Gabriel Naves Felix

**PCR em tempo real na detecção e discriminação de
Aspergillus fumigatus, *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium solani*
em biópsias obtidas de infecções invasivas em modelo
experimental murino**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Pós-graduação em Dermatologia

Orientadora: Dra. Gilda M. B. Del Negro

São Paulo

2018

Gabriel Naves Felix

**PCR em tempo real na detecção e discriminação de
Aspergillus fumigatus, *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium solani*
em biópsias obtidas de infecções invasivas em modelo
experimental murino**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Pós-graduação em Dermatologia

Orientadora: Dra. Gilda M. B. Del Negro

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Felix, Gabriel Naves

PCR em tempo real na detecção e discriminação de *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium solani* em biópsias obtidas de infecções invasivas em modelo experimental murino / Gabriel Naves Felix. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1. Infecções fúngicas invasivas 2. *Aspergillus* 3. *Fusarium* 4. Mucorales 5. Camundongos endogâmicos BALB C 6. Biópsias 7. Patologia 8. Reação em cadeia da polimerase 9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

USP/FM/DBD-377/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial à minha mãe Andréa, aos avós Ennio e Pérola e minha irmã Aline pelo apoio em todos os momentos, principalmente os de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, constante suporte durante todo o processo, sendo meu porto seguro e principalmente pela amizade que construímos durante este período. Esse trabalho não seria possível sem você ao meu lado.

À Dra. Vera Lúcia Teixeira de Freitas pela paciência, confiança, orientação, companheirismo, ensinamentos, amizade, apoio durante uma fase árdua do Mestrado. Muito obrigado.

Ao Dr. Amaro N D Neto pela paciência, amizade e pelos ensinamentos, sendo fundamental durante o período das análises histopatológicas.

Ao Prof. Dr. Gil Benard e Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda pelo suporte durante a realização do Mestrado, disponibilizando o Laboratório de Micologia Médica – LIM-53 para realização dos experimentos.

Ao Dr. João Nóbrega de Almeida Junior pela colaboração e amizade.

À Dra. Viviane Mazo Fávero Gimenes pela confiança desde o meu primeiro contato com o grupo do LIM-53, sendo fundamental no meu início na vida de pós-graduação.

À Ms. Roseli Santos Freitas por compartilhar a sabedoria e paixão em estudar cada detalhe da micologia médica.

À Ms. Mônica Scarpelli Martinelli Vidal pela amizade e por oferecer tardes mais leves, compartilhando músicas durante os experimentos.

Ao Dr. Mauro Cintra Giudice pelos ensinamentos fundamentais em Micologia Médica.

Aos funcionários do LIM-53, Dona Antônio, Sônia Cristina Cavalcante e Fábio Lorenzo pelo carinho e amizade.

Aos companheiros do LIM-53 que passaram e que ainda estão presentes, Danilo Thomaz Yamamoto, Lumena Siqueira, Fernanda Marques, Letícia Santos, Vanessa Moraes, Dulce Figueiredo, Flaviano Luiz Batista da Silva, Giovanna Azevedo Colestrino, Camila Midori Henriques Tanaka, Gabrielle Haddad, Antônio Marques, Ana Maria Pereira, Renata Buccheri, Oscar Chagas, Rafaella Grenfell. Muito obrigado pelo apoio e companheirismo durante essa etapa engrandecedora.

Aos colegas do LIM-48, Vera Lúcia, Daniel Valério, Cláudia, Paula K. Sato, Felipe Delatorre Busser e Célia Regina Ueda Tanowe pela confiança e amizade e em especial, Márcia Andréa Ferreira e Vivian Coelho pelo carinho, companheirismo e amizade.

Ao LIM-54 em especial à Ana Paula Marchi Rosin e Roberta Cristina Ruedas Martins pela amizade e pelo apoio.

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP pela confiança.

À Gabriela Rodrigues e Fonseca (LIM-06) pela amizade.

Ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP por fornecer os animais utilizados no estudo.

Aos meus amigos/irmãos de Uberlândia e São Paulo que me apoiaram nas horas boas e nas mais difíceis dessa etapa.

À Dona Maria, que foi a primeira pessoa que me hospedou em São Paulo, me dando todo o suporte e amizade nesta fase de transição da minha vida.

À família maravilhosa que me hospedou durante uma fase tão complicada e que me apoiou com todo o carinho. Silvana, Giuliana, Guilherme, Nonna e Chico, meu eterno agradecimento.

Aos amigos que tive o prazer em dividir teto, Raphael Rabelo, Gustavo Rabelo, Bassam Hanna e Priscila Arroyo. Com vocês, aprendi muito a conviver em grupo e ser uma pessoa melhor de várias maneiras.

Aos irmãos Fábio Cunha Oliveira, Alexandre Oviedo e Berta Hira por me apoiarem sempre e pelos momentos de distração com muito amor, músicas e boas conversas.

À Bianca Alencar Brandão, que entrou na minha vida nos últimos e mais intensos meses, antes da entrega da dissertação, me trazendo paciência e paz. Obrigado por deixar minha vida fantasticamente amena e maravilhosamente simples com tanto amor.

Finalmente à minha família, que sem ela não seria possível o cumprimento dessa etapa. Só a gente entende a nossa cumplicidade. Quando estamos juntos, os bons sentimentos invadem os nossos corações e aproveitamos cada instante único. É bom ter com quem contar nos momentos difíceis, alguém para compartilhar as vitórias, alguém que torça com você. Mãe, vô Ennio, vó Pérola e Aline, vocês regam a minha vida de sentimentos bons e sou completamente grato por essa dádiva.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001

*“A felicidade só é real quando compartilhada”
Christopher McCandless (Alexander Supertramp)*

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de tabelas

Lista de siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspergilose invasiva.....	2
1.2. Mucormicose.....	5
1.3. Fusariose invasiva.....	7
1.4. Diagnóstico laboratorial das infecções por <i>Aspergillus</i> spp., mucoráceos e <i>Fusarium</i> spp.....	9
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Geral.....	14
3.2. Específicos.....	14
3.2.1. Desenvolver modelos experimentais murinos para reproduzir infecção disseminada por <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Fusarium solani</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> (ordem Mucorales).....	14
3.2.2. Coletar os órgãos infectados dos animais (pulmão, fígado, rins, coração e cérebro), para a obtenção de tecidos a fresco e parafinados.....	14
3.2.3. Cultivar os fragmentos de tecido a fresco em meios de cultura para fungos e confirmar a identificação dos mesmos por análises macro e microscópica.....	14
3.2.4. Submeter os fragmentos parafinados às colorações de hematoxilina-eosina e prata (Gomori-Grocott), para análise por microscopia ótica das estruturas fúngicas e morfologia dos tecidos.....	14
3.2.5. Extrair DNA dos tecidos (a fresco e parafinados) empregando um método <i>in house</i>	14
3.2.6. Amplificar o material genômico por PCR convencional e qPCR com <i>primers</i> específicos, para a detecção de <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp. e fungos da ordem Mucorales.....	14

3.2.7. Comparar os resultados da qPCR, exames histopatológicos e cultura, para avaliar a eficiência da técnica molecular na detecção dos patógenos em tecidos infectados.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Desenvolvimento dos modelos experimentais murinos	15
4.2. Processamento dos tecidos para culturas, análises histopatológicas e extrações de DNA.....	17
4.2.1. Cultivos dos tecidos a fresco	17
4.2.2. Análises histopatológicas.....	17
4.2.3. Extração de DNA dos tecidos a fresco e parafinados.....	18
4.3 Extração de DNA dos isolados de <i>A. fumigatus</i> , <i>R. arrhizus</i> e <i>F. solani</i>	19
4.4. Clonagem dos fragmentos amplificados a partir de sequências gênicas de <i>A. fumigatus</i> , <i>R. arrhizus</i> e <i>F. solani</i>	19
4.4.1. Inserção dos fragmentos de DNA nos plasmídeos	20
4.4.2. Preparo das bactérias competentes	20
4.4.3. Transformação das bactérias <i>E. coli</i>	20
4.4.4. Procedimento de extração dos plasmídeos	21
4.4.5. Sequenciamentos dos clones.....	21
4.5. <i>Primers</i> empregados na técnica de PCR convencional (semi-nested) e na qPCR	22
4.6. Avaliação da especificidade dos <i>primers</i> por PCR convencional e qPCR.....	24
4.7. Avaliação do limiar de detecção (LD) da PCR semi-nested e qPCR.....	25
4.8. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por PCR semi-nested.....	26
4.9. Detecção dos produtos amplificados por PCR semi-nested.....	28
4.10. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por qPCR.....	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Modelo murino de aspergilose, mucormicose e fusariose disseminadas.....	30
5.1.1. Culturas dos tecidos a fresco	30
5.1.2. Análises histopatológicas dos tecidos parafinados	31
5.2. Clonagem dos fragmentos amplificados a partir de sequências gênicas de <i>A. fumigatus</i> , <i>R. arrhizus</i> e <i>F. solani</i>	37

5.3. Avaliação da especificidade das amplificações por PCR semi-nested, com os <i>primers</i> para <i>Aspergillus</i> spp., mucoráceos e <i>Fusarium</i> spp.....	37
5.4. Avaliação da especificidade das amplificações por qPCR.....	39
5.5. Avaliação do limiar de detecção (LD) da PCR semi-nested e qPCR.....	41
5.6. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por PCR semi-nested.....	45
5.7. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por qPCR.....	47
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	

Lista de Figuras

Figura 1. Aspectos das culturas positivas obtidas dos tecidos a fresco dos órgãos dos camundongos infectados.....	31
Figura 2. Cortes de tecidos de camundongos infectados com cepa de <i>A. fumigatus</i> ATCC 204305.....	33
Figura 3. Camundongos infectados com cepa de <i>R. arrhizus</i> CBS 11207.....	35
Figura 4. Camundongos infectados com cepa de <i>F. solani</i> ATCC 36031.....	36
Figura 5. Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 2º round de amplificação da PCR semi-nested, para avaliação da especificidade.....	38
Figura 6. Curvas de amplificação da qPCR com <i>primers</i> de <i>Aspergillus</i> spp. (P2/P1)	39
Figura 7. Curvas de amplificação da qPCR com <i>primers</i> de mucoráceos (ZM1/ZM3)	40
Figura 8. Curvas de amplificação da qPCR com <i>primers</i> de <i>Fusarium</i> spp. (BtFu-F1/R)	41
Figura 9. Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 1º e 2º rounds da PCR semi-nested com diluições de DNA de <i>A. fumigatus</i> , <i>R. arrhizus</i> e <i>F. solani</i> para avaliação do limiar de detecção.....	42
Figura 10. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com <i>primers</i> P2/P1 e diluições seriadas na razão 1:10 do DNA de <i>A. fumigatus</i>	43
Figura 11. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com <i>primers</i> ZM1/ZM3 e diluições seriadas na razão 1:10 do DNA de <i>R. arrhizus</i>	43
Figura 12. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com <i>primers</i> BtFu-F1/BtFu-R e diluições seriadas na razão 1:10 do DNA de <i>F. solani</i>	43
Figura 13. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com <i>primers</i> P2/P1 e diluições seriadas na razão 1:10 dos clones recombinantes de <i>A. fumigatus</i>	44
Figura 14. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com <i>primers</i> Zm1/ZM3 e diluições seriadas na razão 1:10 dos clones recombinantes de <i>R. arrhizus</i>	45
Figura 15. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com <i>primers</i> BtFu-F1/R e diluições seriadas na razão 1:10 dos clones recombinantes de <i>F. solani</i>	45
Figura 16. Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 2º round de amplificação com amostras de DNA extraídas dos tecidos infectados a fresco e parafinados com <i>primers</i> P1/P2 de <i>Aspergillus</i> spp.....	46

Figura 17. Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 2º <i>round</i> de amplificação com amostras de DNA extraídas dos tecidos infectados a fresco e parafinados com <i>primers</i> ZM1/ZM3 de mucoráceos.....	47
Figura 18. Diagrama mostrando a inclinação (<i>slope</i>) da curva-padrão construída em um ensaio de qPCR para detecção de <i>Aspergillus</i> spp.....	48
Figura 19. Diagrama mostrando a inclinação (<i>slope</i>) da curva-padrão construída em um ensaio de qPCR para detecção de mucoráceos.....	48
Figura 20. Diagrama mostrando a inclinação (<i>slope</i>) da curva-padrão construída em um ensaio de qPCR para detecção de <i>Fusarium</i> spp.....	49
Figura 21. A – Curvas de amplificação dos tecidos a fresco; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos a fresco.....	50
Figura 22. A - Curvas de amplificação dos tecidos parafinados; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos parafinados.....	50
Figura 23. A - Curvas de amplificação de DNA dos tecidos a fresco; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos a fresco.....	51
Figura 24. A – Curvas de amplificação de DNA os tecidos parafinados; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos parafinados.....	52
Figura 25. A – Curvas de amplificação de DNA dos tecidos a fresco; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos a fresco.....	53
Figura 26. A – Curvas de amplificação de DNA dos tecidos parafinados; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos parafinados.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificar β -actina de camundongo e para a detecção de <i>Aspergillus</i> spp e <i>Rhizopus</i> spp nos tecidos a fresco e parafinados.....	23
Tabela 2: <i>Primers</i> utilizados nas ampliações por PCR semi-nested e qPCR, para a detecção do gênero <i>Fusarium</i> nos tecidos a fresco e parafinados.....	24
Tabela 3. Reatividade cruzada dos <i>primers</i> de <i>Fusarium</i> spp empregados nos ensaios de PCR.....	38
Tabela 4 – Valores de inclinação (<i>slope</i>), R^2 e eficiência das curvas-padrão dos ensaios de qPCR para os três grupos de fungos.....	48
Tabela 5. Valores de <i>Ct</i> (média) dos tecidos a fresco e parafinados dos órgãos dos cinco animais infectados com <i>A. fumigatus</i> por inoculação intravenosa.....	51
Tabela 6. Valores de <i>Ct</i> (média) dos tecidos a fresco e parafinados dos órgãos dos cinco animais infectados com <i>R. arrhizus</i> por inoculação intravenosa.....	52
Tabela 7. Valores de <i>Ct</i> (média) dos tecidos a fresco dos órgãos dos cinco animais infectados com <i>F. solani</i> por inoculação intravenosa.....	54

Lista de siglas

AI.....	Aspergilose Invasiva
ATCC.....	<i>American Type Culture Collection</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CEUA.....	Comissão de Ética para Uso de Animais
CV.....	Coeficiente de Variação
Ct.....	<i>Threshold cycle</i>
DP.....	Desvio Padrão
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
DNAr.....	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
ECMM.....	<i>European Confederation of Medical Mycology</i>
ESCMID.....	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases</i>
FMUSP.....	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GM.....	Galactomanana
HE.....	Hematoxilina-eosina
IFI.....	Infecções Fúngicas Invasivas
LB.....	Luria-Bertani
LD.....	Limiar de Detecção
IMT.....	Instituto de Medicina Tropical
ITS.....	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
pb.....	Pares de Base
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR.....	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RPM.....	Rotações por minuto
SDS.....	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
spp.....	<i>Species</i>

RESUMO

Felix GN. *PCR em tempo real na detecção e discriminação de Aspergillus fumigatus, Rhizopus arrhizus e Fusarium solani em biópsias obtidas de infecções invasivas em modelo experimental murino* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Nas últimas décadas, tem sido relatado o aumento de casos de infecções fúngicas invasivas por agentes oportunistas, tais como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e fungos da ordem Mucorales, em pacientes hospitalizados, particularmente os imunocomprometidos. Como os sintomas são frequentemente inespecíficos, esses patógenos não são identificados inicialmente como agentes causais. Além disso, muitas vezes o diagnóstico só é estabelecido em estágios tardios da infecção, pois as metodologias diagnósticas de rotina, como cultura e microscopia, apresentam limitações caracterizadas, sobretudo, por baixa sensibilidade e especificidade. Os métodos moleculares, incluindo as amplificações de material genômico por PCR, em tecidos a fresco e parafinados, têm sido mais aplicados para a melhoria na detecção e identificação desses patógenos. A técnica de PCR em tempo real apresenta a vantagem de fornecer resultados com rapidez e elevada sensibilidade, além de minimizar os riscos de contaminação ambiental das amostras. Para aprimorar o conhecimento sobre a eficácia desta técnica na detecção e identificação dos patógenos, neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c para o desenvolvimento de modelos de infecção invasiva por *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium solani*. Após inoculação dos fungos por via intravenosa, os órgãos (pulmão, fígado, rins, cérebro e coração) foram retirados para realização dos exames de cultura, histopatologia, PCR semi-nested e PCR em tempo real. As culturas foram realizadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 3 a 5 dias à temperatura ambiente. Para as análises histopatológicas, uma parte dos órgãos foi emblocada em parafina e cortes foram submetidos às colorações por hematoxilina-eosina e Gomori-Grocott. Para as análises moleculares, foram realizadas clonagens dos *amplicons* obtidos com os mesmos *primers* gênero-específicos (*Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp.) e ordem-específicos (mucoráceos) empregados nas reações de PCR. Os clones foram

empregados na técnica de PCR em tempo real para avaliação da sensibilidade analítica dos ensaios e como controles positivos. Os tecidos a fresco e parafinados foram submetidos a extrações de DNA, e as amostras foram avaliadas por PCR do tipo *semi-nested*, e por PCR em tempo real, empregando-se os *primers* gênero e ordem-específicos. Após 48-72 horas, observou-se crescimento fúngico nas culturas, porém a identificação macroscópica foi possível somente após 96 horas. Nos exames histopatológicos foram observadas presença de estruturas fúngicas e alterações na morfologia tecidual, confirmando a disseminação da infecção nos três modelos experimentais. Os dois métodos de PCR (convencional e tempo real) empregando os *primers* para *Aspergillus* e mucoráceos demonstraram 100% de especificidade. Além disso, os *primers* para mucoráceos amplificaram amostras de DNA dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor* e *Lichtheimia*, confirmando serem ordem-específicos. Por outro lado, os testes moleculares com emprego de diversos *primers* de *Fusarium* apresentaram reatividade cruzada, principalmente com amostras de DNA de *Aspergillus* e *Rhizopus*. O limiar de detecção (LD) das PCR *semi-nested* para *Aspergillus* e *Rhizopus* foi de 50 fentogramas de DNA, enquanto na PCR em tempo real o LD foi de 20 fentogramas de DNA e 2×10^2 plasmídios/ μ l. Os dois métodos moleculares detectaram DNA de *Aspergillus* e *Rhizopus*, em 100% das amostras de tecido a fresco e parafinado, corroborando com os resultados de cultura e histopatologia. Os resultados do estudo demonstraram que a PCR em tempo real foi capaz de detectar e diferenciar *Aspergillus* e *Rhizopus* nos tecidos a fresco e parafinados, com 100% de especificidade e maior sensibilidade analítica quando comparada à PCR *semi-nested*. Entretanto, os resultados obtidos com diversos *primers* de *Fusarium* utilizados nos ensaios de PCR foram inconsistentes em relação à especificidade das amplificações. A PCR em tempo real constituiu um método rápido para diagnosticar, com acurácia, aspergilose e mucormicose em tecidos, podendo ser implementada como alternativa na rotina diagnóstica de laboratórios de patologia ou microbiologia. Por outro lado, a técnica apresentou baixa especificidade com os *primers* de *Fusarium* selecionados neste estudo. Outras sequências gênicas deste fungo deverão ser avaliadas na técnica molecular para se atingir resultados precisos.

Descritores: infecções fúngicas invasivas; *Aspergillus*; *Fusarium*; Mucorales; camundongos endogâmicos BALB C; biópsias; patologia; reação em cadeia da polimerase; reação em cadeia da polimerase em tempo real.

SUMMARY

Felix GN. *Real-time PCR in the detection and discrimination of Aspergillus fumigatus, Fusarium solani and Rhizopus arrhizus in biopsies taken from murine models of invasive infection* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Increase of invasive fungal infections by opportunistic agents, such as *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. and fungi from the order Mucorales, in immunocompromised patients has been reported in the last decades. As the symptoms are often non-specific, diagnosis are only established in late stages of infection. Routine diagnostic methodologies, such as culture and direct microscopy, have limitations due to their low sensitivity and specificity. Molecular methods, including amplifications of nucleic acids by PCR in fresh and paraffined tissues, have been more frequently applied to improve the detection and identification of these pathogens. The real-time PCR (qPCR) technique has the advantage of providing fast results with high sensitivity, as well as minimizing the risks of environmental contamination of the samples. This study aimed to evaluate the effectiveness of this technique for detection and discrimination of the fungal pathogens in tissues taken from BALB/c mice intravenously inoculated with *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus* and *Fusarium solani*. The organs (lung, liver, kidneys, brain and heart) were removed from animals and analysed by culture, histopathology, semi-nested PCR and qPCR. Recombinant plasmid clones containing small sequences of *Aspergillus*, *Fusarium* and mucoraceous were used to draw qPCR standard curves and to evaluate the analytical sensitivity of the assays. The fresh and paraffined tissues were submitted to DNA extractions, and samples were evaluated by semi-nested PCR and qPCR with genus-specific primers for *Aspergillus* and *Fusarium*, and order-specific primers for mucoraceous. Cultures were positive for all fresh tissue samples. Presence of typical fungal structures and alterations in tissue morphology were observed in the histopathological examinations, confirming the dissemination of infection in the three experimental models. Both PCR assays employing *Aspergillus* and mucoraceous primers demonstrated 100% specificity. On the other hand, molecular tests using at least six different *Fusarium* primers showed cross reactivity, mainly with *Aspergillus* and *Rhizopus* DNA samples. The limit of detection (LD) of the semi-nested PCR for

Aspergillus and *Rhizopus* was 50 femtograms of DNA, while for the qPCR it was 20 femtograms of DNA, and 2×10^2 plasmids/ μ l. Both molecular methods detected *Aspergillus* and *Rhizopus* DNA in 100% of fresh and paraffined tissue samples, corroborating the results with cultures and histopathology. The results of the study demonstrated that qPCR assay was able to detect and differentiate *Aspergillus* and *Rhizopus* in fresh and paraffined tissues, with 100% of specificity and higher analytical sensitivity when compared to semi-nested PCR assay. However, the results obtained with several *Fusarium* primers in the PCR assays were inconsistent regarding specificity of the amplifications. Real-time PCR assay is a fast and accurate method to diagnose aspergillosis and mucormycosis in tissues, and could be implemented as an alternative tool for diagnostic routine in pathology or microbiology laboratories. On the other hand, the technique showed low specificity with the *Fusarium* primers selected in this study. Other gene sequences should be evaluated by PCR assays techniques to achieve accurate results.

Descriptors: invasive fungal infections; *Aspergillus*; *Fusarium*; Mucorales; mice; biopsy; pathology; polymerase chain reaction; real-time polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas (IFI) em pacientes hospitalizados continua a aumentar, como consequência dos avanços nos tratamentos clínicos e cirúrgicos. Pacientes imunocomprometidos, portadores de doenças subjacentes graves, pacientes que se submeteram a procedimentos cirúrgicos complexos, e pacientes em condições clínicas críticas internados em unidades de terapia intensiva são os mais suscetíveis às IFI (Salehi *et al.*, 2016; Suleyman e Alangaden, 2016).

Os índices de morbidade e mortalidade relacionados a essas infecções dependem do patógeno envolvido e das condições clínicas do paciente (Patel *et al.*, 2017). Como os sintomas são frequentemente inespecíficos, patógenos fúngicos não são identificados inicialmente como agentes causais, e muitas vezes o diagnóstico só é estabelecido em estágios tardios da infecção, contribuindo para os elevados índices de mortalidade, que podem atingir 90% dos casos com envolvimento do sistema nervoso central e/ou disseminação da infecção (Bašková e Buchta, 2012; Pemán e Salavert, 2014).

Embora a maior parcela das infecções oportunistas seja atribuída a espécies de *Candida* e *Aspergillus*, outros gêneros, até então considerados como raros, mas associados a índices de mortalidade muito elevados, têm se tornado mais frequentes, e incluem os gêneros *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Lomentospora/Scedosporium*, e diferentes membros da ordem Mucorales, como *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, entre outros (Baskova e Buchta, 2012; Lamoth e Calandra, 2017). Infecções invasivas, causadas por fungos filamentosos, acometem com maior frequência, pacientes portadores de enfermidades malignas hematológicas submetidos à quimioterapia, e transplantados de medula óssea (Buchheidt *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2017).

De acordo com um estudo epidemiológico realizado na Itália no período entre 1999 e 2003, em 11.802 pacientes com neoplasias malignas hematológicas, ocorreram 538 infecções fúngicas invasivas. Destes, a maioria das infecções (346/538) foram causadas por fungos filamentosos (64%), principalmente por *Aspergillus* spp. (310/346). Entretanto, a maior taxa de mortalidade foi associada à mucormicose (64%), seguida de fusariose (53%), aspergilose (42%) e candidemia (33%) (Ruhnke e Schwartz, 2016).

A elevada morbi-mortalidade e os custos decorrentes associados às IFI demonstram que estas enfermidades devem ser consideradas importante problema de saúde pública, sendo desejável um diagnóstico laboratorial rápido e preciso, realizado ainda nos estágios iniciais da infecção. Deste modo, é possível garantir uma terapia antifúngica apropriada, pois dependendo do gênero ou espécie isolada, as terapias empíricas podem ser ineficientes (Hata *et al.*, 2008; Hofman *et al.*, 2010).

1.1. Aspergilose invasiva

Aspergilose invasiva (AI) é causada por diversas espécies de *Aspergillus*, encontradas em abundância no ar, solo, alimentos, etc. Os conídios inalados atingem os alvéolos pulmonares, e em pacientes imunocomprometidos, podem se disseminar, atingindo outros órgãos. O aumento na incidência de casos de AI tem sido atribuído ao uso indiscriminado de fluconazol como profilaxia para candidíase invasiva, antifúngico que não tem atividade contra o gênero *Aspergillus* (Lionakis e Levitz, 2018). A mortalidade atribuída às AI nesses pacientes oscila entre 40 e 90% dos casos, particularmente em pacientes transplantados de medula óssea e pacientes neutropênicos portadores de enfermidades hematológicas malignas, principalmente devido à demora para iniciar a terapêutica adequada (Leeftang *et al.*, 2015; Suleyman e Alangaden, 2016; Avcu *et al.*, 2017).

Muitos fatores predisõem às AI, entre eles, a neutropenia grave (<500 neutrófilos/mL) e prolongada (>10 dias) é o fator mais importante. As manifestações clínicas mais frequentes nesses pacientes são a forma pulmonar invasiva e a forma disseminada (Perusquia-Ortiz *et al.*, 2012).

Espécies de *Aspergillus* da seção Fumigati são isoladas de cerca de 80% dos casos de AI. É um complexo que agrupa cerca de 30 espécies, que só são diferenciadas por identificação molecular, pois possuem morfologias muito semelhantes, entre as quais *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *Neosartorya udagawe*, *N. pseudofischeri*, etc. Entretanto, *A. flavus* (Seção Flavi), *A. niger* (Seção Nigri) e *A. terreus* (Seção Terrei) têm sido isolados com maior frequência (Barton, 2013; Desoubeaux *et al.*, 2014; Suleyman e Alangaden, 2016).

Aspergilose invasiva envolve predominantemente o trato respiratório, afetando o parênquima pulmonar, e mais esporadicamente pleura, traqueia e brônquios. A partir desses sítios, ocorre disseminação do patógeno para outros órgãos em 10 a 25% dos casos (Barton, 2013).

Dificuldades no diagnóstico de AI retardam o início da terapia antifúngica, pois o quadro clínico é usualmente inespecífico. O isolamento do fungo a partir de amostras clínicas ocorre em cerca de 50% dos casos, mas do sangue é muito raro. Por outro lado, isolamento do fungo a partir de amostras respiratórias podem refletir colonização das vias aéreas ou ainda contaminação ambiental, uma vez que conídios do fungo estão dispersos no ar (Rantakokko-Jalava *et al.*, 2003; Barton, 2013; Prasad e Fishman, 2014).

No exame direto do espécime clínico, bem como no histopatológico, mesmo na presença de hifas sugestivas de *Aspergillus*, é difícil discriminar este fungo de outros agentes de hialohifomicoses, entre as quais a fusariose (Barton, 2013; Desoubeaux *et al.*, 2014). A galactomanana (GM), polissacarídeo da parede celular das espécies de

Aspergillus, pode ser detectada em fluidos biológicos em pacientes portadores de AI, e tem sido frequentemente utilizada como teste de triagem na prática clínica. Entretanto, as principais limitações do ensaio são os elevados índices de resultados falso-positivos e baixa reprodutibilidade dos ensaios. Por outro lado, estudos têm demonstrado que o teste de detecção de GM apresenta elevado valor preditivo negativo, permitindo a exclusão de AI em pacientes com resultados persistentemente negativos (Rantakokko-Jalava *et al.*, 2003; Alanio e Bretagne, 2017; Colombo *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm avaliado a detecção de DNA de *Aspergillus* diretamente nas amostras clínicas, e a padronização dos ensaios de PCR tem mostrado avanços importantes. No entanto, até o momento, esta técnica molecular tem sido raramente utilizada na rotina diagnóstica de AI, por não estar disponível em muitos centros médicos (Desoubeaux *et al.*, 2014; Lamothe e Calandra, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado a utilidade dos ensaios de PCR na amplificação de DNA em tecidos a fresco e parafinados, embora ainda não estejam padronizados. Apesar dos resultados de sensibilidade e especificidade serem variáveis entre os estudos, os valores são superiores aos dos métodos clássicos, além de serem obtidos de modo mais rápido (Bialek *et al.*, 2005; Buitrago *et al.*, 2013; Buitrago *et al.*, 2014; Frickmann *et al.*, 2015).

Voriconazol é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da AI, seguido de anfotericina B lipossomal. Isavuconazol pode ser utilizado em caso de falha na terapêutica com esses fármacos, mas ainda foi pouco avaliado em ensaios clínicos (Leroux e Ullmann, 2013; Patterson *et al.*, 2016).

1.2. Mucormicose

A ordem Mucorales está representada por um grupo cosmopolita de fungos saprófitas encontrados no solo e em matéria orgânica em decomposição (Walther *et al.*, 2013). Nos últimos anos, os fungos mucoráceos emergiram como agentes de infecções invasivas em pacientes hospitalizados. Presumivelmente, isto é em parte, devido à profilaxia antifúngica para *Aspergillus* spp., reduzindo a frequência de infecções por este gênero, mas favorecendo a mucormicose como infecção oportunista (Voigt *et al.*, 2013).

Os patógenos mais frequentes nas mucormicoses são *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. e *Lichtheimia* spp. (previamente classificada como *Absidia* e *Mycoclados*). A incidência dessas infecções tem aumentado nos anos recentes, devido ao aumento no número de pacientes com imunossupressão (Muszewska *et al.*, 2014). Nos países desenvolvidos, a mucormicose ainda é rara, mas pacientes com doenças hematológicas malignas são os mais suscetíveis à infecção por mucoráceos (Chakrabarti e Singh, 2014). Por outro lado, em países em desenvolvimento, em particular na Índia, a doença é mais frequente e ocorre principalmente em pacientes diabéticos não controlados. A prevalência da mucormicose varia de 0,01 a 0,2 por 100.000 habitantes na Europa e nos Estados Unidos; na Índia, o índice é maior, atingindo 14 em 100.000 habitantes (Douglas *et al.*, 2016; Skiada *et al.*, 2018).

As principais manifestações clínicas da mucormicose são a forma rinocerebral, pulmonar, gastrointestinal, cutânea e disseminada. Entre os pacientes de risco, a forma rino-cerebral é a mais frequente, ocorrendo em 30 a 40% dos casos de mucormicose. Nesta forma da doença, o paciente, em geral, apresenta cetoacidose diabética. As manifestações pulmonares ocorrem em pacientes com câncer ou submetidos a transplantes de medula, enquanto infecções cerebrais e disseminadas predominam em pacientes adictos de drogas intravenosas. Em adultos, os índices de mortalidade variam

entre 20 e 100%, na dependência das condições clínicas dos pacientes, local da infecção e tratamento. Em pacientes hematológicos, com infecção pulmonar focal, os índices de mortalidade variam de 60 a 100% (Severo *et al.*, 2010; Bassetti e Bouza, 2017; Skiada *et al.*, 2018). A progressão da doença é rápida, devido à grande capacidade dos fungos de invadir os vasos sanguíneos e, através deles disseminar-se rapidamente para órgãos e estruturas adjacentes, requerendo diagnóstico e tratamento clínicos e/ou cirúrgicos precoces (Pemán e Salavert, 2014).

O diagnóstico da mucormicose é baseado, em geral, numa correlação entre os exames micológico, histopatológico e as manifestações clínicas. Devido à similaridade de manifestações com outras infecções causadas por fungos filamentosos, como a aspergilose e a fusariose, há dificuldade em estabelecer um diagnóstico específico. O isolamento dos mucoráceos pode ser dificultado pela maceração do espécime clínico antes da semeadura em meios de cultura, que por possuírem raros septos, facilmente perdem o conteúdo celular, dificultando o crescimento em culturas (Lau *et al.*, 2007; Muszewska *et al.*, 2014). Por outro lado, uma vez que esses fungos podem ser considerados como contaminantes ao crescerem em culturas de amostras clínicas, a importância do exame histopatológico é inquestionável (Perusquia-Ortiz *et al.*, 2012; Bassetti e Bouza, 2017; Skiada *et al.*, 2018). A presença de hifas pouco ou não septadas, associada a alterações morfológicas do tecido em amostras de sítios estéreis, define o diagnóstico da infecção, mesmo com culturas negativas (Dannaoui *et al.*, 2010). Entretanto, a diferenciação entre a mucormicose e as hialohifomicoses pode ser dificultada quando há poucos elementos fúngicos no tecido, ou a morfologia é atípica (Severo *et al.*, 2010).

A aplicação de técnicas moleculares para a detecção direta de DNA dos mucoráceos, em tecidos a fresco e parafinados, é recente. A sensibilidade e

especificidade variam entre os estudos e, em geral, o número de pacientes avaliados é pequeno. Deste modo, até o momento, os ensaios de PCR são recomendados como ferramentas valiosas para complementar os testes diagnósticos convencionais (Hata *et al.*, 2008; Douglas *et al.*, 2016; Skiada *et al.*, 2018).

Anfotericina B e posaconazol são os fármacos mais utilizados no tratamento das mucormicoses. A ressecção cirúrgica, particularmente na forma rino-cerebral, é fundamental para aumentar as chances de sobrevivência, associada ao tratamento concomitante com anfotericina B lipossomal e regulação do quadro de diabetes (Severo *et al.*, 2010; Cornely *et al.*, 2014; Bassetti e Bouza, 2017).

1.3. Fusariose invasiva

O gênero *Fusarium* abrange uma grande variedade de espécies, sendo a maioria delas encontrada em solo, ar, água, e como saprófitas ou patógenos vegetais. Estudos têm demonstrado que espécies de *Fusarium* patogênicas ao homem têm sido isoladas de sistemas de abastecimento de água em hospitais, indicando que os propágulos fúngicos podem ser transmitidos, por inalação, durante o uso de torneiras e chuveiros (Galimberti *et al.*, 2012; Guarro, 2013; Guevara-Suarez *et al.*, 2016).

Estudos filogenéticos moleculares têm agrupado espécies de *Fusarium* de relevância clínica, como membros de complexos, entre os quais: complexo *F. solani*, complexo *F. oxysporum*, complexo *F. fujikuroi*, complexo *F. incarnatum-equiseti*, complexo *F. dimerum*, entre outros (Al-Hatmi *et al.*, 2016).

Nos Estados Unidos e Europa, *Fusarium* é o segundo agente não-*Aspergillus* isolado de infecções humanas. Espécies do complexo *F. solani* são os patógenos mais isolados, atingindo 40-50% dos casos, seguidos pelo complexo *F. oxysporum* (20%), *F. verticillioides* (10%) e *F. moniliforme* em 10% dos casos (Kontoyiannis *et al.*, 2010; Douglas *et al.*, 2016).

As manifestações clínicas da fusariose variam de infecções superficiais às formas disseminadas, estas últimas com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, podendo atingir 100% dos casos em pacientes com neutropenia persistente, leucemia aguda e submetidos a transplantes (Perini *et al.*, 2013; Tapia e Amaro, 2014). As infecções disseminadas afetam múltiplos órgãos, com lesões cutâneas metastáticas pleomórficas, que podem evoluir para necrose (Pemán e Salavert, 2014). Entretanto, em muitos casos, as características clínicas da fusariose disseminada podem se assemelhar à aspergilose disseminada, necessitando de um diagnóstico diferencial (Galimberti *et al.*, 2012).

O isolamento do fungo a partir de biópsias de lesões cutâneas e hemoculturas definem o diagnóstico. Nas formas disseminadas, a positividade no sangue é de cerca de 50% dos casos (Pemán e Salavert, 2014). Os exames histopatológicos auxiliam no diagnóstico e são fortemente recomendados nos *guidelines* da *European Confederation of Medical Mycology and European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ECMM/ESCMID). Contudo, a morfologia das hifas nem sempre é característica, podendo se assemelhar a outras hialohifomicoses, como a aspergilose (Guarro, 2013; Van Diepeningen *et al.*, 2015). Os resultados da imunohistoquímica são muitas vezes inespecíficos, e há pouca disponibilidade comercial de anticorpos para fungos filamentosos. As sondas desenvolvidas para espécies de *Fusarium* para ensaios de hibridização *in situ* são em geral direcionadas para sequências da região do DNA ribossomal, demonstrando baixos níveis de especificidade (Van Diepeningen *et al.*, 2015).

Uma característica preocupante em *Fusarium* spp. é que frequentemente demonstra resistência a diversos antifúngicos, incluindo a anfotericina B (Mccarthy *et al.*, 2018). O fármaco de escolha para o tratamento das infecções é o voriconazol, e a

combinação de antifúngicos parece ser mais eficaz no tratamento (Tortorano *et al.*, 2014).

1.4. Diagnóstico laboratorial das infecções por *Aspergillus* spp., mucoráceos e *Fusarium* spp.

O diagnóstico das hialohifomicoses e mucormicose permanece sendo um desafio, e a demora na definição dessas enfermidades, contribui para os elevados índices de mortalidade. O fato de os sinais e sintomas dessas infecções serem inespecíficos, leva ao uso excessivo de terapias antifúngicas empíricas, acarretando efeitos adversos, problemas de interação de medicamentos e aumento dos custos. De modo geral, os testes para diagnóstico apresentam problemas de sensibilidade e/ou especificidade, e deste modo, a combinação de diversos métodos laboratoriais contribui para a melhor definição da etiologia da infecção (Lamoth e Calandra, 2017).

A visualização da morfologia fúngica diretamente nas amostras clínicas, em geral apresenta baixa sensibilidade para diferenciar *Aspergillus* de outros fungos hialinos, ou mesmo *Aspergillus* de fungos da ordem Mucorales. As culturas são o padrão-ouro para definir o agente etiológico, entretanto a positividade é relativamente baixa. Por outro lado, as culturas podem ser positivas em amostras clínicas de pacientes apenas colonizados (Frickmann *et al.*, 2015).

Os exames histopatológicos, empregando as colorações de hematoxilina-eosina e prata (Gomori-Grocott), são os melhores métodos para demonstrar as hifas desses três grupos de fungos nos tecidos (*Aspergillus*, mucoráceos e *Fusarium*), além de revelar as alterações morfológicas teciduais e a invasão dos vasos sanguíneos. Entretanto, dificuldades na diferenciação destas três classes de fungos filamentosos podem ocorrer (Hata *et al.*, 2008). Como citado anteriormente, a aspergilose pode mimetizar a mucormicose, pois apesar das hifas apresentarem morfologias distintas, a diferenciação é prejudicada quando as lesões contêm somente fragmentos de hifas (Severo *et al.*,

2010). Por outro lado, é difícil discriminar *Aspergillus* spp. de outros agentes de hialohifomicoses, como por exemplo, *Fusarium* spp. (Galimberti et al., 2012). Assim, novas ferramentas de diagnóstico tornam-se necessárias para a diferenciação desses grupos de fungos a partir dos tecidos infectados.

Quando os elementos fúngicos são detectados nos tecidos pelos exames histopatológicos, mas os resultados das culturas são negativos ou inconclusivos, técnicas imunohistoquímicas e moleculares podem ser as ferramentas laboratoriais de escolha para a identificação do agente causal (Dannaoui *et al.*, 2010; Guarner e Brandt, 2011). As primeiras, entretanto, apresentam resultados pouco específicos devido à reatividade cruzada dos anticorpos com diversas classes de fungos e, até o momento, não há disponibilidade de testes comerciais aprovados para uso na rotina laboratorial (Lease e Alexander, 2011). A técnica de hibridização *in situ* tem aplicação limitada a alguns centros de pesquisa. É técnica laboriosa, e as sondas moleculares têm custos relativamente elevados. Alguns autores ainda relatam problemas com a intensidade do sinal (Rickerts, 2016).

Os ensaios de PCR para a detecção de *Aspergillus* spp., mucoráceos e *Fusarium* spp. diretamente nos tecidos, têm sido cada vez mais empregados, demonstrando ser mais sensíveis do que as culturas (Rickerts *et al.*, 2006). A PCR em tempo real (qPCR), em geral apresenta maiores níveis de sensibilidade quando comparada à PCR convencional, e a especificidade varia de acordo com a região gênica a ser amplificada (Badiie *et al.*, 2016). A maior parte dos ensaios propostos utiliza genes de múltiplas cópias, como as regiões do DNA ribossomal (DNAr), incluindo sequências 18S, 5.8S ou 28S, e sequências *interspace* ITS1 e ITS2, ou ainda regiões do DNA mitocondrial (Lau *et al.*, 2007). Entretanto, até o momento, não há consenso sobre o melhor ensaio,

além de ser uma ferramenta diagnóstica ainda pouco disponível em muitos centros médicos (Pemán e Salavert, 2014; Douglas *et al.*, 2016).

Em 2003, Rantakokko-Jalava *et al.*, realizaram ensaios de detecção semi-quantitativa, por qPCR, amplificando a região mitocondrial de *A. fumigatus* em biópsias e lavados bronco-alveolares de pacientes com aspergilose invasiva.

Ensaio de PCR semi-nested em biópsias humanas parafinadas, foram realizados pelo grupo de Bialek *et al.* em 2005. Os autores empregaram *primers* delineados a partir da região 18S do DNA ribossomal dos mucoráceos, e *primers* de uma sequência do DNA mitocondrial de *Aspergillus* spp. A técnica foi capaz de detectar e diferenciar aspergilose de mucormicose, demonstrando 100% de especificidade.

Estudo realizado por Buitrago *et al.* (2012) teve como objetivo avaliar uma técnica de PCR pan-fúngica (*primers* da região ITS do DNAr), comparando com as culturas e com a histopatologia. Nas amostras com exame histopatológico positivo, 56% foram positivas nas culturas e 89% pela qPCR, demonstrando a utilidade da técnica molecular na identificação dos patógenos, particularmente quando os resultados das culturas são negativos.

A qPCR tem sido cada vez mais aplicada para a detecção de mucoráceos, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp. em tecidos parafinados. Estudo realizado por Hata *et al.* (2008), propôs a aplicação da qPCR utilizando sondas marcadas, para a detecção de espécies de mucoráceos em tecidos a fresco e parafinados, com histopatologia positiva. Os *primers* foram delineados a partir de uma região conservada de múltiplas cópias para este grupo de fungos, que codifica para o citocromo B, resultando em produto de amplificação de 167 pares de base. Os ensaios mostraram sensibilidade de 56% e especificidade de 100%, com limiar de detecção de 50 alvos/reação.

Mais recentemente, Salehi *et al.* (2016) empregaram ensaios de qPCR com sondas marcadas, visando amplificações da região ITS2 do DNA ribossomal, para detectar e identificar *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Scedosporium* e mucoráceos em tecidos parafinados. Os autores demonstraram que a sensibilidade dos ensaios foi de 64%, e a concordância entre a histopatologia e a qPCR foi de 80%.

Apesar das diferentes técnicas de PCR empregadas e dos resultados de sensibilidade e especificidade serem variáveis entre os estudos relatados até o momento, é notório que há um aumento significativo na detecção dos patógenos quando a técnica de PCR é comparada aos métodos clássicos, além de permitir a obtenção de resultados mais rápidos e precisos (Buitrago *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Nos exames histopatológicos, muitas vezes as características morfológicas das estruturas fúngicas não podem ser observadas, por haver poucos elementos presentes nos cortes histológicos, ou porque tais estruturas se apresentam fragmentadas, dificultando a identificação, mesmo em nível de gênero. Em geral, as culturas realizadas a partir dos fragmentos de tecidos infectados apresentam sensibilidade limitada e, com relativa frequência, são contaminadas por bactérias ou por outros fungos ambientais. Os métodos moleculares, incluindo as amplificações de material genômico por PCR, em tecidos a fresco e parafinados, têm sido aplicados para a melhoria na detecção e identificação desses patógenos. A técnica de PCR em tempo real apresenta a vantagem de fornecer resultados com rapidez e sensibilidade, mas são poucos os estudos que têm utilizado este método, particularmente no nosso país. A aplicação da técnica em modelo experimental murino contribui para a avaliação de sua eficiência na diferenciação dos patógenos, para que a mesma possa ser posteriormente validada para o diagnóstico diferencial em biópsias humanas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver um modelo experimental murino de infecção disseminada por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e da ordem Mucorales, para avaliar a eficiência do ensaio de qPCR na detecção e identificação dos patógenos, em biópsias de tecidos infectados a fresco e parafinadas.

3.2. Específicos

3.2.1. Desenvolver modelos experimentais murinos para reproduzir infecção disseminada por *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Rhizopus arrhizus* (ordem Mucorales);

3.2.2. Coletar os órgãos infectados dos animais (pulmão, fígado, rins, coração e cérebro), para a obtenção de tecidos a fresco e parafinados;

3.2.3. Cultivar os fragmentos de tecido a fresco em meios de cultura para fungos e confirmar a identificação dos mesmos por análises macro e microscópica;

3.2.4. Submeter os fragmentos parafinados às colorações de hematoxilina-eosina e prata (Gomori-Grocott), para análise por microscopia ótica das estruturas fúngicas e morfologia dos tecidos;

3.2.5. Extrair DNA dos tecidos (a fresco e parafinados) empregando um método *in house*;

3.2.6. Amplificar o material genômico por PCR convencional e qPCR com *primers* específicos, para a detecção de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e fungos da ordem Mucorales;

3.2.7. Comparar os resultados da qPCR exames histopatológicos e cultura, para avaliar a eficiência da técnica molecular na detecção dos patógenos em tecidos infectados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenvolvimento dos modelos experimentais murinos para reprodução da infecção disseminada por *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium solani*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo no. 119/15) e pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP) (Protocolo no. 318A/15) (**Anexos 1 e 2**). Foram obtidos 30 camundongos machos da linhagem BALB/c, com média de idade entre 6 e 8 semanas. Para cada um dos três modelos de infecção foram utilizados 10 animais.

Inicialmente, os animais foram submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida (Genuxal) na dose de 100 mg/kg de peso, por via intraperitoneal, quatro dias antes da inoculação, e outra dose igual um dia após a inoculação. Os animais foram mantidos no Biotério do IMT-USP, em gaiolas isoladoras com filtro e maravalha esterilizada, para garantir um ambiente livre de patógenos contaminantes do ambiente. Os animais receberam água e ração esterilizadas para evitar contaminação por bactérias e fungos ambientais.

Para o desenvolvimento da aspergilose murina, a cepa de *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 foi cultivada em ágar batata dextrose (DIFCO), por uma semana a 37°C. Uma suspensão do fungo em salina foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 para remoção das hifas e possíveis fragmentos de meio de cultura. A concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios/ml. Após serem anestesiados com cloridrato de cetamina (Dopalen, 150 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Anasedan, 10mg/kg), dois animais foram inoculados com 25 µl da suspensão por via intranasal e três foram inoculados com 25 µl por via intravenosa (Clemons *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Um dos animais morreu após a inoculação por via intravenosa. Após cinco dias, os quatro animais infectados, visivelmente debilitados, apresentavam pilo-ereção, diminuição de apetite, cifose e diminuição na interação com o grupo de animais da gaiola. Foram sacrificados sob a técnica de deslocamento cervical. Neste modelo, foram retirados em condições assépticas fígado, rins e pulmões, acondicionados em tubos com salina estéril e enviados ao laboratório.

Para o modelo murino de mucormicose, a cepa de *Rhizopus arrhizus* CBS 11207 foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO) a 35°C por uma semana. Foi preparada uma suspensão do fungo com salina estéril, filtrada em papel de filtro e ajustada para a concentração de 1×10^6 conídios/ml. Após a anestesia, cinco animais foram inoculados com uma dose de 20 µl da suspensão por via intravenosa (Dannaoui *et al.*, 2010). Após três dias, os animais visivelmente debilitados, foram sacrificados por deslocamento cervical. Neste modelo, foram retirados fígado, rins, pulmões, coração e cérebro, acondicionados em tubos com salina estéril e enviados ao laboratório.

No modelo de fusariose murina, a cepa de *Fusarium solani* ATCC 36031 foi cultivada em ágar batata dextrose (DIFCO) por uma semana a 30°C. O fungo foi suspenso em salina estéril e a suspensão filtrada. Depois de anestesiados, os cinco animais foram inoculados com 20 µl da suspensão contendo 1×10^7 conídios/ml por via intravenosa (Gonzalez *et al.*, 2013). No grupo controle, o mesmo número de animais, recebeu 20 µl de salina estéril pela mesma via de inoculação. Após quatro dias, os animais infectados estavam debilitados, e foram sacrificados por deslocamento cervical. Neste modelo, foram retirados fígado, rins, pulmões e coração, acondicionados em tubos com salina estéril e enviados ao laboratório.

No grupo controle, o mesmo número de animais recebeu 25 µl de salina estéril pelas mesmas vias de inoculação. Os três grupos de animais inoculados com salina

estéril foram sacrificados no mesmo tempo e condições dos animais infectados. Os órgãos foram retirados, acondicionados em tubos com salina estéril e encaminhados ao laboratório.

4.2. Processamento dos tecidos para culturas, análises histopatológicas e extrações de DNA

Os órgãos dos animais infectados e os do grupo controle foram fragmentados, com auxílio de bisturi, em câmara de biossegurança com fluxo laminar. Cada órgão foi dividido em três partes para a realização das análises.

4.2.1. Cultivos dos tecidos a fresco

Um dos fragmentos de tecido foi semeado em ágar Sabouraud dextrose (DIFCO) e as culturas foram mantidas por uma semana à temperatura ambiente. Após o desenvolvimento das colônias, foram observados seus aspectos macroscópicos e microscópicos para confirmar se os órgãos continham apenas o fungo inoculado.

4.2.2. Análises histopatológicas

Um segundo fragmento foi enviado, em frascos contendo formalina 10% tamponada, ao Laboratório de Histotécnica do Departamento de Patologia da FMUSP, para as análises histopatológicas. Neste serviço, os fragmentos de tecido foram emblocados em parafina e, em seguida, cortes de 3-5 µm foram obtidos para a realização das colorações de hematoxilina-eosina (HE) e coloração pela prata (Gomori-Grocott). As lâminas foram examinadas em microscopia ótica (Zeiss Axiophot) para a visualização das estruturas fúngicas presentes nos tecidos, bem como para a observação das alterações morfológicas teciduais, e as imagens foram capturadas pelo programa Axiovision 4.7.2. Os blocos parafinados foram posteriormente encaminhados ao Laboratório de Micologia Médica do IMT-USP, e mantidos em geladeira (4°C) até o processamento para a extração do material genômico.

4.2.3. Extração de DNA dos tecidos a fresco e parafinados

O terceiro fragmento foi acondicionado em microtubos de 1,5 ml, e estes foram mantidos a -20°C, até o momento das extrações.

As extrações de DNA dos tecidos a fresco foram realizadas seguindo protocolo descrito previamente por Cavalcanti (2010), com algumas modificações. Inicialmente, os fragmentos foram cortados com auxílio de bisturi, e acondicionados em tubos de 1,5 ml. Foram adicionados 600 µl de solução tampão TRIS 50 mM + EDTA 10 mM; em seguida, foram adicionados 250 U/ml de liticase (L-2425, Sigma), 3 mg de enzima lítica de *Trichoderma harzianum* (L-1412, Sigma) e 2% de β-mercaptoetanol (Merck). A suspensão foi homogeneizada em agitador tipo vórtex e os tubos incubados a 37°C por um período de 2:30 horas. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 12 µl de SDS (Sigma) a 10% e 20 µl de proteinase K 20mg/ml (Sigma). Os tubos foram incubados à 65°C por 45 minutos para a lise nuclear e a digestão proteica. As amostras foram então centrifugadas à 12.000 rpm em centrífuga modelo 5804R (Eppendorf) a 4°C, por 10 minutos; o sobrenadante foi transferido a tubos limpos, onde foram adicionados 650 µl de isopropanol (Merck) para precipitação do DNA. Os tubos foram mantidos em freezer -20°C *overnight*, e no dia seguinte, as amostras foram centrifugadas à 13.500 rpm a 4°C por 20 minutos; o sobrenadante foi desprezado e ao pellet foram adicionados 500 µl de etanol (Merck) a 70%. Os tubos foram novamente centrifugados a 13.500 rpm, a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em banho seco (70°C) por 30 minutos, para total evaporação do etanol. Em seguida, foram adicionados 100 µl de solução tampão TRIS 50mM/EDTA 10mM, e as concentrações de DNA das amostras foram determinadas por espectrofotometria no equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) (Cavalcanti, 2010).

Para extração de DNA dos tecidos parafinados, três a quatro cortes de espessuras variadas foram obtidos com auxílio de lâmina de bisturi e acondicionados em tubos de 1,5 ml. Seguindo o protocolo de Gloghini *et al.* (2004) com algumas modificações, foi realizada a desparafinização dos materiais. Os tecidos parafinados foram submetidos a cinco incubações de 5 minutos com xilol (Merck) à temperatura ambiente, seguidas de cinco lavagens por 5 minutos com etanol absoluto (Merck) à temperatura ambiente. Após a retirada da parafina, as extrações de DNA foram realizadas com o mesmo protocolo previamente descrito para os tecidos a fresco.

4.3 Extração de DNA dos isolados de *A. fumigatus*, *R. arrhizus* e *F. solani*

As amostras de DNA extraídas dos fungos foram empregadas nos ensaios de PCR como controles positivos das reações. A partir das culturas dos fungos em ágar batata dextrose, duas alçadas foram retiradas e misturadas em 0,5 ml de água ultrapura. Os tubos foram vortexados e centrifugados para obtenção do *pellet* de células. Para as três classes de fungos, o protocolo de extração utilizado foi o mesmo descrito no **ítem 4.2.3.**

4.4. Clonagem dos fragmentos amplificados a partir de sequências gênicas de *A. fumigatus*, *R. arrhizus* e *F. solani*

Para a construção das curvas-padrão empregadas nos ensaios de qPCR, foram utilizados plasmídeos contendo fragmentos de sequências gênicas obtidos a partir de amplificações de amostras de DNA extraídas dos três grupos de fungos.

Foram clonados os fragmentos do gene da região mitocondrial de *A. fumigatus*, da região 18S DNAr de *R. arrhizus* e do gene da β -tubulina de *F. solani*. Os fragmentos foram obtidos em amplificações por PCR convencional. Para a inserção nos plasmídeos, os fragmentos amplificados foram previamente purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com as instruções do

fabricante.

4.4.1. Inserção dos fragmentos de DNA nos plasmídeos

Este procedimento foi realizado utilizando-se o *CloneJET PCR Cloning kit* (Thermo Scientific) e 10-15 ng dos amplificadores purificados, seguindo as etapas descritas pelo fabricante do kit.

4.4.2. Preparo das bactérias competentes

Inicialmente, uma colônia de *E. coli* DH5- α foi semeada em placa de Petri contendo meio LB [Luria-Bertani – Bacto-peptona (10 g/l), extrato de levedura (5 g/l) e NaCl (10 g/l), mantida *overnight* em estufa a 37°C e, após o crescimento, uma colônia foi coletada, com auxílio de alça descartável, e semeada em 10ml de meio LB líquido. A cultura permaneceu *overnight* sob agitação a 250 rpm a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, as bactérias foram semeadas em 200ml de meio LB, deixando por 2-2,30 horas sob agitação a 250 rpm a 37°C. Após esse período, foi realizada a determinação da concentração de células em suspensão, em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia-Biotech), em 600 nm de comprimento de onda, até atingir o valor de D.O. de 0,4. A suspensão foi distribuída em tubos tipo Falcon para centrifugação a 3000xg por 10 min a 4°C e, em seguida, os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados de células foram submetidos à lavagem com solução de CaCl₂ 0,1M. Os sobrenadantes foram descartados e 3,2 ml de CaCl₂ 0,1M contendo 15% de glicerol foram adicionados ao *pellet* de células. O material foi inicialmente congelado em N₂ líquido por alguns minutos e posteriormente mantido a -80°C, até o momento do uso.

4.4.3. Transformação das bactérias *E. coli*

Este procedimento foi realizado para possibilitar a inserção dos plasmídeos, contendo os insertos, na bactéria competente. Foram aplicados 10 μ l da solução contendo os plasmídeos (obtidos no **ítem 4.4.1**) em 140 μ l da suspensão de *E. coli*, e os

tubos foram incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado por 2 min a 42°C, e logo em seguida, mantido no gelo por 5 min. Na sequência, foram adicionados 800µl de meio LB, e os tubos foram mantidos por 1 hora sob agitação (250 rpm) a 37°C. Cinquenta microlitros da cultura foram adicionados a uma placa de Petri com meio LB com ampicilina (100 µg/ml), que foi mantida a 37°C *overnight*. Após 18-20 horas, foi coletada uma colônia da bactéria, semeada em tubo contendo 3,5 ml de meio LB com ampicilina, e mantido sob agitação (250 rpm) por 18-20 horas a 37°C.

4.4.4. Procedimento de extração dos plasmídeos

Para a extração dos plasmídeos contendo os insertos, foram transferidos 1,8ml da suspensão de bactérias para um microtubo de 2ml, e a suspensão foi submetida à centrifugação a 14.000 rpm, por 2 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet* de células foram acrescentados 300µl de uma solução de RNAase (Invitrogen) em TRIS/EDTA 50mM/10mM. Em seguida, foram adicionados 300 µl de tampão de lise contendo 200 mM NaOH e 1% SDS. Para a precipitação do DNA extraído (plasmídeo + inserto) foram adicionados 300 µl de acetato de potássio 3M pH 5,5 e, após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, foram adicionados ao *pellet* de DNA, 400 µl de isopropanol. A solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, sendo descartado o sobrenadante e, foram adicionados 400 µl de etanol a 70%. Após nova centrifugação, o *pellet* de DNA foi ressuspensão em 50 µl de H₂O ultrapura. Em seguida, a concentração de DNA foi determinada em Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). O valor da concentração de DNA foi utilizado para se calcular número de clones/ml.

4.4.5. Sequenciamentos dos clones

Para identificar a presença dos insertos nos plasmídeos, os clones foram submetidos aos ensaios de PCR, empregando-se os *primers* homólogos às seqüências do

vetor, próximas ao sítio de clonagem do vetor (*pJET1.2/blunt Cloning Vector*, Thermo Fisher), fornecidos pelo *CloneJET PCR Cloning kit* (Thermo Scientific). A amplificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, em termociclador Veriti. Os *amplicons* foram purificados com o kit *Illustra ExoProStar 1-STEP* (GE Healthcare) e submetidos às reações de sequenciamento no equipamento multiusuário ABI 3500 DNA Analyser (Thermo Scientific).

4.5. *Primers* empregados na técnica de PCR convencional (*semi-nested*) e na qPCR

Para verificar a qualidade das amostras de DNA extraídas dos diversos órgãos, ou seja, se as mesmas não estavam fragmentadas ou havia presença de inibidores de amplificação, *primers* que amplificam fragmento do gene que codifica a proteína β -actina de camundongo foram utilizados (**Tabela 1**) (Pahl *et al.*, 1999).

Os *primers* utilizados nas amplificações para a detecção dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* foram previamente descritos no estudo de Bialek *et al.* (2005) e estão descritos na **Tabela 1**. Os *primers* P2 e Asp2 são complementares às posições nucleotídicas 938-916 e 738-759, respectivamente, do DNA mitocondrial de *Aspergillus*, e os produtos da 2ª etapa da reação *semi-nested* com P1 e P2 têm 135 pares de base. Os *primers* ZM1 e ZM2 são complementares às posições nucleotídicas 711-730 e 1117-1096, respectivamente, da região 18S do DNA ribossomal dos mucoráceos. Os produtos amplificados pelos *primers* ZM1 e ZM3 na 2ª etapa da amplificação *semi-nested* têm 176 pares de base.

Para a qPCR foram empregados somente os *primers* P1/P2 e ZM1/ZM3 para a detecção e identificação de *Aspergillus* spp. (135 pb) e *Rhizopus* spp. (176 pb), respectivamente.

Tabela 2: Primers utilizados na PCR para amplificar β -actina de camundongo, e para a detecção de *Aspergillus* spp. e mucoráceos nos tecidos a fresco e parafinados

Alvo	Primers	Sequências
β -actina de camundongo	β -act-F	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'
	β -act-R	5'-GGATGCCACAGGATTCCATACCCA-3'
	ACT-F	5'-GACTGTTACTGAGCTGCGTT-3'
	ACT-R	5'-CTGTCGCCTTCACCGTTCC-3'
DNA mitocondrial <i>Aspergillus</i> spp.	P1	R-5'-GAAAGGTCAGGTGTTTCGAGTCAC-3'
	Asp2	R-5'-GGGAGTTCAAATCTCCCTTGGG-3'
	P2	F-5'-CTTTGGTTGCGGGTTTAGGGATT-3'
18S DNA ribossomal Mucoráceos	ZM1	F-5'-ATTACCATGAGCAAATCAGA-3'
	ZM2	R-5'-TCCGTCAATTCCTTTAAGTTTC-3'
	ZM3	R-5'-CAATCCAAGAATTCACCTCTAG-3'

F= Forward; R=Reverse

Para a detecção e identificação do gênero *Fusarium*, foram avaliados diversos *primers*, tanto encontrados na literatura, como delineados neste estudo, como mostra a **Tabela 2**. Isto porque na avaliação de especificidade, tanto na PCR semi-nested, como na qPCR, os resultados mostravam reatividade cruzada com amostras de DNA de *Aspergillus* spp. e mucoráceos. Portanto, novos *primers* foram sendo incluídos no estudo na tentativa de se obter amplificações totalmente específicas.

Tabela 2: *Primers* utilizados nas amplificações por PCR semi-nested e qPCR, para a detecção do gênero *Fusarium* nos tecidos a fresco e parafinados

<i>Primers</i>	Referencia	Região	Sequência	Amplicon
Fu28S-F Fu28S-R1 Fu28S-R2	Delineados no estudo	28S rRNA	F- 5' - TTGGTGGCCGTGAGTCGAT-3' R1- 5' - ACGCAGTGGARGTCTGCAA-3' R2- 5' - YCCYTCTCAYATACCCWCCGA-3'	392pb e 156pb
BtFu-F1 BtFu-R BtFu-F2	Delineados no estudo	β - tubulina	F1- 5' - GAGGTATATTGCCCCGAAGCC-3' R- 5' - GGCCATCATTCGGTCGGGGA-3' F2- 5' - GACGTCGTCCGCCGTGA-3'	383pb e 144pb
Fus-PCR-F Fus-PCR-R1 Fus-PCR-R2	Muraosa <i>et al.</i> , 2014 com modificações	28S rRNA	F- 5' -TGAAATCTGGCTCTCGGGCC-3' R1 - 5' -GTGGCGGACTGAGGTTTCGCGCA-3' R2 - 5' -GCTATCGGTCTCTGGCCGG-3'	474 pb e 222pb
P58SL-F P28SL-R	Hue <i>et al.</i> , 1999	28S rRNA	F- 5' - AGT ATT CTG GCG GGC ATG CCT GT-3' R- 5' - ACA AAT TAC AAC TCG GGC CCG AGA-3'	329 pb
Fu-RT-F Fu-RT-R	Gu <i>et al.</i> , 2014	28S rRNA	F- 5' -TGAGAGCCCCGTCTGGTT-3' R- 5' TGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGAC-3'	Não refere
FUSRT-F FUSRT-R	Delineados no estudo	28S rRNA	F- 5' - ATTTGAGCTGTTGCCGCTTCAC-3' R- 5' -ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA-3'	120 pb

pb = pares de base

4.6. Avaliação da especificidade dos *primers* por PCR convencional e qPCR

A avaliação da especificidade dos *primers* empregados no estudo foi realizada inicialmente nos ensaios de PCR semi-nested. Só foram avaliados pela qPCR aqueles *primers* que resultaram em amplificações específicas pela técnica semi-nested.

Para avaliação da especificidade dos *primers* do gênero *Aspergillus*, foram realizadas amplificações com amostras de DNA extraídas de isolados de *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizopus arrhizus*, *Lichtheimia* sp., *Mucor* sp, *Candida albicans*, *Nocardia* sp., *Sporothrix* sp., *Staphylococcus aureus* e amostras de DNA obtidas dos órgãos de camundongos não infectados.

Para verificar a especificidade dos *primers* dos mucoráceos, foram utilizadas amostras de DNA extraídas de isolados de *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Candida albicans*, *Nocardia* sp.,

Sporothrix sp., *S. aureus* e amostras de DNA obtidas dos órgãos de camundongos não infectados.

A especificidade dos *primers* de *Fusarium* foi avaliada com amostras de DNA extraídas de isolados de *Rhizopus arrhizus*, *Lichtheimia* sp., *Mucor* sp, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Candida albicans*, *Nocardia* sp., *Sporothrix* sp., *S. aureus* e amostras de DNA obtidas dos órgãos de camundongos não infectados.

Nos ensaios de qPCR, as avaliações de especificidade dos *primers* foram realizadas somente com amostras de DNA dos fungos *Aspergillus*, *Fusarium*, mucoráceos e DNA de camundongos não infectados para verificar possível reatividade cruzada entre os três grupos e DNA de camundongo.

4.7. Avaliação do limiar de detecção (LD) da PCR semi-nested e qPCR

A sensibilidade analítica da PCR semi-nested foi avaliada utilizando diluições seriadas de DNA extraídos dos fungos, misturadas com quantidades constantes de DNA de tecidos de camundongos não infectados (50 ng). O LD foi determinado a partir de 200 pg até atingir 20 fg de DNA. Entre os pontos 200 fg e 20 fg, foram preparadas diluições contendo 100 e 50 fg. O LD foi considerado como sendo a menor quantidade de DNA de cada fungo, na qual foi detectada banda de amplificação visível em gel de agarose, em três ensaios realizados em diferentes dias.

O mesmo procedimento foi realizado para a determinação do LD para qPCR, e para estes ensaios as diluições de DNA dos fungos foram misturadas a 20 ng de DNA de tecidos dos animais não infectados. O LD foi determinado a partir de 20 pg até atingir 2 fg de DNA, e os ensaios foram realizados em triplicata.

O limiar de detecção do ensaio também foi avaliado através das diluições, na razão 1:10, das soluções de plasmídeos (clones) previamente quantificados, partindo de 2×10^8 até 2×10^0 clones/ μ l. Nesta avaliação, as amplificações foram realizadas em

duplicata, em oito diferentes ensaios. O LD foi considerado como sendo a maior diluição capaz de evidenciar sinal de reação.

4.8. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por PCR semi-nested

Inicialmente, as amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco foram submetidas a amplificações, por PCR convencional, para o gene que codifica para a β -actina de camundongo, com os *primers* β -act-F e β -act-R (**Tabela 1**), resultando em amplificadores de 347 pares de base (Pahl *et al.*, 1999).

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras extraídas dos tecidos parafinados, utilizando-se os *primers* ACT-F e ACT-R (**Tabela 1**). Estes *primers* foram delineados neste estudo, a partir da sequência do gene de β -actina de camundongo, para a obtenção de um produto de amplificação de 212 pares de base, mais adequado para amostras de DNA obtidas de tecidos parafinados. As condições de amplificação para as duas PCR foram: desnaturação inicial de 4 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, e extensão final de 10 min a 72°C em termociclador Veriti (Applied Biosystems).

As amplificações específicas para a detecção de *Aspergillus* spp. e de mucoráceos nas amostras de DNA obtidas dos tecidos a fresco e parafinados, foram realizadas empregando-se o método de PCR semi-nested previamente descrito por Bialek *et al.* (2005). Na primeira etapa de amplificação, foram preparados 25 μ l de solução contendo tampão da enzima 1x (Invitrogen); 200 μ M de dNTP; 0,2 μ M dos *primers* P2 e Asp2 (para *Aspergillus* spp.), e ZM1 e ZM2 (para mucoráceos); 1,5 mM de $MgCl_2$; 1,25 unidades de enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA das amostras obtidas dos tecidos dos camundongos. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a

94°C, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min, com extensão final de 5 minutos à 72°C, em termociclador Veriti (Applied Biosystems).

Na segunda etapa de amplificação, foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima 1x (Invitrogen); 200 µM de dNTP; 0,2 µM dos *primers* P2 e P1 (*Aspergillus* spp.), e ZM1 e ZM3 (mucoráceos); 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 unidades de enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e foram adicionados 2 µl do produto da primeira amplificação, diluídos a 1:100. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min, com extensão final de 5 min à 72°C.

Para a detecção de *Fusarium* spp., foram realizadas amplificações empregando 4 pares de *primers* descritos na **Tabela 2** (Fu28S, BtFu, Fus-PCR e Fu58/28SL). Na primeira etapa de amplificação, foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima 1x (Invitrogen); 200 µM de dNTP; 0,2 µM dos *primers*; 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 unidades de enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA das amostras obtidas dos tecidos dos camundongos. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 58°C por 30 s, 72°C por 1 min, com extensão final de 5 minutos à 72°C.

Na segunda etapa de amplificação, foram preparados 25 µl de solução contendo tampão da enzima 1x (Invitrogen); 200 µM de dNTP; 0,2 µM dos *primers*; 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 unidades de enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e foram adicionados 2 µl do produto da primeira amplificação, diluídos a 1:100. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 56-60°C por 30 s, 72°C por 1 min, com extensão final de 5 min a 72°C.

Em todos os ensaios foram empregados controles negativos (água ultrapura e DNA de tecido dos animais não infectados) e controles positivos (DNA extraídos dos três grupos de fungos).

4.9. Detecção dos produtos amplificados por PCR semi-nested

A detecção dos amplificados foi realizada por eletroforese em géis de agarose (Invitrogen) a 2,5%, em cubas horizontais modelo H-58 (Biometra), com solução-tampão TRIS-ácido acético-EDTA pH 8,0. Os géis foram revelados com corante GelRed (Biotium), e os resultados registrados em sistema de foto-documentação (Uvitec).

4.10. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por qPCR

Para a detecção de *Aspergillus* spp. e mucoráceos, os *primers* utilizados nos ensaios de qPCR foram os mesmos empregados na 2ª etapa das amplificações por PCR semi-nested: P2/P1 (*Aspergillus*) resultando em amplicons de 135 pb, e ZM1/ZM3 (mucoráceos) com amplicons de 176 pb. Para a detecção de *Fusarium* spp. foram utilizados três *primers* descritos na **Tabela 2** (BtFu, FuRT e FUSRT).

As amplificações foram realizadas no equipamento *ABI StepOne Plus Real Time PCR system* (Applied Biosystems) empregando o reagente *Power SYBR Green PCR* (Thermo Fisher), 0,2 µM de cada *primer*, e 20 ng de DNA extraído das amostras de tecidos a fresco e parafinados, em placas de 96 orifícios.

Em todos os ensaios foram empregadas as curvas-padrão com os clones obtidos no **item 4.4**. Foram preparadas diluições dos clones a partir de 2×10^8 até atingir 2×10^0 clones/µl (curva com nove pontos). As curvas-padrão foram utilizadas para se determinar o LD dos ensaios de qPCR (**item 4.7**), e como controles positivos. Foram utilizados como controles negativos, água ultrapura em substituição ao DNA molde, e

amostras de DNA de tecidos de animais não infectados.

Para todos os ensaios de qPCR foi utilizado o mesmo programa de ciclagem, que consistiu em uma etapa de desnaturação inicial à 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 10 s, hibridização a 56°C por 20 s e extensão a 72°C por 30 s. Por fim, foi programada uma etapa para a formação da curva de dissociação (*melting curve*), de 50°C até 95°C, com incrementos de 0,3°C/s.

Amplificações foram consideradas positivas quando o sinal fluorescente, acima da linha de *threshold* (*Ct*), foi detectado até 40 ciclos de amplificação.

A inclinação (*slope*), R^2 e eficiência dos ensaios foram calculadas baseadas na regressão linear das curvas-padrão, sendo que esta última deve estar compreendida entre 90 e 110% (Bustin e Wittwer, 2017).

Os resultados obtidos nos ensaios foram analisados com o emprego do Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation). Valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variação foram calculados.

5. RESULTADOS

5.1. Modelo murino de aspergilose, mucormicose e fusariose disseminadas

Nos modelos de infecção por *A. fumigatus* e *F. solani*, após 3-5 dias das inoculações, os animais estavam visivelmente debilitados, apresentando piloereção, diminuição de apetite, cifose e diminuição na interação com o grupo de animais da gaiola. No modelo de mucormicose, os cinco animais foram a óbito em 48 horas.

5.1.1. Culturas dos tecidos a fresco

Para os dois animais que foram inoculados com *A. fumigatus* por via intranasal, as culturas foram positivas apenas nos fragmentos de tecido do pulmão (**Figura 1A**), enquanto que para os animais inoculados por via intravenosa, os fragmentos obtidos do pulmão, fígado e rins positivaram nas culturas (**Figura 1B**). O crescimento das colônias foi observado após três dias de incubação em estufa a 25°C, e essas mostravam aspecto aveludado, eram inicialmente brancas, tornando-se esverdeadas ao longo do tempo e com reverso branco, aspectos macroscópicos característicos de *A.fumigatus*.

Para o modelo de mucormicose, a infecção dos animais foi realizada por via intravenosa. Pulmão, fígado, rins, coração e cérebro foram analisados. Houve crescimento nas culturas obtidas de todos os órgãos dos cinco animais infectados, após dois dias de incubação nas mesmas condições do modelo anterior. As colônias do fungo cobriram rapidamente a superfície do ágar, com crescimento denso e algodinoso, inicialmente branco, tornando-se castanho amarelado com reverso branco, macroscopia característica de *R. arrhizus* (**Figura 1C**).

Na infecção por *F. solani*, os animais foram inoculados por via intravenosa, e os órgãos analisados foram pulmão, fígado, rins e coração. As culturas também positivaram em todos os órgãos dos cinco animais, com colônias de aspecto cotonoso,

brancas nos primeiros dias, logo se tornando ocre com reverso branco, características de *F. solani*. Os aspectos macroscópicos das culturas obtidas dos órgãos dos três modelos de infecção estão representados na **Figura 1**.

Figura 1 - Aspectos das culturas positivas obtidas dos tecidos a fresco dos órgãos dos camundongos infectados com: **A.** *A. fumigatus* por inoculação intranasal – pulmão (A1), fígado (A2) e rins (A3); **B.** *A. fumigatus* por inoculação intravenosa - pulmão (B1), fígado (B2) e rins (B3); **C-** *R. arrhizus* por inoculação intravenosa - coração (C1), pulmão (C2), fígado (C3), rins (C4) e cérebro (C5); **D.** *F. solani* por inoculação intravenosa – coração (D1), pulmão (D2), fígado (D3) e rins (D4).

As identificações dos fungos isolados dos órgãos infectados foram confirmadas por análises microscópicas, com a observação das estruturas fúngicas características de *A. fumigatus*, *R. arrhizus* e *F. solani* (resultados não mostrados).

As culturas dos órgãos obtidos dos camundongos não infectados (grupo controle) foram todas negativas.

5.1.2. Análises histopatológicas dos tecidos parafinados

Nos três modelos murinos houve a disseminação da infecção, exceto na infecção por *Aspergillus* por via intranasal, na qual os fungos só foram visualizados no pulmão, concordando com os resultados das culturas. Nos cortes obtidos dos três órgãos dos animais inoculados com salina estéril (controles negativos), as estruturas fúngicas estavam ausentes.

O modelo de infecção por *A. fumigatus* está representado na **Figura 2**. A micrografia do pulmão do animal inoculado por via intranasal exibiu presença de hifas invadindo o bronquíolo terminal, causando necrose bronquiolar e invasão de parênquima pulmonar adjacente (**Figura 2A**). Por via intravenosa, a análise histológica do pulmão demonstrou vaso septal com presença de hifas hialinas, apresentando angio-invasão, congestão septal e edema alveolar (**Figura 2B**). Na **Figura 2C** encontra-se representado um fragmento do fígado, demonstrando angio-invasão da veia centrolobular por hifas hialinas, com necrose isquêmica do parênquima hepático associada, e na **Figura 2D**, verifica-se em fragmento de rim, a presença de hifas não características, pauci-septadas, dilatadas e varicosas, em vaso intersticial peritubular, adjacente ao néfron.

Figura 2 - Cortes de tecidos de camundongos infectados com cepa de *A. fumigatus* ATCC 204305. **A.** Pulmão, inoculação intranasal (coloração H&E, x20); **B.** Pulmão, inoculação intravenosa (H&E, x20); **C.** Fígado (H&E, x10) e **D.** Rim, inoculação intravenosa (Gomori-Grocott, x40)

O modelo de infecção por *R. arrhizus* está representado na **Figura 3**. A micrografia do coração demonstra a presença de hifas curtas e alongadas, no sangue intraventricular e nos vasos intersticiais do miocárdio indicando fungemia (**Figuras 3A** e **3B**). Em **3B**, observa-se a presença de hifa irregular, pauci-septada, com ramificação em 90°. No pulmão, representado na **Figura 3C**, notam-se vasos septais, com angio-invasão por hifas hialinas delgadas, congestão septal e edema alveolar. Na **Figura 3D**, está representado o pulmão em um feixe bronco-vascular, onde notam-se trombos micóticos em vasos arteriais, com angio-invasão e hifa com ramificação em 90°, invadindo o parênquima adjacente. Na **Figura 3E**, observa-se o rim, com angio-invasão de capilares glomerulares por hifas hialinas em fita, ou curtas e irregulares. A **Figura 3F** demonstra o fígado, com invasão de sinusóides por hifas hialinas dilatadas, pauci-

septadas e irregulares, associada à necrose isquêmica do parênquima. O córtex cerebral está representado na **Figura 3G**, onde se observa trombo micótico por hifas hialinas, pauci-septadas e irregulares, em vaso cortical, com discreta hemorragia perivascular. Notam-se neurônios com alteração eosinofílica, denotando isquemia cerebral. Na **Figura 3H**, o coração exibe numerosas hifas características de mucoráceos: irregulares em fita, pauci-septadas, com ramificações em 90°, curtas ou fragmentadas. Nota-se hifa varicosa, irregular com ramificação em 45°.

Figura 3 - Camundongos infectados com cepa de *R. arrhizus* CBS 11207, por via intravenosa. **A e B.** Coração (coloração H&E, A x10; B x40); **C.** Pulmão (H&E, x10); **D.** Pulmão (H&E, x40); **E.** Rim (H&E, x40); **F.** Fígado (H&E, x40); **G.** Córtex cerebral, (H&E, x40); **H.** Coração (Gomori-Grocott, x40).

Na **Figura 4** estão representados os cortes de tecidos obtidos após infecção dos camundongos por *F. solani*. O pulmão demonstra um vaso septal, com presença de hifas hialinas delgadas, causando angio-invasão, congestão septal e edema alveolar (**Figura 4A**). Uma hifa invasiva característica de *F. solani*, alongada, estreita, com septações pouco regulares, em vaso intersticial está demonstrada na **Figura 4B**. Na **Figura 4C**, o fígado é apresentado com angio-invasão de veia centrolobular por hifas hialinas, estreitas, com necrose isquêmica do parênquima hepático associada. Por fim, a **Figura 4D**, exibe um rim com hifas hialinas, não características, varicosas, irregulares, curtas em vasos venosos intersticiais e peritubulares.

Figura 4 - Camundongos infectados com cepa de *F. solani* ATCC 36031, por via intravenosa. **A.** Pulmão (coloração H&E, x40); **B.** Coração (Gomori-Grocott, x40); **C.** Fígado (H&E, x20); **D.** Rim (Gomori-Grocott, x40).

5.2. Clonagem dos fragmentos amplificados a partir de sequências gênicas de *A. fumigatus*, *R. arrhizus* e *F. solani*

Após o sequenciamento, observou-se que em alguns plasmídeos, os fragmentos amplificados estavam inseridos de modo invertido, e os mesmos foram então descartados. Ao final, foram considerados aptos para utilização nos ensaios de qPCR, três clones recombinantes contendo o fragmento de 135 pb de *Aspergillus* spp., dois clones contendo o fragmento de 176 pb dos mucoráceos e três clones de *Fusarium* spp. com o fragmento de 383 pb (da sequência do gene da β -tubulina).

5.3. Avaliação da especificidade das amplificações por PCR semi-nested, com os *primers* para *Aspergillus* spp., mucoráceos e *Fusarium* spp.

Não houve amplificação de amostras de DNA extraídas de isolados de fungos heterólogos, bactérias e amostras obtidas dos órgãos de camundongos não infectados, nos ensaios de PCR semi-nested com os *primers* de *Aspergillus* spp. e mucoráceos descritos por Bialek *et al.* (2005) (**Figura 5A e B**).

Figura 5 – Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 2º round de amplificação da PCR semi-nested, para avaliação da especificidade.

Em **A.** PCR com *primers* P1 e P2 (*Aspergillus* spp.). M = marcador de peso molecular (PM) de 100 pares de base (pb) (Fermentas); 1-Controle negativo da reação; 2-*F. solani*; 3-*F. oxysporum*; 4-*F. moniliforme*; 5-*R. arrhizus*; 6-*Lichtheimia* sp.; 7-*A. fumigatus*; 8- *Mucor* sp; 9- *C. albicans*; 10- *Nocardia* sp.; 11- *Sporothrix* sp. 12-*S. aureus*, 13- DNA de camundongo não infectado; 14- *A. flavus*.

Em **B.** PCR com *primers* ZM1 e ZM3 (Mucoráceos). M = marcador de PM de 100 pb (Fermentas); 1- Controle negativo da reação; 2- *F.solani*; 3- *F.oxysporum*; 4- *F. moniliforme*; 5- *A. fumigatus*; 6- *R. arrhizus*; 7- *Lichtheimia* sp.; 8- *A. flavus*; 9 – *C. albicans*; 10- *Nocardia* sp.; 11- *Sporothrix* sp. 12- *S. aureus*; 13-DNA camundongo não infectado; 14- *Mucor* sp.

Por outro lado, os ensaios de PCR semi-nested realizados com os *primers* descritos na **Tabela 2**: Fu28S, BtFu, Fus-PCR e Fu58/28SL, apresentaram reatividade cruzada com amostras de DNA de fungos heterólogos, conforme demonstrado na

Tabela 3.

Tabela 3. Reatividade cruzada dos *primers* de *Fusarium* spp. empregados nos ensaios de PCR convencional

<i>Primers</i>	Ensaio de PCR	Reatividade cruzada com amostras de DNA de
Fu28S-F Fu28S-R1 Fu28S-R2	Semi-nested	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> Mucorales
BtFu-F1 BtFu-F2 BtFu-R	Semi-nested	Mucorales
Fus-PCR-F Fus-PCR-R1 Fus-PCR-R2	Semi-nested	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> Mucorales
P58SL-F P58SL-R	One round	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> Mucorales

5.4. Avaliação da especificidade das amplificações por qPCR com os primers de *Aspergillus* spp., mucoráceos e *Fusarium* spp.

Quando amostras de DNA dos fungos heterólogos e de camundongos não infectados foram submetidas às amplificações com os primers de *Aspergillus* spp. (P2/P1) e de mucoráceos (ZM1/ZM3), não houve ocorrência de reatividade cruzada (entre os fungos) ou amplificações inespecíficas, como pode ser observado nas **Figuras 6 e 7**.

Figura 6 – **A.** Curvas de amplificação da qPCR com primers de *Aspergillus* spp. (P2/P1); **B.** Curvas de dissociação do ensaio de qPCR realizado com o par de primers P2/P1 ($75^{\circ}\text{C} \pm 0,1$). **Em amarelo** - Diluição seriada do clone contendo o fragmento de 135 pb de *A.fumigatus* (controle positivo); **Em azul claro**- Água estéril (C neg); **Em azul escuro** – Amostra de DNA de *R. arrhizus* (Rh) e de *F. solani* (Fus), e amostras de DNA de camundongo não infectado (Cam).

Figura 7 – A. Curvas de amplificação da qPCR com *primers* de mucoráceos (ZM1/ZM3); **B.** Curvas de dissociação do ensaio de qPCR realizado com o par de *primers* ZM1/ZM3 ($76^{\circ}\text{C} \pm 0,1$) **Em vermelho** - Diluição seriada do clone contendo o fragmento de 176 pb de *R. arrhizus* (controle positivo); **Em cinza**- Água estéril (C neg); **Em azul escuro** – Amostra de DNA de *F. solani* (Fus); **Em verde**- Amostra de DNA de *A. fumigatus* (Asp); **Em azul claro**- Amostra de DNA de camundongo não infectado (Cam).

Em relação às amplificações para detecção de *Fusarium* spp., foram avaliados seis diferentes *primers*, conforme descrito no **ítem 4.5**. Para os *primers*, Fu28S, Fus-PCR, Fu58/28SL, Fu-RT e FUSRT, foi observada reatividade cruzada com amostras de DNA de *A. fumigatus* e *R. arrhizus* (dados não mostrados). Os *primers* BtFu-F2/R, que amplificavam uma sequência de 144 pb (**Tabela 3**), resultaram em reatividade cruzada com *R. arrhizus*, e a curva de dissociação apresentou temperatura *melting* de $0,4^{\circ}\text{C}$, impossibilitando diferenciação dos dois gêneros. Novos ensaios de qPCR foram realizados com os *primers* BtFu-F1/R, cujo amplicon era de 383 pb, para verificar se as amplificações se tornariam mais específicas. Com estes *primers*, as amplificações não produziram sinal com amostra de DNA de *A. fumigatus*, mas foram positivas com DNA de *R. arrhizus*, apesar de ter sido possível diferenciar as temperaturas das curvas de dissociação (**Figura 8A e B**).

Figura 8 - A. Curvas de amplificação da qPCR com *primers* de *Fusarium* (BtFu-F1/R). **Em verde** - Diluição seriada do clone contendo o fragmento de 383 pb de *F. solani* (controle positivo); **Em azul** - Amostra de DNA de *R. arrhizus* (Rhi); **Em vermelho** - Amostra de DNA de *A. fumigatus* (Asp); **Em amarelo** - Amostra de DNA de camundongo não infectado (Cam). **B.** Curvas de dissociação do ensaio de qPCR realizado com o par de *primers* BtFu-F1/R com DNA de *F. solani* ($90^{\circ}\text{C} \pm 0,1$) e *R. arrhizus* ($77^{\circ}\text{C} \pm 0,1$).

5.5. Avaliação do limiar de detecção (LD) da PCR semi-nested e qPCR

Para a PCR semi-nested, o LD observado foi de 50 fg de DNA de *Aspergillus* e mucoráceos, nos três ensaios repetidos em dias diferentes (**Figura 9A e B**). Para determinação do LD para *F. solani*, foi selecionado o par de *primers* BtFu, entretanto a visualização de banda de amplificação foi possível até 2 pg de DNA, no 2º round de amplificação (**Figura 9C**).

Figura 9- Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 1º e 2º rounds da PCR semi-nested com diluições de DNA de *A. fumigatus*, *R. arrhizus* e *F. solani* para avaliação do limiar de detecção.

A – *A. fumigatus* – 1ª PCR - Primers Asp2/P2 e 2ª PCR - Primers P2/P1

B – *R. arrhizus* – 1ª PCR - Primers ZM1/ZM2 e 2ª PCR - Primers ZM1/ZM3

C – *F. solani* – 1ª PCR – Primers Bt-Fu-F1/Bt-Fu-R e 2ª PCR – Primers Bt-Fu-F2/Bt-Fu-R

M = marcador de PM de 100 pb (Fermentas); **1 e 8**- 200 pg; **2 e 9**- 20 pg; **3 e 10**- 2 pg; **4 e 11**- 200 fg; **5 e 12**- 100 fg; **6 e 13**- 50 fg; **7 e 14**- 20 fg;

Na qPCR, foi detectado sinal até 20fg/μl de DNA de *A. fumigatus* e *R. arrhizus*, enquanto que para *F. solani*, o LD também foi de 2pg/μl nos três ensaios realizados em dias diferentes, como demonstrado nas **Figuras 10, 11 e 12**.

Figura 10 - Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com *primers* P2/P1 e diluições seriadas na razão 1:10 do DNA de *A. fumigatus*. **Em amarelo**- Curva-padrão (controle positivo); **Em azul** – Diluições do DNA de 20pg a 2fg.

Figura 11 - Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com *primers* ZM1/ZM3 e diluições seriadas na razão 1:10 do DNA de *R. arrhizus*. **Em azul**- Curva-padrão (controle positivo); **Em preto** – Diluições do DNA de 20pg a 2fg.

Figura 12 - Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com *primers* BtFu-F1/BtFu-R e diluições seriadas na razão 1:10 do DNA de *F. solani*. **Em preto**- Curva-padrão (controle positivo); **Em azul** – Diluições do DNA de 200pg a 200fg.

O LD determinado pelas diluições seriadas dos plasmídeos foi de 2×10^2 plasmídeos/ μl em 100% dos ensaios de qPCR para *Aspergillus* (**Figura 13**), sendo que em 70% dos ensaios realizados, houve detecção de sinal para 2×10^1 plasmídeos/ μl . O LD determinado nos ensaios de qPCR para mucoráceos também foi de 2×10^2 plasmídeos/ μl , nos oito diferentes ensaios realizados (**Figura 14**), com 45% das vezes atingindo 2×10^1 plasmídeos/ μl .

Figura 13. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com *primers* P2/P1 e diluições seriadas na razão 1:10 dos plasmídeos recombinantes de *A. fumigatus*, de 2×10^8 a 2×10^0 plasmídeos/ μl .

Figura 14. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com *primers* Zm1/ZM3 e diluições seriadas na razão 1:10 dos plasmídeos recombinantes de *R. arrhizus*, de 2×10^8 a 2×10^0 plasmídeos/ μl .

Para os ensaios de qPCR de *Fusarium* spp., o LD foi avaliado com os *primers* BtFu-F1/R somente com os plasmídeos recombinantes, resultando em detecção de sinal

para 2×10^2 plasmídeos/ μl em 100% dos cinco ensaios realizados sendo que em 20% dos ensaios realizados, houve detecção de sinal para 2×10^1 plasmídeos/ μl (**Figura 15**).

Figura 15. Limiar de detecção (LD) do ensaio de qPCR com *primers* BtFu-F1/R e diluições seriadas na razão 1:10 dos plasmídeos recombinantes de *F. solani*, de 2×10^8 a 2×10^0 plasmídeos/ μl .

5.6. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por PCR semi-nested

Inicialmente, as amostras de DNA obtidas dos órgãos infectados dos três grupos de animais, bem como as amostras de DNA dos tecidos dos camundongos do grupo controle, foram amplificadas com os *primers* do gene de β -actina. Tanto as amostras obtidas dos tecidos a fresco, como os parafinados, resultaram em amplificadas específicos, confirmando a integridade do material genômico e ausência de inibidores de PCR (dados não mostrados).

Após verificação da especificidade e sensibilidade analítica (LD) das amplificações com os *primers* de *Aspergillus* spp. e mucoráceos, os ensaios de PCR semi-nested foram aplicados às amostras de DNA extraídas dos tecidos dos animais infectados e do grupo controle. Para o modelo de aspergilose, utilizando-se a inoculação dos fungos por via intranasal, observou-se que as amplificações foram positivas apenas nos tecidos obtidos do pulmão, concordando com os resultados das culturas. Todas as

amostras de DNA obtidas dos tecidos a fresco e parafinados no mesmo modelo, com inoculação intravenosa, amplificaram com os *primers* P1/P2 (**Figura 16 A e B**).

Figura 16 – Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 2º *round* de amplificação com amostras de DNA extraídas dos tecidos infectados a fresco e parafinados com *primers* P1/P2 de *Aspergillus* spp.

Em **A** – tecidos a fresco

Em **B** – tecidos parafinados

M = marcador de PM 100 pb (Fermentas); 1-Controle negativo da reação; 2- Pulmão (i.v.); 3- Fígado (i.v.); 4-Rim (i.v.); 5- Pulmão (i.v.); 6- Fígado (i.v.); 7-Rim (i.v.); 8- Pulmão (i.n.); 9- Fígado (i.n.); 10- Rim (i.n.); 11- Pulmão (i.n.); 12- Fígado (i.n.); 13- Rim (i.n.); 14- DNA de *A. fumigatus* (controle positivo).

i.v. = intravenoso; i.n.=intranasal

As amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados, obtidos de coração, pulmão, fígado, rins e cérebro do modelo experimental de mucormicose foram positivas, conforme se observa na **Figura 17 A e B**.

Figura 17 – Géis de agarose a 2,5% mostrando as amplificações obtidas no 2º round de amplificação com amostras de DNA extraídas dos tecidos infectados a fresco e parafinados com *primers* ZM1/ZM3 de mucoráceos.

Em **A** – tecidos a fresco - M = marcador de PM 100 pb (Fermentas); 1- Controle negativo da reação; 2- DNA de *R. arrhizus* (controle positivo); 3 e 4- Pulmões; 5 e 6- Fígados; 7 e 8- Rins; 9 e 10- Corações; 11 e 12- Cérebros

Em **B** – tecidos parafinados M = marcador de PM 100 pb (Fermentas); 1- Controle negativo da reação; 2- DNA de *R. arrhizus* (controle positivo); 3 a 6- Pulmões; 7 e 8- Fígados; 9 e 10- Rins; 11 e 12- Corações; 13 e 14- Cérebros

Os ensaios de PCR *semi-nested* com as amostras de DNA extraídas dos tecidos obtidos dos animais infectados com *F.solani*, resultaram em amplificações inespecíficas para a maior parte das amostras (dados não mostrados).

As amostras de DNA obtidas dos tecidos parafinados e dos camundongos não infectados não foram amplificadas.

5.7. Amplificações das amostras de DNA extraídas dos tecidos a fresco e parafinados por qPCR

Os valores de inclinação (*slope*), R^2 e eficiência dos ensaios foram calculados, baseados na regressão linear das curvas-padrão, construídas a partir das diluições (razão 1:10) dos três conjuntos de clones recombinantes. Os valores estão descritos na **Tabela 4** e nas **Figuras 18, 19 e 20**.

Tabela 4 – Valores de inclinação (*slope*), R^2 e eficiência das curvas-padrão dos ensaios de qPCR para os três grupos de fungos

	<i>Aspergillus spp.</i>	Mucoráceos	<i>Fusarium spp.</i>
<i>Slope</i> (média* $\pm$ DP)	$-3,44 \pm 0,18$	$-3,56 \pm 0,15$	$-3,60 \pm 2,78$
R^2 (média* $\pm$ DP)	$0,994 \pm 0,004$	$0,995 \pm 0,004$	$1,00 \pm 0,002$
Eficiência (%)	95,65	90,87	89,69

* Média calculada a partir de oito ensaios executados em dias diferentes, exceto para *Fusarium* (média de cinco ensaios)

Diluições dos clones	C_t (média)		DP	CV
2×10^8	9,45	$\pm$	0,39	4,10
2×10^7	13,14	$\pm$	0,40	3,03
2×10^6	16,95	$\pm$	0,46	2,74
2×10^5	20,33	$\pm$	0,47	2,31
2×10^4	23,95	$\pm$	0,57	2,39
2×10^3	27,68	$\pm$	0,47	1,70
2×10^2	31,61	$\pm$	0,97	3,06
2×10^1	33,44	$\pm$	0,60	1,78

C_t =threshold cycle; DP=desvio padrão;
CV=coeficiente de variação

Figura 18. Diagrama mostrando a inclinação (*slope*) da curva-padrão construída em um ensaio de qPCR para detecção de *Aspergillus* em tecidos, e os valores dos C_t obtidos em cada uma das diluições (média de oito ensaios)

Diluições dos clones	C_t (média)		DP	CV
2×10^8	9,23	$\pm$	0,45	4,83
2×10^7	12,92	$\pm$	0,43	3,32
2×10^6	16,61	$\pm$	0,83	4,99
2×10^5	20,31	$\pm$	0,68	3,37
2×10^4	23,87	$\pm$	0,65	2,73
2×10^3	27,64	$\pm$	0,85	3,07
2×10^2	31,58	$\pm$	0,95	3,01
2×10^1	33,89	$\pm$	1,80	5,32

C_t =threshold cycle; DP=desvio padrão;
CV=coeficiente de variação

Figura 19. Diagrama mostrando a inclinação (*slope*) da curva-padrão construída em um ensaio de qPCR para detecção de mucoráceos em tecidos, e os valores dos C_t obtidos em cada uma das diluições (média de oito ensaios)

Figura 20. Diagrama mostrando a inclinação (*slope*) da curva-padrão construída em um ensaio de qPCR para detecção de *Fusarium* em tecidos, e os valores dos Ct obtidos em cada uma das diluições (média de cinco ensaios)

Os resultados da detecção de DNA de cada grupo de fungos nas amostras extraídas dos tecidos a fresco e parafinados dos camundongos infectados, estão descritos nas **Figuras 21 a 26 (A e B)**. Os valores de Ct das amostras de tecido a fresco e parafinados de cada órgão dos animais infectados estão demonstrados nas **Tabelas 5, 6 e 7**.

Somente as amostras de DNA obtidas dos tecidos de pulmão, dos animais infectados com *A. fumigatus* por via intranasal amplificaram, enquanto que foi detectado sinal nas amostras de todos os tecidos dos animais infectados por via intravenosa. Foram realizados três ensaios de qPCR em dias diferentes, para calcular a média dos resultados de Ct. Na curva de dissociação de cada amostra, a temperatura variou no máximo 0,2°C (**Figuras 21 e 22; Tabela 5**).

Figura 21 - A – Curvas de amplificação dos tecidos a fresco; **B** - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos a fresco. **Em preto** – Curva-padrão dos plasmídeos diluídos (controle positivo); **Em laranja** – Amostras de DNA dos tecidos a fresco dos camundongos infectados com *A.fumigatus*

Figura 22 – A - Curvas de amplificação dos tecidos parafinados; **B** - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos parafinados. **Em preto** – Curva-padrão dos plasmídeos diluídos (controle positivo); **Em azul** – Amostras de DNA dos tecidos parafinados dos camundongos infectados com *A.fumigatus*

Tabela 5. Valores de C_t (média) dos tecidos a fresco e parafinados dos órgãos dos cinco animais infectados com *A. fumigatus* por inoculação intravenosa

	Tecido	Média $C_t \pm$ DP	CV	Média da temperatura da CD ($^{\circ}\text{C}$)
Pulmão	A fresco	$24,5 \pm 1,5$	6,16	75,63
	Parafinado	$24,4 \pm 1,6$	5,18	75,66
Fígado	A fresco	$24,3 \pm 0,6$	2,38	75,45
	Parafinado	$24,5 \pm 0,9$	3,72	75,60
Rim	A fresco	$24,9 \pm 4,1$	6,54	75,53
	Parafinado	$24,7 \pm 4,2$	6,86	75,55

C_t = threshold cycle; DP=desvio padrão; CV= coeficiente de variação;
CD=curva de dissociação

Corroborando com os resultados da PCR semi-nested, todas as amostras de tecido a fresco e parafinados dos animais infectados por via intravenosa com *R. arrhizus*, foram positivos nos três ensaios de qPCR realizados. A temperatura da curva de dissociação de cada amostra variou no máximo $0,2^{\circ}\text{C}$ (**Figuras 23 e 24; Tabela 6**).

Figura 23 – **A** - Curvas de amplificação de DNA dos tecidos a fresco; **B** - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos a fresco. **Em azul** – Curva-padrão dos plasmídeos diluídos (controle positivo); **Em laranja** – Amostras de DNA dos tecidos a fresco dos camundongos infectados com *R. arrhizus*

Figura 24 - A – Curvas de amplificação de DNA os tecidos parafinados; **B** - curvas de dissociação de DNA dos tecidos parafinados. **Em azul** – Curva-padrão dos plasmídeos diluídos (controle positivo); **Em amarelo** – Amostras de DNA dos tecidos parafinados dos camundongos infectados com *R. arrhizus*

Tabela 6. Valores de *Ct* (média) dos tecidos a fresco e parafinados dos órgãos dos cinco animais infectados com *R. arrhizus* por inoculação intravenosa

	Tecido	Média <i>Ct</i> ± DP	CV	Média temperatura da CD (°C)
Pulmão	A fresco	19,4 ± 1,9	9,93	76,09
	Parafinado	23,4 ± 1,8	7,73	76,00
Fígado	A fresco	26,1 ± 2,4	9,40	76,05
	Parafinado	31,7 ± 3,9	12,40	76,12
Rim	A fresco	23,5 ± 1,7	7,05	76,16
	Parafinado	28,2 ± 1,1	4,03	75,91
Cérebro	A fresco	25,8 ± 2,1	7,93	76,13
	Parafinado	29,9 ± 1,0	3,40	76, 59
Coração	A fresco	22,3 ± 2,2	9,93	76,06
	Parafinado	25,2 ± 1,8	7,04	76,38

Ct= threshold cycle; DP=desvio padrão; CV= coeficiente de variação;
CD=curva de dissociação

Somente as amostras de DNA obtidas dos tecidos a fresco obtidos dos animais infectados com *F. solani*, amplificaram nos ensaios de qPCR realizados com os *primers* Bt-Fu, enquanto que não houve detecção de sinal para as amostras de DNA obtidas dos tecidos parafinados. A possível explicação para este resultado é que a fragmentação do ácido nucleico no tecido, após fixação com formaldeído, impede a amplificação do mesmo com *primers* que resultem em *amplicons* de tamanho maior (383 pb). Na curva de dissociação de cada amostra, a temperatura variou no máximo 0,2°C (**Figuras 25 e 26; Tabela 7**).

Figura 25 - A – Curvas de amplificação de DNA dos tecidos a fresco; B - Curvas de dissociação de DNA dos tecidos a fresco. **Em preto** – Curva-padrão dos plasmídeos diluídos (controle positivo); **Em verde** – Amostras de DNA dos tecidos a fresco dos camundongos infectados com *F. solani*

Figura 26 - Curvas de amplificação de DNA dos tecidos parafinados. **Em preto** – Curva-padrão dos plasmídeos diluídos (controle positivo); **Em vermelho** – Amostras de DNA dos tecidos parafinados dos camundongos infectados com *F. solani*

Tabela 7. Valores de *Ct* (média) dos tecidos a fresco dos órgãos dos cinco animais infectados com *F. solani* por inoculação intravenosa

Tecido a fresco	Média <i>Ct</i> ± DP	CV	Média da temperatura da CD (°C)
Pulmão	27,6 ± 1,9	7,04	90,09
Fígado	33,0 ± 1,1	3,21	90,19
Rim	29,1 ± 1,9	4,22	90,12
Coração	32,1 ± 0,8	2,40	90,21

Ct= threshold cycle; DP=desvio padrão; CV= coeficiente de variação; CD=curva de dissociação

6. DISCUSSÃO

Aspergilose, fusariose e mucormicose são enfermidades que se tornaram cada vez mais frequentes nos últimos anos, particularmente em pacientes imunocomprometidos, e o diagnóstico clínico e laboratorial ainda representa um desafio. A correta identificação desses fungos filamentosos é atingida em apenas cerca de 50% dos indivíduos afetados, o que prejudica o tratamento antifúngico adequado (Rickerts, 2016).

Diante das limitações dos exames diretos e culturas nas amostras clínicas, a análise histopatológica é considerada um método laboratorial eficiente para um diagnóstico presuntivo ou mesmo definitivo da infecção fúngica invasiva (Guarner e Brandt, 2011). A detecção de fungos em amostras de tecido na maior parte das vezes representa que a infecção é invasiva. O que contrasta com amostras do tipo lavado bronco-alveolar, onde a colonização por fungos pode ser um achado frequente em pacientes, reduzindo a especificidade dos testes diagnósticos (Rickerts, 2016).

Entretanto, o patologista muitas vezes se depara com biópsias em que o tecido está necrosado, ou apresenta poucas hifas e/ou hifas muito fragmentadas, dificultando a distinção entre os agentes dessas infecções. Além disso, discrepâncias entre os resultados das culturas e das análises histológicas ocorrem em cerca de 20% dos casos, o que demonstra a necessidade de se desenvolver estratégias alternativas para a identificação correta dos patógenos (Hata *et al.*, 2008; Buitrago *et al.*, 2014; Rickerts, 2016).

Se por um lado há dificuldade na diferenciação dos patógenos, na maior parte dos casos a identificação em nível de espécie não é requisito necessário para determinar a terapia antifúngica correta. Em geral, para o clínico é suficiente distinguir se a

infecção é causada por *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. ou fungos da ordem Mucorales, entre outros fungos patogênicos (Hata *et al.*, 2008; Gade *et al.*, 2017).

Os métodos moleculares são potencialmente úteis para a detecção e identificação de fungos filamentosos, apesar da falta de padronização quanto ao tipo de amostra clínica, seleção dos *primers* (panfúngicos, gênero-específicos ou espécie-específicos) e tipos de PCR (Salehi *et al.*, 2016). Técnicas como hibridização *in situ*, PCR convencional e sequenciamento dos ácidos nucleicos apresentam a limitação de fornecer resultados em tempo relativamente longo, além da complexidade de execução. Deste modo, a aplicação da PCR em tempo real (qPCR) é atrativa como escolha para o diagnóstico clínico, não somente por fornecer os resultados em menor tempo, mas também por ser técnica com sensibilidade elevada e de “sistema fechado”, o que minimiza possíveis contaminações externas (Salehi *et al.*, 2016).

Considerando esses aspectos, o presente estudo propôs avaliar o ensaio da qPCR na detecção e identificação dos três grupos de fungos – *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e fungos da ordem Mucorales, em tecidos a fresco e parafinados, com o intuito de contribuir para a melhoria no diagnóstico dessas infecções, particularmente nos casos em que as análises histológicas e/ou as culturas não definem o agente etiológico com precisão.

A escolha de se utilizar modelo experimental murino para reproduzir as três infecções disseminadas, se deu pela dificuldade de reunir biópsias de casos humanos confirmados de aspergilose, fusariose e mucormicose, em número suficiente para se avaliar uma técnica molecular até então inédita no Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) do HC-FMUSP e IMT-USP. Essa primeira avaliação da eficiência da qPCR na detecção e diferenciação dos agentes, deveria ser realizada em tecidos verdadeiramente infectados e com quantidade suficiente de amostras, para ser

posteriormente validada e aplicada em amostras de tecido de pacientes com suspeita da infecção.

Os modelos murinos desenvolvidos no estudo resultaram em disseminação dos três agentes aos diversos órgãos dos animais, possibilitando a utilização de tecidos provenientes de pulmão, rins, fígado, coração e cérebro para as análises laboratoriais. Nos modelos de aspergilose e fusariose, os animais foram sacrificados após 3-5 dias das inoculações, enquanto que no modelo de mucormicose os cinco animais foram a óbito em 48 horas. Apesar do óbito precoce, houve disseminação do agente, e as hifas de *R. arrhizus* foram observadas em todos os órgãos retirados dos animais (**Figura 3**). Deste modo, foi possível obter material em quantidade suficiente para a realização dos ensaios de PCR, bem como a diversidade de tecidos (rim, fígado, pulmão, cérebro, coração) necessária para se avaliar se a técnica de extração de DNA utilizada no estudo seria eficiente em tecidos diferentes, tanto a fresco como parafinados.

Utilizando tecidos parafinados obtidos de infecção em modelo experimental de mucormicose invasiva, Dannaoui *et al.* (2010) avaliaram a reprodutibilidade interlaboratorial do ensaio de PCR convencional, para detectar cinco diferentes mucoráceos (*Rhizopus oryzae*, *R. microsporus*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus* e *Mucor circinelloides*). O estudo colaborativo foi conduzido em sete diferentes laboratórios, para os quais foram enviados 1, 10 e 30 cortes a partir dos blocos parafinados. A positividade das amplificações foi de 93% quando 30 cortes foram utilizados na extração, 89% para 10 cortes e 27% quando apenas um corte foi utilizado. Os autores sugeriram que pelo menos 10 cortes do material parafinado devem ser utilizados para a extração de DNA. Seguindo a recomendação dos autores, para as extrações de DNA utilizamos pelo menos 10 fragmentos dos tecidos parafinados, com

espessura em torno de 20µm, tendo sido possível detectar e identificar os patógenos em 100% das amostras.

Uma etapa fundamental para atingir resultados precisos na detecção e identificação dos patógenos pelas técnicas de PCR é a extração de DNA das amostras clínicas. No nosso estudo, inicialmente as extrações, tanto dos tecidos a fresco como parafinados, foram realizadas empregando-se o *QIAmp DNA mini kit* (Qiagen), por ser o mais empregado nas publicações referentes ao uso da PCR para detecção de fungos em biópsias (Bialek *et al.*, 2005; Dannaoui *et al.*, 2010; Muñoz-Cadavid *et al.*, 2010; Buitrago *et al.*, 2013; Frickmann *et al.*, 2015; Drogari-Apiranthitou *et al.*, 2016).

Muñoz-Cadavid *et al.* (2010) avaliaram diversos protocolos de extração de DNA a partir de tecidos parafinados, incluindo *kits* comerciais, para obtenção de amostras adequadas para as reações de amplificação. Comparando alguns *kits* comerciais, concluíram que os da marca TaKaRa e Qiagen foram os que possibilitaram maior sensibilidade nas amplificações específicas para fungos. Ao contrário do observado pelos autores, em nosso estudo, o uso do *kit* comercial, mesmo seguindo rigorosamente as instruções do fabricante, resultou em amostras com baixas concentrações de DNA, particularmente para os tecidos parafinados (dados não mostrados). Deste modo, decidimos empregar o método *in house*, com utilização das enzimas *litase* (L-2425, SIGMA) e enzima *lítica* de *Trichoderma harzianum* (L-1412, SIGMA), já utilizado previamente em outros estudos do Laboratório de Micologia Médica do IMT-USP (Cavalcante *et al.*, 2007). As amostras extraídas apresentaram concentrações de DNA suficientes para os ensaios de amplificação, com pureza adequada (dados não mostrados). As condições de manipulação dos tecidos, durante os procedimentos de extração, foram adequadas e garantiram a negatividade dos controles das reações de PCR (amostras de DNA dos animais não infectados).

No DNAr dos fungos, existem três regiões codificadoras relativamente conservadas: a subunidade 18S, uma sequência altamente conservada de 5.8S, e a subunidade 28S. Flanqueando a região 5.8S, existem regiões de sequências variáveis, denominadas *interspace regions* (ITS), que mostram grande variabilidade entre microrganismos do mesmo grupo, podendo ser utilizadas para a identificação das espécies em testes moleculares. Outra vantagem da utilização de regiões gênicas do DNAr, é que estão presentes em múltiplas cópias no genoma do fungo (≥ 100 cópias/genoma), aumentando o poder de detecção dos métodos de amplificação (Lau *et al.*, 2007; Gade *et al.*, 2017).

Ensaio de PCR convencional panfúngico (*primers* da região ITS do DNAr) foi empregado por Lau *et al.* (2007), em tecidos a fresco e parafinados de pacientes com culturas positivas para fungos e/ou análises histológicas positivas. Os autores observaram maior positividade para tecidos a fresco (97%) do que para os tecidos parafinados (68%). As identificações dos patógenos foram obtidas após submeter os amplificados ao sequenciamento, prolongando o tempo para a liberação de resultados.

Buitrago *et al.* (2014) avaliaram uma técnica de qPCR panfúngica (*primers* ITS) com o intuito de identificar infecções fúngicas invasivas em 89 amostras de tecidos humanos parafinados, comparando os resultados com as culturas. Os autores detectaram *Aspergillus* spp. em 67% dos casos, *Candida* spp. em 13%, 11% de mucoráceos e 9% de outros fungos. Entretanto, em três casos com culturas positivas dos tecidos (*Rhizopus microsporus*, *R. arrhizus* e *Saksenaea vasiformis*), as reações de PCR foram negativas, sugerindo que o emprego de *primers* da região ITS não é eficaz na identificação de algumas espécies de mucoráceos. Outros autores também relataram que amplificações com *primers* panfúngicos não são eficazes para a detecção de mucoráceos (Dannaoui *et al.*, 2010; Rickerts *et al.*, 2011).

Diante dessas limitações das PCR panfúngicas, decidimos utilizar para a detecção e identificação de *Aspergillus* spp. e mucoráceos nos tecidos, os *primers* previamente descritos por Bialek *et al.* (2005). Estes autores desenvolveram um ensaio de PCR do tipo *semi-nested* para detecção de *Aspergillus* spp. (*primers* gênero-específicos) e mucoráceos (*primers* ordem-específicos) em tecidos parafinados, empregando *primers* delineados a partir da região 18S do DNA ribossomal dos mucoráceos, e de uma sequência do DNA mitocondrial de *Aspergillus* spp. O ensaio de PCR foi capaz de identificar os fungos nos tecidos parafinados com resultados totalmente específicos, demonstrando eficácia na discriminação dos patógenos, sem a necessidade de sequenciamento.

Os *primers* delineados para a 2ª etapa da amplificação da *semi-nested* PCR do estudo de Bialek *et al.* (2005), amplificavam sequências gênicas pequenas (135 pb para *Aspergillus* e 176 pb para mucoráceos), adequados para amostras de DNA obtidas de tecidos parafinados. Amostras de DNA extraídas de tecidos parafinados estão, em geral, fragmentadas, devido à degradação causada pela solução de formol adicionada às biópsias e pelo processo de parafinização do tecido (Rickerts, 2016; Gade *et al.*, 2017). Assim, amplificações de sequências gênicas de tamanho abaixo de 300 pares de base são as mais adequadas para serem detectadas pelas técnicas moleculares (Hata *et al.*, 2008).

Em 2006, Rickerts *et al.*, empregando o mesmo ensaio de PCR utilizado por Bialek *et al.* (2005), compararam os resultados desta técnica com as culturas e os exames histopatológicos, realizados em 56 biópsias de pacientes imunocomprometidos, com suspeita de infecção por fungos filamentosos. O estudo mostrou que foi possível elevar o diagnóstico de 63% de positividade utilizando apenas as culturas, para 96%

com o uso da PCR em tecidos cujos exames histopatológicos detectaram presença de hifas.

Mais recentemente, Drogari-Apiranthitou *et al.* (2016), também utilizando os mesmos *primers* de Bialek *et al.* (2005) e a PCR *semi-nested*, avaliaram a técnica para detectar *Aspergillus* e mucoráceos em 20 amostras de tecidos parafinados; nestes, haviam sido visualizados fragmentos de hifas hialinas nos exames histopatológicos, sem, entretanto, diferenciar os dois grupos de patógenos. Os resultados mostraram 79,3% de sensibilidade e 100% de especificidade, comprovando o potencial do método na identificação dos patógenos (Bialek *et al.*, 2005; Buitrago *et al.*, 2013; Drogari-Apiranthitou *et al.*, 2016).

Os resultados do nosso estudo foram concordantes com aqueles obtidos por outros autores, pois os *primers* de Bialek *et al.* amplificaram 100% das amostras de DNA obtidas dos tecidos a fresco e parafinados, tanto na PCR *semi-nested* (**Figuras 16 e 17**), como na qPCR (**Tabelas 5 e 6**), com resultados 100% específicos (**Figuras 5, 6 e 7**).

Por outro lado, as amplificações pelos ensaios de PCR para a detecção de *Fusarium* spp. nos tecidos infectados, com diversos *primers* avaliados neste estudo, foram constantemente inespecíficas.

Os *primers* foram inicialmente selecionados da literatura (Hue *et al.*, 1999; Muraosa *et al.*, 2014). No estudo de Hue *et al.* (1999), *primers* da região 28S de *Fusarium* spp. foram utilizados para amplificar tecidos a fresco obtidos de modelo experimental de fusariose disseminada por PCR convencional. Os autores mostraram que as amplificações foram específicas, mas avaliaram a especificidade somente com amostras de DNA de *Aspergillus*, pois amostras de DNA de mucoráceos não foram incluídas no estudo. Muraosa *et al.* (2014) empregaram os *primers* na técnica de qPCR

do tipo *TaqMan*, na qual são empregadas sondas marcadas com fluoróforos, o que torna as amplificações mais específicas.

Esses dois *primers* (P58SL e Fus-PCR) foram inicialmente avaliados na PCR semi-nested, e foi observada a ocorrência de reatividade cruzada com amostras de DNA de *Aspergillus* e Mucorales (**Tabela 3**). Foi então delineado neste estudo, um novo par de *primers*, a partir de sequência gênica da região 28S (Fu28S, **Tabela 2**), cujas amplificações pela PCR semi-nested também resultaram em reatividade cruzada com *Aspergillus* e Mucorales (**Tabela 3**). Tendo em vista os resultados inespecíficos, esses três pares de *primers* foram excluídos do estudo.

Na tentativa de tornar as amplificações mais específicas, delineamos *primers* da sequência do gene da β -tubulina de *Fusarium* spp. (BtFu), e as amplificações por PCR semi-nested também mostraram reatividade cruzada, porém somente com amostras de DNA de Mucorales (**Tabela 3**). Entretanto esses *primers* não foram posteriormente avaliados na PCR semi-nested com as amostras de tecidos dos animais infectados, somente nos ensaios de qPCR.

A PCR em tempo real tem sido descrita para a detecção de mucoráceos, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e *Scedosporium* spp em tecidos parafinados. Estudo realizado por Hata *et al.* (2008), teve como objetivo desenvolver uma qPCR utilizando sondas marcadas, para a detecção de espécies de mucoráceos em tecidos a fresco e parafinados. Os *primers* foram delineados a partir de uma região conservada de múltiplas cópias para este grupo de fungos, que codifica para o citocromo B, resultando em produto de amplificação de 167 pares de base. A sensibilidade e especificidade do teste em tecidos a fresco foram de 100%, e para tecidos parafinados, a técnica mostrou sensibilidade de 56% e especificidade de 100%.

Mais recentemente, um ensaio de qPCR, visando amplificações da região ITS2, foi avaliado para detectar e identificar *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp e mucoráceos em tecidos parafinados. Os autores utilizaram sondas fluorescentes delineadas para diversas espécies, e os resultados mostraram sensibilidade de 64%, e concordância de 80% com os achados histopatológicos (Salehi *et al.*, 2016).

Alanio *et al.* (2015) empregaram, pela primeira vez, uma técnica de PCR acoplada à espectrometria de massa (PCR/ESI-MS) para detecção e identificação de mucoráceos em 19 biópsias a fresco de pacientes com mucormicose comprovada, e os resultados foram comparados com culturas e outros ensaios de PCR convencional e qPCR. A PCR/ESI-MS forneceu resultados em até 6 horas e mostrou melhor concordância com as culturas em relação aos demais ensaios moleculares. Entretanto, a limitação do ensaio é o custo elevado, que foi calculado entre 150 e 200 dólares por amostra analisada.

Apesar de ser menos específico do que o ensaio de qPCR com sondas de hidrólise *TaqMan*, o menor custo da qPCR com *SYBR Green* foi o motivo da escolha deste método para utilização no nosso estudo, com o objetivo de viabilizá-lo para laboratórios de rotina diagnóstica, particularmente nos serviços públicos. Nossos resultados mostraram que o emprego de *SYBR Green* permitiu a diferenciação entre *Aspergillus* spp. e mucoráceos, com especificidade elevada. Entretanto, para a detecção de *Fusarium* spp., o método com emprego de sondas *TaqMan* parece ser mais adequado, como demonstra a maior parte dos relatos da literatura, que empregam esta técnica molecular na detecção deste patógeno em amostras clínicas (Bernal-Martínez *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2013; Salehi *et al.*, 2016).

Diversos parâmetros foram analisados na avaliação da qPCR para a detecção dos patógenos nos tecidos. Como o *SYBR Green* se liga a qualquer fita dupla de DNA,

resultados inespecíficos podem ocorrer, pois o fluoróforo pode se ligar a sequências inespecíficas, ou a dímeros formados pelos *primers*. As reações devem, portanto, contemplar a análise das curvas de dissociação, para garantir que o sinal produzido pelas amplificações corresponda exclusivamente ao fragmento desejado. Para que uma amostra seja considerada positiva, além do sinal de amplificação, a temperatura de dissociação da amostra analisada deve coincidir com a temperatura do controle positivo.

Deste modo, as curvas de dissociação foram determinadas utilizando-se como alvo das amplificações os plasmídeos recombinantes, contendo os insertos das sequências específicas de cada um dos três fungos (**Figuras 6, 7 e 8**). As amplificações com os plasmídeos mostraram temperaturas médias das curvas de dissociação de 75,8°C para *A. fumigatus*, 76,1 °C para *R. arrhizus* e 90,4 °C para *F. solani*. Quando as amostras de DNA dos tecidos dos animais infectados foram analisadas, as temperaturas médias obtidas variaram de 75,4 a 75,7°C para o modelo de aspergilose, de 75,9 a 76,3°C para o modelo de mucormicose e de 90,0 a 90,2 para o modelo de fusariose. Portanto as temperaturas de dissociação das amostras de tecidos ficaram muito próximas às dos controles positivos, mostrando que as amplificações foram específicas. Em relação à detecção de *Fusarium* spp. com os *primers* BtFu, como já comentado anteriormente, apesar da reatividade cruzada com amostras de DNA de *R. arrhizus*, as curvas de dissociação apresentaram temperaturas bem distintas (**Figura 8**), o que possibilitaria o emprego desses *primers* para detectar a presença de *Fusarium* spp. nas amostras clínicas.

Para avaliar a eficiência das amplificações de cada DNA alvo, indicativa da precisão dos resultados, foram realizadas diluições seriadas dos plasmídeos em oito ensaios executados em dias diferentes. As curvas geradas pelo número de cópias dos clones e seus respectivos valores de *Ct* foram então empregados para o cálculo da

equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R^2 . As curvas de regressão obtidas (**Figuras 18, 19 e 20**), e os respectivos valores de inclinação (*slope*) e de R^2 , resultaram em valores de eficiência das amplificações muito próximos de 90 e 110% (**Tabela 4**), demonstrando que os valores de C_t a serem obtidos com as amplificações das amostras de tecido, poderiam ser considerados precisos (Bustin e Wittwer, 2017).

Os limiares de detecção de ambos os ensaios de PCR também foram analisados, utilizando tanto as amostras de DNA obtidas dos fungos, como as diluições seriadas dos plasmídeos recombinantes. Para a PCR convencional os LD para *Aspergillus* spp. e mucoráceos atingiu 50 fg de DNA (**Figura 9A e B**), enquanto para *Fusarium* spp. o LD foi menos sensível, atingindo 2 pg de DNA (**Figura 9C**). A diferença pode ser explicada pelo fato de o gene da β -tubulina estar presente em cópia única no genoma do fungo, enquanto as regiões do DNA ribossomal e mitocondrial estão presentes em múltiplas cópias (Bialek *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2007; Bernal-Martínez *et al.*, 2012). Os ensaios de qPCR mostraram maior sensibilidade analítica quando comparados à PCR semi-nested, atingindo 20 fg/ μ l de DNA para *Aspergillus* spp. e mucoráceos (**Figuras 10 e 11**), mas o mesmo LD (2 pg/ μ l) foi observado para *Fusarium* spp. (**Figura 12**). Os níveis de sensibilidade analítica para *Aspergillus* spp. e mucoráceos, encontrados em nosso estudo, foram similares aos de Bernal-Martínez *et al.* (2012), que empregando a qPCR com sondas de hidrólise e *primers* da região conservada do DNAr, para detecção de *Fusarium* spp. em tecidos obtidos de animais infectados pelo fungo, encontraram LD de 10 fg/ μ l amostra.

A avaliação da sensibilidade analítica também foi realizada utilizando diluições seriadas dos plasmídeos recombinantes, mais adequados para ensaios quantitativos de qPCR, pois permitem melhor reprodutibilidade de resultados. O LD determinado pelas diluições seriadas dos plasmídeos foi de 2×10^2 plasmídeos/ μ l em 100% dos oito ensaios

independentes de qPCR para *Aspergillus* spp. (**Figura 13**) e o LD determinado nos oito ensaios de qPCR para mucoráceos também foi de 2×10^2 plasmídeos/ μ l (**Figura 14**). Para os ensaios de qPCR de *Fusarium* spp., o LD foi avaliado com os *primers* BtFu-F1/R somente com os plasmídeos recombinantes, resultando em detecção de sinal para 2×10^2 / μ l em 100% dos cinco ensaios realizados (**Figura 15**). De acordo com Nierman *et al.* (2005), no genoma de *A. fumigatus*, há 16 cópias do gene mitocondrial. Deste modo, a sensibilidade analítica da qPCR de nosso estudo foi capaz de detectar em torno de 12 genomas do fungo/ μ l de amostra.

Em relação aos mucoráceos, não há dados precisos na literatura em relação ao número de cópias do DNAr presentes no genoma do fungo. Se considerarmos o dado relatado por Bialek *et al.* (2005), de que esse número seria de até 40 cópias/genoma dos mucoráceos, então nosso ensaio detectou cerca de 5 genomas do fungo/ μ l de amostra.

Esses resultados demonstram que os ensaios apresentam sensibilidade analítica relativamente elevada para detectar os patógenos, mesmo quando poucas hifas estiverem presentes nos tecidos.

Os dois ensaios de PCR avaliados neste estudo mostraram 100% de sensibilidade na detecção de *Aspergillus* spp. e mucoráceos nos tecidos a fresco e parafinados obtidos dos modelos experimentais.

Em relação à qPCR, observou-se que os valores de *Ct* nos tecidos obtidos do modelo de aspergilose foram bastante homogêneos, não somente em relação aos diferentes órgãos afetados, mas também entre amostras a fresco e parafinadas (**Tabela 5**). Entretanto, para a detecção dos patógenos nos tecidos obtidos do modelo de mucormicose, os valores de *Ct* variaram mais entre os tipos de órgãos (**Tabela 6**), possivelmente porque a disseminação do fungo para os diversos órgãos foi mais heterogênea, devido ao óbito precoce dos animais.

Quanto ao modelo de fusariose, o ensaio de qPCR realizado com os *primers* BtFu, foi capaz de detectar o DNA do patógeno somente nos tecidos a fresco (**Tabela 7**), com valores de *Ct* mais elevados, quando comparados aos dos outros dois modelos. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de o gene da β -tubulina estar presente no genoma do fungo em cópia única, o que diminui o limiar de detecção dos ensaios de PCR (Bernal-Martínez *et al.*, 2012). Além disso, a ausência de sinal de amplificação nesses tecidos, também pode ter ocorrido devido ao tamanho do *amplicon* (383 pb). Esses resultados negativos demonstram a necessidade de se continuar a busca de novos *primers*, que amplifiquem regiões gênicas de tamanho menor com especificidade, ou ainda a possibilidade de se utilizar a qPCR com sondas de hidrólise, apesar do custo mais elevado (Bernal-Martínez *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2013; Salehi *et al.*, 2016).

Em da sensibilidade e especificidade, outra vantagem da aplicação das técnicas de PCR como complemento ao método histológico no diagnóstico laboratorial, é a maior possibilidade de se detectar infecções mistas (Guarner e Brandt, 2011; Rickerts, 2016; Point *et al.*, 2018). Resultados discordantes entre as técnicas micológicas e histopatológicas, podem indicar presença de mais de um fungo na lesão, e nestes casos, as técnicas moleculares podem definir o diagnóstico de co-infecção (De Almeida Júnior *et al.*, 2016).

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo representam as etapas iniciais de uma futura validação analítica da qPCR, para determinar valores de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e acurácia na detecção de patógenos fúngicos, em tecidos a fresco e parafinados. Para tanto, a técnica deverá ser aplicada em amostras de tecidos com histopatológico positivo, obtidas de pacientes, para assegurar sua validade clínica.

Nossos resultados indicam que a técnica de qPCR possibilitou a diferenciação entre *Aspergillus* spp. e mucoráceos, em amostras de tecidos infectados, constituindo uma ferramenta promissora como adjuvante dos exames histológicos, que pode ser implementada em laboratórios de rotina diagnóstica de microbiologia.

8. REFERÊNCIAS

AL-HATMI, A. M. et al. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015.

ALANIO, A.; BRETAGNE, S. Challenges in microbiological diagnosis of invasive. **F1000Res**, v. 6, 2017.

ALANIO, A. et al. Molecular identification of *Mucorales* in human tissues: contribution of PCR electrospray-ionization mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 6, p. 594.e1-5, Jun 2015.

AVCU, G. et al. Utility of the serum galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis in children with acute lymphoblastic leukemia. **Int J Infect Dis**, v. 54, p. 8-12, Jan 2017.

BADIEE, P. et al. Non-Invasive Methods to Diagnose Fungal Infections in Pediatric Patients with Hematologic Disorders. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, n. 11, p. e41573, Nov 2016.

BARTON, R. C. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013.

BASKOVA, L.; BUCHTA, V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 5, p. 421-430, Sep 2012.

BASSETTI, M.; BOUZA, E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. suppl_1, p. i39-i47, 03 2017.

BAŠKOVÁ, L.; BUCHTA, V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 57, n. 5, p. 421-30, Sep 2012.

BERNAL-MARTÍNEZ, L. et al. 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. **Med Mycol**, v. 50, n. 3, p. 270-5, Apr 2012.

BIALEK, R. et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 11, p. 1180-1184, Nov 2005.

BUCHHEIDT, D. et al. The evolving landscape of new diagnostic tests for invasive aspergillosis in hematology patients: strengths and weaknesses. **Curr Opin Infect Dis**, v. 30, n. 6, p. 539-544, Dec 2017.

BITRAGO, M. J. et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 6, p. E271-E277, Jun 2013.

_____. Performance of panfungal--and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1737-40, May 2014.

BUSTIN, S. A.; WITTWER, C. T. MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. **Clin Chem**, v. 63, n. 9, p. 1537-1538, Sep 2017.

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2010.

CHAKRABARTI, A.; SINGH, R. Mucormycosis in India: unique features. **Mycoses**, v. 57 Suppl 3, p. 85-90, Dec 2014.

CLEMONS, K. V. et al. Whole glucan particles as a vaccine against murine aspergillosis. **J Med Microbiol**, v. 63, n. Pt 12, p. 1750-9, Dec 2014.

COLOMBO, A. L. et al. Candida and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 11, p. e344-e356, Nov 2017.

CORNELY, O. A. et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013.

DANNAOUI, E. et al. Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 6, p. 2043-6, Jun 2010.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N. et al. Rhizopus arrhizus and Fusarium solani Concomitant Infection in an Immunocompromised Host. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 125-9, Feb 2016.

DESOUBEAUX, G.; BAILLY, E.; CHANDENIER, J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: Updates and recommendations. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 3, p. 89-101, Mar 2014.

DOUGLAS, A. P.; CHEN, S. C.; SLAVIN, M. A. Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, n. 8, p. 670-80, Aug 2016.

DROGARI-APIRANTHITOU, M. et al. Diagnostic value of a semi-nested PCR for the diagnosis of mucormycosis and aspergillosis from paraffin-embedded tissue: A single center experience. **Pathol Res Pract**, v. 212, n. 5, p. 393-7, May 2016.

FRICKMANN, H. et al. Detection of tropical fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: still an indication for microscopy in times of sequence-based diagnosis? **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 938721, 2015.

GADE, L. et al. Detection of mucormycetes and other pathogenic fungi in formalin fixed paraffin embedded and fresh tissues using the extended region of 28S rDNA. **Med Mycol**, v. 55, n. 4, p. 385-395, Jun 2017.

GALIMBERTI, R. et al. Emerging systemic fungal infections. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 633-50, 2012 Nov-Dec 2012.

GLOGHINI, A. et al. RT-PCR analysis of RNA extracted from Bouin-fixed and paraffin-embedded lymphoid tissues. **J Mol Diagn**, v. 6, n. 4, p. 290-6, Nov 2004.

GONZALEZ, G. M. et al. Murine Model of Disseminated Fusariosis: Evaluation of the Fungal Burden by Traditional CFU and Quantitative PCR. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 219-224, Oct 2013.

GUARNER, J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 2, p. 247-80, Apr 2011.

GUARRO, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1491-1500, Dec 2013.

GUEVARA-SUAREZ, M. et al. Genotyping of Fusarium Isolates from Onychomycoses in Colombia: Detection of Two New Species Within the Fusarium solani Species Complex and In Vitro Antifungal Susceptibility Testing. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3-4, p. 165-74, Apr 2016.

HATA, D. J. et al. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 7, p. 2353-8, Jul 2008.

HOFMAN, V. et al. Usefulness of molecular biology performed with formaldehyde-fixed paraffin embedded tissue for the diagnosis of combined pulmonary invasive mucormycosis and aspergillosis in an immunocompromised patient. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 1, Jan 2010.

HUE, F. X. et al. Specific detection of fusarium species in blood and tissues by a PCR technique. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 8, p. 2434-8, Aug 1999.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 8, p. 1091-100, Apr 2010.

LAMOTH, F.; CALANDRA, T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. suppl_1, p. i19-i28, 03 2017.

LAU, A. et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 380-5, Feb 2007.

LEASE, E. D.; ALEXANDER, B. D. Fungal diagnostics in pneumonia. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 6, p. 663-72, Dec 2011.

LEEFLANG, M. M. et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 12, p. CD007394, Dec 2015.

LEROUX, S.; ULLMANN, A. J. Management and diagnostic guidelines for fungal diseases in infectious diseases and clinical microbiology: critical appraisal. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 12, p. 1115-21, Dec 2013.

LIONAKIS, M. S.; LEVITZ, S. M. Host Control of Fungal Infections: Lessons from Basic Studies and Human Cohorts. **Annu Rev Immunol**, v. 36, p. 157-191, Apr 2018.

MCCARTHY, M. W. et al. Recent Advances in the Treatment of Scedosporiosis and Fusariosis. **J Fungi (Basel)**, v. 4, n. 2, Jun 2018.

MURAOSA, Y. et al. Development of cycling probe-based real-time PCR system to detect *Fusarium* species and *Fusarium solani* species complex (FSSC). **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 3-4, p. 505-11, May 2014.

MUSZEWSKA, A.; PAWŁOWSKA, J.; KRZYŚCIAK, P. Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 8, p. 1273-87, Aug 2014.

MUÑOZ-CADAVID, C. et al. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 6, p. 2147-53, Jun 2010.

NIERMAN, W. C. et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151-6, Dec 2005.

PAHL, A. et al. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1958-63, Jun 1999.

PATEL, M. H. et al. Invasive fungal infections in renal transplant patients: a single center study. **Ren Fail**, v. 39, n. 1, p. 294-298, Nov 2017.

PATTERSON, T. F. et al. Executive Summary: Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 4, p. 433-42, Aug 2016.

PEMÁN, J.; SALAVERT, M. [Invasive fungal disease due to *Scedosporium*, *Fusarium* and mucorales]. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 4, p. 242-8, 2014 Oct-Dec 2014.

PERINI, G. F. et al. Fusariose disseminada com endoftalmite em paciente com neoplasia hematológica. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. 4, p. 545-546, 12 2013.

PERUSQUIA-ORTIZ, A. M.; VAZQUEZ-GONZALEZ, D.; BONIFAZ, A. Opportunistic filamentous mycoses: aspergillosis, mucormycosis, phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 10, n. 9, p. 611-622, Sep 2012.

POINT, S. et al. Tumor shape pulmonary mucormycosis associated with sinonasal aspergillosis in a diabetic patient. **Med Mycol Case Rep**, v. 19, p. 13-17, Mar 2018.

PRASAD, P.; FISHMAN, J. A. Impact and cost of the serum galactomannan assay at a tertiary care facility. **Transplantation**, v. 98, n. 7, p. 773-80, Oct 2014.

RANTAKOKKO-JALAVA, K. et al. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4304-11, Sep 2003.

RICKERTS, V. Identification of fungal pathogens in Formalin-fixed, Paraffin-embedded tissue samples by molecular methods. **Fungal Biol**, v. 120, n. 2, p. 279-87, Feb 2016.

RICKERTS, V. et al. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 25, n. 1, p. 8-13, Jan 2006.

_____. Comparison of quantitative real time PCR with Sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 202, Jul 2011.

RUHNKE, M.; SCHWARTZ, S. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with oncohematological diseases. **Ther Adv Hematol**, v. 7, n. 6, p. 345-359, Dec 2016.

SALEHI, E. et al. Discrimination of aspergillosis, mucormycosis, fusariosis and scedosporiosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens using multiple real-time quantitative PCR assays. **J Clin Microbiol**, Sep 2016.

SEVERO, C. B.; GUAZZELLI, L. S.; SEVERO, L. C. Capítulo 7 - Zigomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 134-141, 02 2010.

SKIADA, A. et al. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. **Med Mycol**, v. 56, n. suppl_1, p. 93-101, Apr 2018.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 1023-1052, Dec 2016.

TAPIA, C.; AMARO, J. Género Fusarium. **Revista chilena de infectología**, v. 31, n. 1, p. 85-86, 02 2014.

TORTORANO, A. M. et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. **Clin Microbiol Infect**, v. 20 Suppl 3, p. 27-46, Apr 2014.

VAN DIEPENINGEN, A. D. et al. Diagnosis of. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 9, n. 3, p. 135-143, 2015 2015.

VOIGT, K. et al. The zygomycetes in a phylogenetic perspective INTRODUCTION. **Persoonia**, v. 30, p. I-IV, Jun 2013.

WALTHER, G. et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. **Persoonia**, v. 30, p. 11-47, Jun 2013.

WANG, C. et al. The Application of Laser Microdissection in Molecular Detection and Identification of *Aspergillus fumigatus* from Murine Model of Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1-2, p. 53-61, Aug 2014.