

Pesquisadores: Marcela de Souza, Plínio Trabasso.

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) desta pesquisa que tem por finalidade estudar uma nova técnica para o diagnóstico de infecção fúngica em pacientes internados no Hospital de Clínicas da Unicamp que apresentem doenças onco-hematológicas (doenças que causam alterações das células sanguíneas). Para tanto será necessário coletar amostras do seu sangue e consultar dados clínicos do seu prontuário médico. Esta pesquisa está sendo realizada em parceria com a Universidade de Chiba, Japão.

O estudo poderá implicar em riscos diretos ao Sr.(a), pois serão realizadas coletas de sangue, o que pode lhe causar desconforto ou, menos frequentemente, extravasamento de sangue no tecido localizado abaixo da pele e, como consequência, dor, inchaço e mancha roxa na pele). Os procedimentos aos quais o(a) Sr.(a) será submetido constituem instrumentos normatizados para o diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas. O novo teste diagnóstico será realizado em paralelo àqueles previamente padronizados, o que não irá retardar o diagnóstico padrão, nem alterar no tratamento para infecção fúngica invasiva. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação, além de comunicá-lo acerca de qualquer dado relevante que represente risco ou benefício à sua saúde. Informamos que não há previsão de envio do sangue coletado do Sr.(a) para o Exterior e que, caso isso seja pretendido no futuro, o(a) Sr.(a) será avisado previamente e o seu sangue somente será enviado caso o(a) Sr.(a) autorize expressamente este envio.

Sendo sua participação voluntária, o Sr.(a) não terá nenhum prejuízo, caso não queira participar, e também poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Da mesma forma, sendo sua participação voluntária, o Sr.(a) não terá nenhum tipo de ressarcimento pela sua participação. Sempre que quiser tirar suas dúvidas com relação aos aspectos éticos, fazer denúncias ou reclamações sobre o Projeto de

Pesquisa de sua participação, entrar em contato, através do telefone da pesquisadora do projeto e, se necessário, através do email, telefone ou endereço do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/UNICAMP.

Este documento é emitido em duas vias idênticas, ficando uma via com o Sr.(a) e uma via com a pesquisadora. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem na próxima página:

Consentimento Livre e Esclarecido

Após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da pesquisa

Assinatura da pesquisadora

Assinatura do Orientador

TELEFONES:

Marcela de Souza: (19) 35217013

Prof Dr Plínio Trabasso : (19) 3521-7223

Comitê de Ética em pesquisa:

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 – CEP 13083-887 Campinas – SP

Fone (019) 3521-8936 ou 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br