MARIANA GERALDI GRAÇA

**Avaliação de método molecular para detecção direta de *Fusarium*
em água**

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

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara
Shafferman Levin

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Graça, Mariana Geraldi

Avaliação de método molecular para detecção direta de *Fusarium* em água / Mariana Geraldi Graça. -- São Paulo, 2015.

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Anna Sara Shafferman Levin.

Descritores: 1.*Fusarium* 2.Água 3.Reação em cadeia da polimerase 3.DNA 4.Técnicas de cultura 5.Meio ambiente

USP/FM/DBD-302/15

À minha querida família, por ser minha base, minha sustentação; pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim. Em especial aos meus pais que me passaram segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus maiores incentivadores.

À Profa. Dra. Anna Sara Shafferman Levin pela paciente orientação durante todas as etapas dessa caminhada.

A todos os funcionários, alunos e estagiários do LIM 54 que estiveram presentes durante a realização deste trabalho. Muito obrigada por todos os momentos de amizade e companheirismo, agradeço cada atitude de colaboração e cada demonstração de amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto.

À CAPES por subsidiar-me com bolsa de estudos.

A toda minha família, por todo o carinho que recebi.

O insucesso é apenas uma
oportunidade para recomeçar de novo
com mais inteligência. (Henry Ford)

Esta dissertação ou tese 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

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
a. O fungo Fusarium	1
b. Taxonomia	1
c. Importância clínica	2
d. Ambientes	6
e. Métodos de Isolamento	8
f. Identificação	9
g. Vigilância e Prevenção	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
a. Desenvolvimento da técnica molecular	17
b. Determinação do limite de detecção	28
c. Utilização da técnica molecular em situação real	28
4. RESULTADOS	30
a. Desenvolvimento da técnica molecular	30
b. Determinação do limite de detecção	39
c. Utilização em condições reais	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	57
7. ANEXO	58
8. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma dos métodos de extração testados para <i>Fusarium</i>	18
Figura 2 - Esquema das principais etapas do Método 8 de extração de DNA de espécies de <i>Fusarium</i>	24
Figura 3 - Resultado da reação em cadeia da polimerase realizada para o método 6 .	33
Figura 4 - Reação em cadeia da polimerase utilizando o método 7	34
Figura 5 - Revelação do gel da reação em cadeia da polimerase utilizando o método 8	36
Figura 6 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 9 com o par de Iniciadores: P28SL/P58L	37
Figura 7 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 9 com os iniciadores: ITS-FU	37
Figura 8 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 10	38
Figura 9 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 11	38
Figura 10 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 12	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de limite de detecção utilizando técnica de polimerase em cadeia encontrados para estudos da literatura envolvendo outros microorganismos.....	13
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia para identificação de espécies de <i>Fusarium</i>	19
Tabela 3 - Reagentes (e suas respectivas concentrações) utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS1/4.....	20
Tabela 4 - Tempos e temperaturas utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS1/4	20
Tabela 5 - Reagentes (e suas respectivas concentrações) utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores P28SL/P58L para amplificação de DNA do gênero <i>Fusarium</i>	25
Tabela 6 - Tempos e temperaturas utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores P28SL/P58L para amplificação de DNA do gênero <i>Fusarium</i>	25
Tabela 7 - Reagentes (e suas respectivas concentrações) utilizados na reação de reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS-Fu-f/-r para amplificação de DNA do gênero <i>Fusarium</i>	25
Tabela 8 - Tempos e temperaturas utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS-Fu-f/-r para amplificação de DNA do gênero <i>Fusarium</i>	26
Tabela 9 - Resumo dos resultados das leituras espectrofotométricas e de reação de polimerase em cadeia (PCR) das amostras utilizadas no desenvolvimento do método de extração de DNA.....	31
Tabela 10 - Resultados das leituras por espectrofotometria pelo equipamento Nanodrop® para o método 6 de extração de DNA de espécies de <i>Fusarium</i> em água.....	33
Tabela 11 - Resultados das leituras por espectrofotometria pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) para o método 7 de extração de DNA de espécies de <i>Fusarium</i> em água.....	34
Tabela 12 - Resultados de leituras por espectrofotometria pelo equipamento Nanodrop® para concentração de material genético e qualidade do mesmo (relação 260/280) após o método 8 de extração de DNA de espécies de <i>Fusarium</i> em água. ...	35
Tabela 13 - Resultados de detecção de <i>Fusarium</i> spp. pelo método de reação em cadeia da polimerase em água artificialmente inoculada com concentrações conhecidas do fungo.....	40
Tabela 14 - Resultados de detecção de <i>Fusarium</i> spp. pelo método de cultura nos meios de cultura ágar dextrose batata e ágar dicloran rosa bengala em água artificialmente inoculada com concentrações conhecidas do fungo	41
Tabela 15 - Resultados de culturas e testes moleculares realizados em água e “swab” de superfícies da unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, utilizando-se os pares de iniciadores ITS-Fu (normal e “nested”) e P28SL/P58L.....	43

RESUMO

Graça MG. *Avaliação de método molecular para detecção direta de Fusarium em água* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Pacientes imunocomprometidos estão vulneráveis a infecções oportunistas. O gênero *Fusarium* é um fungo que causa infecções importantes especialmente em pacientes com neutropenia grave. O ambiente pode ser a fonte de *Fusarium*, em especial a água. A detecção de *Fusarium* na água é realizada normalmente pela cultura que é difícil e demorada, mas necessária para a prevenção da exposição de pacientes susceptíveis. Um método mais rápido é necessário. O objetivo do estudo foi desenvolver uma técnica molecular para a detecção de *Fusarium* direta em água. Um método de extração de DNA direto a partir da água foi desenvolvido para 3 espécies de *Fusarium* (*moniliforme*, *oxysporum* e *solani*). O método de extração desenvolvido foi reprodutível e acoplado a uma reação de polimerase em cadeia gênero-específica para a detecção do *Fusarium* em água. Os limites de detecção foram 10 células/litro e 1 célula/litro para os métodos molecular e cultura, respectivamente.

Descritores: *Fusarium*; água; reação em cadeia da polimerase; DNA; técnicas de cultura; meio ambiente.

ABSTRACT

Graça MG. *Evaluation of a molecular method for direct detection of Fusarium spp in water* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Immunosuppressed patients are vulnerable to opportunistic infections. The genus *Fusarium* is a fungus that causes severe infections especially in patients with prolonged neutropenia. The environment may be a source of *Fusarium*, in particular, water. The detection of *Fusarium* in water is carried out by culturing which is difficult because it is time consuming, but is necessary to prevent exposure of susceptible patients. A faster method is necessary. The objective of this study was to develop a molecular technique for direct detection of *Fusarium* in water. A direct DNA extraction method from water was developed for 3 species of *Fusarium* (*moniliforme*, *oxysporum* and *solani*). We developed a reproducible efficient extraction method and coupled it to a genus-specific PCR in order to detect *Fusarium* in water. The detection limits were 10 cells/L and 1 cell/L for the molecular and cultures method, respectively.

Descriptors: *Fusarium*; water; polymerase chain reaction; DNA; culture techniques; environment.

1. INTRODUÇÃO

a. O fungo *Fusarium*

As espécies de *Fusarium* pertencem ao filo *Ascomycota*, Ordem *Hypocreales*, família *Hypocreaceae* (1) e fazem parte de um grupo de fungos filamentosos encontrados na natureza, no solo, nas plantas, em substratos orgânicos de regiões tropicais e temperadas de vários locais do mundo (2).

São amplamente distribuídas no solo e podem ser encontradas nas partes subterrâneas e aérea das plantas. Apesar de serem comuns em regiões de clima tropical e temperado, também são encontradas no deserto, no ártico e em regiões alpinas. Esse amplo padrão de distribuição pode ser atribuído à habilidade do fungo de crescer em diferentes tipos de substrato orgânico e de seus eficientes mecanismos de dispersão (2).

b. Taxonomia

As espécies de *Fusarium* são caracterizadas pela presença de macroconídeos falcatos com vários septos transversais, célula apical na maioria das vezes curva e célula basal pedicelada. Uma vez que o fungo *Fusarium* está amplamente distribuído pelo mundo e afeta humanos, plantas e animais, diversos esquemas taxonômicos foram desenvolvidos. Dada a complexidade do gênero *Fusarium* um sistema de classificação internacional ainda não foi alcançado (3).

A taxonomia do gênero *Fusarium* foi tradicionalmente descrita com base em caracteres morfológicos como forma e tamanho dos macroconídios, presença ou ausência de clamidosporos, presença ou ausência, forma e estrutura de suporte dos microconídios (4). Entretanto, no gênero *Fusarium*, algumas cepas somente desenvolvem microconídios, mas o problema pode ser atribuído a mutações ou alteração das condições de crescimento padronizadas (3). Nesse caso, os isolados do gênero *Fusarium* podem ser confundidos com outros gêneros como *Acremonium* e *Verticillium* (5). Além disso, outras características macrocópicas como textura das colônias, pigmentação e taxa

de crescimento podem ser úteis na distinção, se determinadas em métodos padronizados. Já o tamanho e a septação de conídios não possuem muita utilidade nesse gênero como em outros (3).

Alguns sistemas de classificação do gênero estabeleceram seções, ou seja, agrupamentos de espécies que apresentam características morfológicas semelhantes (3). Dessa forma, vários complexos foram criados para agrupar as espécies de *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC), *Gibberella (Fusarium) fujikuroi* species complex (GFSC), *Fusarium dimerum* species complex (FDSC), *Fusarium chlamydosporum* species complex (FCSC), *Fusarium incarnatum-Fusarium equiseti* species complex (FIESC), *Fusarium sambucinum* species complex (FSAMSC), *Fusarium tricinctum* species complex (FTSC) (6). Esse sistema de classificação, porém, não resolveu o problema, uma vez que existem espécies que possuem características de mais de uma seção. Assim pode-se dizer que o problema da especiação dentro do gênero *Fusarium* está relacionado à ampla variedade de aspectos morfológicos e não morfológicos apresentadas dentro do gênero (3).

c. Importância clínica

O gênero *Fusarium* possui importância desde sua descrição na primeira metade do século passado por ser um patógeno de plantas, especialmente de grãos e horticultura. A partir de meados da década de 70, iniciam-se estudos com as espécies de *Fusarium* devido à produção de micotoxinas.

As micotoxinas constituem um grupo de diversos compostos produzidos como resultado do metabolismo secundário de fungos filamentosos que pode causar doença no homem e em outros animais (7). Elas representam um problema mundial devido a sua alta incidência em alimentos e rações (8). As micotoxinas de *Fusarium* são consideradas um dos cinco maiores grupos com relação à saúde humana (9). Elas são capazes de induzir efeitos tóxicos agudos ou crônicos. Esses efeitos dependem da substância, do nível de exposição e da idade (10). Dentre as mais relevantes encontram-se: tricotenos, zearalenona e fumonisina B1. Os tricotenos são uma família de sesquiterpenoides cíclicos divididos em 4 grupos (A-D). Os grupos A e B são os mais comuns causando vômito, diarreia, e inflamação intestinal. Já a

zearalenona é produzida por várias espécies de *Fusarium* e apresenta uma ação estrogênica causando toxicidade no sistema reprodutivo. As fumonisinas são uma família de micotoxinas produzidas principalmente pelas espécies *Fusarium moniliforme* e *Fusarium proliferatum*. Por serem estruturalmente similares ao esfingolipídeos, as fumonisinas inibem a síntese de esfingolipídeos complexos (7).

Mais recentemente as espécies de *Fusarium* adquiriram grande relevância por serem importante causa de infecção invasiva em pacientes imunocomprometidos (2). Nos seres humanos, além de causar doença invasiva, *Fusarium* spp. são responsáveis por doenças cutâneas e mucocutâneas, como onicomicose e ceratite, e doenças alérgicas em pacientes imunocompetentes (11). Onicomicose é uma infecção ungueal causada por fungos (12). A onicomicose causada por *Fusarium* consiste em uma lesão superficial branca na base da unha que evolui aumentando de tamanho, podendo afetar a unha toda. Com o tempo a unha se torna opaca e mais grossa na borda externa, além de apresentar um inchaço na base (2,13).

O gênero *Fusarium* também é uma causa muito comum de queratite. A queratite por *Fusarium* não difere muito da queratite causada por outros fungos e pode evoluir para uma endoftalmite, que em indivíduos imunocompetentes é geralmente decorrente de um estado avançado de queratite ou de cirurgia ocular. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos a endoftalmite por *Fusarium* pode resultar de uma disseminação hematológica do agente a partir de lesões cutâneas (2,11).

A fusariose invasiva é a forma clínica de infecção por *Fusarium* mais desafiadora em pacientes imunocomprometidos. O padrão mais frequente consiste em uma combinação de lesões cutâneas características disseminadas e culturas de sangue positivas para *Fusarium*, além de febre e neutropenia grave (menos que $100/\text{mm}^3$) e prolongada (mais que 10 dias). Além disso, pode haver comprometimento de outros sítios como seios da face ou pulmões. A sobrevivência após uma fusariose invasiva é dependente da resolução da neutropenia e varia de 50 a 90% (14,15)

A fusariose invasiva em humanos requer dois fatores para o desenvolvimento: exposição ao patógeno e algum nível de imunossupressão (2), sendo que a neutropenia grave e prolongada que se segue à quimioterapia é o maior fator de risco para o desenvolvimento dessas infecções (16).

As espécies de *Fusarium* são comuns no meio ambiente (17) e os seres humanos estão frequentemente em contato com os polissacarídeos extracelulares do fungo, provavelmente por inalação. Um exemplo disso é um estudo que isolou o fungo em 17% de amostras da orofaringe de 27 estudantes de medicina saudáveis (18). Assim, as células fúngicas podem adentrar no organismo através dos pulmões ou lesão cutânea e disseminarem-se pela corrente sanguínea em pacientes imunossuprimidos (17).

Já em pacientes saudáveis um surto de queratite fúngica foi relatado em Singapura, entre março de 2005 e maio de 2006, associado ao uso de lentes de contato e de uma solução para lentes de contato; no mesmo período, um surto de queratite causada por *Fusarium* foi descrito em Hong Kong e nos EUA (19). Os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e outras autoridades governamentais americanas associaram o surto à solução de lente de contato Bausch & Lomb's ReNu®.

Uma vez que o produto foi retirado do mercado, a frequência de queratite diminuiu em Singapura e nos EUA. O surto foi considerado incomum, pois as infecções da córnea causadas por *Fusarium* são tipicamente associadas com trauma ocular e o surto relatado, aparentemente, não (20). Trezentos e dezenove isolados clínicos desse surto foram analisados e os haplotipos recuperados da córnea e do ambiente dos pacientes eram de um tipo comumente encontrado em pias e chuveiros. Portanto, os autores acreditam que o sistema de água dos pacientes deve ter sido a fonte primária de infecção do surto. Além disso, a possibilidade de que esses haplotipos ligados ao surto estejam adaptados a sistemas de água também foi mencionada (20).

Entretanto, a forma de infecção causada por este fungo que mais preocupa é a fusariose invasiva em pacientes imunocomprometidos, pois a mortalidade de infecções disseminadas nestes pacientes pode chegar a 100%.

Essa mortalidade ocorre devido à demora do diagnóstico, além do fato de que as espécies de *Fusarium* particularmente as pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium solani* (*Fusarium solani* species complex – FSSC) são tipicamente resistentes à maioria dos antifúngicos (6).

Nos últimos anos, a epidemiologia das infecções fúngicas sistêmicas em pacientes transplantados mudou significativamente, aumentando a incidência de infecções por fungos oportunistas como as leveduras do gênero *Candida* e os fungos filamentosos *Aspergillus*, Zygomycetos e *Fusarium* (21). Prontuários de pacientes que desenvolveram fusariose invasiva de 1985 a 2001 de 9 hospitais (2 nos Estados Unidos da América e 7 no Brasil) foram revisados (14). A incidência geral de fusariose invasiva foi de 5,97 casos por 1000 transplantados e variou entre as instituições (5,00 - 11,33 casos por 1000 transplantados), mas não entre os países (6,18 casos por 1000 transplantados no Brasil e 5,89 casos por 1000 transplantados nos Estados Unidos da América).

A primeira fusariose disseminada foi descrita em 1973 (22) e a partir de então vários outros casos foram relatados. Uma característica interessante do *Fusarium* é a facilidade com que é isolado a partir da corrente sanguínea, levando a uma taxa de isolamento sanguíneo muito mais elevada (60%), quando comparada a outros fungos filamentosos oportunistas como, por exemplo, *Aspergillus* spp. (<5%) (2).

Em uma revisão da literatura com 259 casos de fusariose disseminada, doze espécies foram associadas com infecção. *Fusarium solani* foi o mais frequente (50% dos casos), seguido por *Fusarium oxysporum* (20%) e *Fusarium verticillioidis* e *Fusarium moniliforme* (10% cada). Outras espécies encontradas foram: *Fusarium dimerum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium chlamidosporum*, *Fusarium sacchari*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium antophilum* e *Fusarium vasinfectum* (11). A espécie *F. solani* é a responsável por metade das fusarioses encontradas em imunocomprometidos e a maior incidência de infecções por *F. solani* provavelmente reflete a maior virulência dessa espécie (17).

A infecção disseminada por *Fusarium* (fusariose) pode ser definida pela detecção de *Fusarium* em ao menos dois sítios corporais não contíguos(23). Infecções disseminadas por *Fusarium* já foram relatadas em várias situações de imunossupressão, tais como: transplante de pulmão (24), transplante de medula óssea (25,26,27,28), quimioterapia (29), diálise peritoneal contínua (30), transplante renal (3), neoplasias linfoides e hematológicas (31), queimados (32). Porém acometem principalmente pacientes com câncer que recebem quimioterapia intensa ou transplante, em especial o de medula óssea (2).

Além disso, infecções fúngicas estão associadas a uma taxa de mortalidade mais alta quando comparadas com infecções bacterianas ou virais e, apesar de vários estudos relatarem a carga bacteriana nos diversos ambientes hospitalares, existem poucos trabalhos relacionados à frequência de fungos nesses ambientes (17).

d. Ambientes

Sendo a fusariose, dentre outras infecções invasivas comuns em ambientes nosocomiais, de alta morbidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos (33), faz-se necessário um diagnóstico rápido (34), uma vez que o início precoce da terapia antifúngica constitui um dos pilares para o tratamento de micoses invasivas (33).

É provável que *Fusarium* spp. colonizem os pacientes antes da sua hospitalização e que a subsequente imunossupressão e neutropenia resulte em infecção (2). Em um estudo americano, 70 casos de fusariose foram relatados no período de 1987 a 1997. Desses, 40 (57%) foram adquiridos na comunidade, 13 (18,5%) de aquisição indeterminada e 17 (24%) foram considerados nosocomiais (35). Dessa forma, também existe a possibilidade dessa infecção ser nosocomial, uma vez que o fungo já foi isolado em hospital (2). Em alguns centros, as espécies de *Fusarium* são a segunda causa mais comum de infecção por fungos filamentosos (17). Um estudo conduzido nos EUA recuperou em amostras de ar mais frequentemente o gênero *Fusarium* do que o gênero *Aspergillus* (36).

Dados da contagem de esporos de *Fusarium* em ar revelam também picos em épocas de verões chuvosos, o que coincide com o aumento de casos no mesmo período (35), uma vez que o fungo pode ser dispersado pela chuva e pelo vento, comuns nessas épocas (36).

Diversos estudos demonstraram a presença de fungos filamentosos em sistemas de água hospitalares (37,38,23,39,40,41,42,43). Um estudo na Noruega encontrou 94% das amostras do sistema de água contaminadas com fungos filamentosos, sendo *Aspergillus*, o mais comum. O artigo sugere que a água hospitalar contaminada possa ser uma fonte de infecção nosocomial (39).

A água contaminada com *Fusarium* pode levar à aerolização do fungo e consequente exposição do imunossuprimido (36). Tal teoria é condizente com um estudo em que fungos oportunistas, incluindo o gênero *Fusarium*, foram isolados em pias e chuveiros de vários hospitais dos EUA. Além disso, a amostragem de ar após o banho revelou um aumento significativo na contagem de esporos (16). Assim, uma rotina de análise da água para a procura de fungos, e não somente bactérias, faz-se necessária, uma vez que é possível que haja outra via de infecção além da inalação de vapor contaminado, como inoculação direta através da contaminação de feridas (39). Outro argumento para a existência de outras vias de transmissão é a falta de relação genética de isolados ambientais de ar e clínicos (39).

Outro estudo analisou 283 amostras de água e 26 amostras de ar em um hospital. Das amostras onde o fungo *Fusarium* foi isolado, este foi comparado molecularmente com amostras clínicas obtidas no mesmo hospital. Algumas amostras clínicas puderam ser correlacionadas com amostras ambientais. Para outras amostras clínicas, entretanto, não foi encontrada uma correlação com as amostras isoladas do ambiente. Assim, os autores sugerem que a não correlação de isolados ambientais e clínicos pode ocorrer, pois os isolados ambientais podem apresentar tempos diferentes de influxo por sistema de água, ou seja, os isolados obtidos no estudo não representam necessariamente todas as cepas que estiveram presentes no sistema de água no momento da inoculação da célula fúngica, uma vez que as amostras foram coletadas em momentos diferentes que o paciente entrou em contato com a

água. Além disso, os pacientes podem ter sido colonizados por organismos da comunidade. Assim, mais estudos são necessários para melhor entender a epidemiologia da fusariose nosocomial (23).

e. Métodos de Isolamento

Apesar da grande quantidade de estudos analisando a presença de fungos na água, a diferença entre as técnicas de análise não permitem uma comparação entre os achados. Portanto, faz-se necessário padronizar uma técnica de análise para que o isolamento e a identificação possam ser comparados (44).

Em um estudo que analisou amostras de água potável uma diferença entre os métodos de isolamento e meios de cultura foi verificada. Entre as técnicas de isolamento “spread plate”, “pour plate” e filtração por membrana, essa última foi capaz de encontrar uma diversidade de fungos maior, além de ser mais reprodutível. Além disso, o limite de detecção foi menor, ou seja, o método foi capaz de detectar uma menor concentração de fungos. Comparando os meios de cultura YMGA (yeast-extract mal-extract glucose agar), Ágar Sabouraud Dextrose, Czapek-Dox agar, MEA (malt extract agar), DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar ou ágar dicloran rosa bengala) e DG-18 (dichloran 18% glycerol agar), DRBC foi capaz de otimizar o valor de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por obter uma maior variedade e um maior número de colônias. Sendo assim, os autores concluíram que a utilização da técnica de isolamento de filtração por membrana seguida de cultura em meio DBRC otimizou a detecção fúngica em termos de abundância e variedade, em várias matrizes de água potável (água nascente, superficial e mineral) (44).

Outro estudo realizado com amostras clínicas de pacientes com fibrose cística comparou três métodos de detecção de patógenos, incluindo fungos filamentosos: dois métodos de cultura (em um meio seletivo e outro não seletivo) e um método molecular. Uma diferença significativa foi encontrada na detecção desses fungos se comparados os métodos de cultura e molecular. A utilização de um meio de cultura não seletivo falhou em detectar a presença de vários fungos nas amostras clínicas. Já a utilização de um meio seletivo para

fungos (acrescido de antibiótico) aumentou em 60% a detecção desses. Ainda assim, a extração direta de DNA da amostra clínica foi o método mais sensível do estudo (45). Inclusive, foi o único método capaz de detectar um isolado de *Fusarium* (entre outros gêneros como *Sacharomyces cerevisiae*, *Malassezia* sp, *Fuscoporia ferrea*, *Acremonium strictum*, *Thenatephorus cucumeri* e *Cladosporium* sp) presente com menor frequência nos pacientes (17). Amostras de ar em ambientes ambulatoriais e de pacientes internados também foram analisadas e verificou-se que vários fungos potencialmente importantes que necessitam de vigilância constante, podem não ser detectados se os meios de cultura não forem seletivos (17).

f. Identificação

Fungos emergentes são, de forma geral, difíceis de identificar, devido à falta de ferramentas específicas (46). A definição mais robusta de espécie é aquela em que três conceitos - morfológico, biológico e filogenético - levam ao mesmo resultado (4). Entretanto, no gênero *Fusarium* existem espécies que não podem ser identificadas pelo método morfológico e precisam de um método molecular para distingui-las (47). O método clássico de identificação fúngica baseado na caracterização fenotípica funciona em muitos casos. A técnica depende do crescimento do organismo em um determinado meio de cultura e detecção das estruturas reprodutivas (conidióforos) produzidas durante o crescimento, bem como de técnicas bioquímicas. Dessa forma, a especiação de fungos filamentosos por métodos clássicos é uma tarefa difícil e demorada (48). O conhecimento necessário só está disponível em laboratórios de referência e mesmo nestes, pelo menos cinco dias são necessários para a identificação desses isolados por observação morfológica (34). A especiação de *Fusarium* pelo método clássico também não foi considerada como fácil e, em vários casos clínicos, o agente etiológico de uma fusariose acaba sendo relatado como *Fusarium* sp (47).

Além do isolamento através da cultura, a identificação também é de extrema importância num contexto clínico, uma vez que o conhecimento do agente etiológico permite a escolha de um tratamento antifúngico adequado (49). A identificação de *Fusarium* ao nível de espécie é importante para

propósitos epidemiológicos (47,46), especialmente em amostras hospitalares (50), e para o entendimento da epidemiologia desses agentes oportunistas com o objetivo final de prevenir contaminações (51). Além disso, as espécies de *Fusarium* têm se mostrado suscetíveis às drogas antifúngicas disponíveis (46) ou até consideradas como resistentes a todas as drogas antifúngicas (52). Também por causa da semelhança entre a fusariose e a aspergilose, os pacientes são geralmente tratados com anfotericina B, um antifúngico de baixa atividade contra *Fusarium* sp(5).

A especiação de fungos filamentosos é dificultada por vários fatores. Em particular pela sua taxonomia que, por vezes, pode ser complexa. Além disso, os aspectos macro e microscópicos desses fungos são altamente subjetivos, e com frequência levam a identificações erradas ou inconclusivas (46). Identificá-los torna-se ainda mais complicado se o fungo apresentar uma morfologia atípica, não esporular, ou se o organismo necessitar de mais tempo de incubação em meios especiais não disponíveis em laboratório e os resultados fenotípicos forem inespecíficos ou controversos (48).

O gênero *Fusarium* é um excelente exemplo dessas dificuldades, pois possui uma ampla distribuição e a taxonomia desse gênero é uma das mais complexas, pois apresenta uma elevada variabilidade fenotípica (46). Além disso, menos de um terço dos isolados clínicos de *Fusarium* são identificados em nível de espécie(50). Assim, as dificuldades de identificação de fungos, principalmente os filamentosos (46), em conjunto com a baixa sensibilidade dos métodos de identificação baseados em cultura, levaram ao desenvolvimento de métodos moleculares para detecção da presença de fungos filamentosos, incluindo o gênero *Fusarium*, em vários sítios do corpo (17). Entre as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvidas ao longo dos anos para detecção de espécies de fungos encontram-se algumas panfúngicas. A utilização destas reações pode levar a resultados errôneos devido à amplificação de DNA da microbiota normal contaminante do material clínico (17).

Outro problema concernente à identificação das espécies de *Fusarium* é a frequência com que mutações ocorrem na natureza e em laboratório. Além

disso, os isolados patogênicos obtidos de plantas apresentam decréscimo ou perda da virulência quando cultivadas em laboratório(3).

Vários estudos recentes têm demonstrado a utilidade de métodos moleculares para a identificação de espécies do gênero *Fusarium* difíceis de distinguir morfológicamente(47). Sob o ponto de vista clínico novos métodos de rápida identificação são necessários no manejo do paciente. Tais métodos estão sendo desenvolvidos e provavelmente substituirão os métodos clássicos de identificação em um futuro próximo (34).

Uma das principais vantagens dos métodos moleculares são a sensibilidade e especificidade, sendo altamente discriminativos, mesmo com espécies intimamente ligadas (34). A identificação de fungos filamentosos por técnica molecular pode ser dependente de seu DNA sequenciado (48), sendo que os métodos baseados em sequenciamento de DNA são muito utilizados para determinação de espécie (6).

Algumas técnicas de PCR envolvem buscas mais específicas e são menos trabalhosas, como o caso da PCR do tipo *nested* onde um produto de ampla especificidade é amplificado e então utilizado como “template” para uma segunda reação de PCR com iniciadores mais específicos. O segundo produto gerado pode ser espécie-específico (48). Apesar das técnicas de PCR espécie-específicas serem geralmente confiáveis, seu uso pode ser limitado quando múltiplas espécies precisam ser diferenciadas (53).

A PCR em tempo real é uma técnica que permite uma análise quantitativa, pois a reação pode ser monitorada em tempo real através de uma molécula reveladora que se liga ao produto de DNA conforme ele se acumula ao longo da reação. A quantidade de produto de DNA amplificado pode ser extrapolada para a quantidade inicial na amostra original. Existem várias vantagens em se utilizar a PCR em tempo real, entre elas a alta especificidade do teste, bem como a possibilidade de identificar espécies desconhecidas. Por permitir a determinação da carga fúngica total contida numa amostra clínica, a PCR em tempo real pode resultar na distinção de uma colonização e uma infecção, uma vez que a infecção produz uma carga maior de organismos e,

portanto, de DNA do que uma colonização. Este teste pode ser considerado rápido e permite que o resultado seja obtido dentro de uma a duas horas da preparação do DNA (48).

Com o advento do sequenciamento de DNA, a comparação de sequências em um ou mais loci tem se tornado um critério importante na distinção de espécies. As sequências mais utilizadas para o gênero *Fusarium* são o fator de alongamento e translocação 1- α (translocation elongation factor 1- α - EF1- α), β -tubulina, e as regiões do espaçador interno transcrito (internal transcribed spacer regions - ITS) 1 e 2 (ITS1 e ITS2). Entretanto, nem todas as sequências funcionam bem para todas as espécies. As regiões ITS não funcionam bem com espécies pertencente ao grupo GFSC (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum* e *F. annulatum*) e a β -tubulina não funciona bem para o FSSC (*Fusarium solani*). A região mais utilizada dentro do gênero *Fusarium* é EF1- α (4) e por isso tem se mostrado útil para estudos filogenéticos e taxonômicos de espécies de *Fusarium*, sendo utilizada na identificação pela base de dados FUSARIUM-ID v.1.0(53). A base de dados FUSARIUM-ID v.1.0 é pública e contém sequências do EF1- α para diversos representantes do gênero *Fusarium*.

Um exemplo de aplicabilidade de uma técnica molecular para identificação fúngica no ambiente foi uma PCR *nested* foi capaz de isolar *Histoplasma capsulatum* diretamente do solo. O método foi capaz de detectar um mínimo de 10 esporos. A busca pelo desenvolvimento do método ocorreu devido à falta de um método rápido, específico e de custo relativamente baixo para inferir um risco de infecção em vários ambientes(54). Outros autores desenvolveram metodologias moleculares para a detecção de diferentes organismos em água e os limites de detecção encontrados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de limite de detecção utilizando técnica de polimerase em cadeia encontrados para estudos da literatura envolvendo outros microorganismos

Organismo	Método	Material	Limite de Detecção
<i>Bordetella pertussis</i>	PCR (55)	Água artificialmente contaminada	<i>B. pertussis</i> : 1 cél / mL = 1000 céls / L
<i>Bordetella paraptussis</i>			<i>B. paraptussis</i> : 0,1 cél / ml = 100 céls / L
<i>Salmonella</i>			
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PCR (56)	Água de irrigação	10UFC/mL = 10.000UFC/L
<i>Vibrio cholerae</i>	PCR (57)	Água marinha	100 células por 250mL = 400UFC/L
<i>Aspergillus</i> spp.	PCR (58)	Sangue	1 cél / mL = 1000 cél / L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RT-PCR (59)	Água Clorada	330 células por reação
<i>Serratia marcescens</i>	RT-PCR (60)	Água marinha	4,1 células por reação

PCR: reação de polimerase em cadeia; RT: tempo real

Já para o gênero *Fusarium*, uma PCR gênero específica foi desenvolvida a partir de sangue. Por extrapolação é possível estimar que a quantidade de DNA genômico em um macroconídio de *F. solani* está entre 0,03 - 0,06pg, dessa forma, o limite de detecção teórico para a PCR desenvolvida pelo autor foi de 5pg, ou seja, 85 macroconídios de *F. solani*. Entretanto, na prática, o limite foi de 1000 esporos do microrganismo(61).

g. Vigilância e Prevenção

Em um ambiente hospitalar com pacientes de alto risco, culturas de vigilância podem ser cruciais na prevenção de infecções oportunistas. Elas têm sido estudadas como um potencial fator preditivo de micoses disseminadas ou invasivas, pois a presença desses organismos no ambiente nosocomial pode preceder o desenvolvimento da infecção. Assim, a vigilância ativa de pacientes de alto risco parece aumentar a detecção dos casos, pois o agente infeccioso já foi detectado nas amostras ambientais de onde o paciente está inserido (16).

Entretanto mais estudos são necessários para o entendimento da fusariose nosocomial. Além disso, tais estudos deveriam ser prospectivos em hospitais com pacientes imunossuprimidos com foco na correlação de espécies de *Fusarium* no sistema de água hospitalar e a incidência da fusariose (23). Assim, é recomendável que os hospitais que apresentam casos de fusariose realizem testes no sistema de distribuição de água para a busca de fungos oportunistas. Dessa forma, se isolados de *Fusarium* forem encontrados, os hospitais devem desenvolver procedimentos para evitar ou até eliminar essa exposição (36).

Dessa forma, para evitar a exposição à água do sistema de distribuição pode-se utilizar uma esponja de banho estéril ao invés de duchas (com o intuito de minimizar a formação de aerossóis) e pode-se também beber água estéril em momentos de imunossupressão importante. A limpeza de superfícies relacionadas com água (como o chão do banheiro) também resulta num decréscimo significativo na contagem de fungos presentes no ar, resultando numa menor exposição aos aerossóis (36).

Apesar do gênero *Fusarium* não ser o fungo filamentoso mais comumente encontrado em infecções em imunocomprometidos, é ainda assim, considerado um importante patógeno, pois está entre os fungos emergentes cuja frequência tem aumentado nos últimos anos, bem como devido a sua resistência a antifúngicos relatada na literatura. Os trabalhos publicados contemplam diversos estudos sobre a detecção das espécies de cepas de *Fusarium* ou o desenvolvimento de PCR panfúngica, entretanto, faltam trabalhos com foco no ambiente (51,19,53,6,62,63,64)

Sabe-se que os métodos moleculares são geralmente considerados mais específicos e sensíveis, mas, ainda assim, a vasta maioria dos estudos utiliza métodos tradicionais de cultura. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de um método molecular diretamente de amostras ambientais para a detecção da menor quantidade possível de células fúngicas presentes no ambiente. Dessa forma será possível determinar com mais precisão e rapidez a real frequência desse microrganismo no meio hospitalar

2. OBJETIVOS

- a. Desenvolver técnica de extração de DNA para detecção de *Fusarium* diretamente em água por PCR.
- b. Comparar a técnica molecular com a técnica de cultura para detecção fúngica em água.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Desenvolvimento da técnica molecular

Diversos métodos “in house” para a extração de DNA fúngico foram testados. As três espécies de *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*) mais comuns em infecções clínicas foram escolhidas para o desenvolvimento do método(65). As seguintes cepas foram utilizadas: *F. moniliforme* ATCC 38159, *F. oxysporum* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031. Elas foram cultivadas em ágar batata (tubo) por 7 dias a 25°C em aerobiose. Dois mililitros de solução salina 0,9% estéril foram pipetados em cada tubo contendo o fungo crescido. Cada tubo foi levemente movimentado para que o conídios se soltassem. Essa suspensão de conídios foi transferida para outro tubo e utilizada para testar cada método de extração. Os iniciadores utilizados para a amplificação do material genético obtido estão listados na tabela 2.

O produto da reação de PCR foi corrido em um gel de agarose 2% e tampão 0,5X. Dois gramas de agarose ultrapura foram adicionados a 100mL de tampão 0,5X e aquecidos em microondas por 90 segundos para completa dissolução da agarose. Dez microlitros de SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados ao recipiente e o mesmo foi levemente mexido para completa dissolução. O conteúdo foi vertido sobre uma cama de cuba eletroforética com os pentes do equipamento. Após o endurecimento do gel o mesmo foi transferido para a cuba eletroforética e as amostras pipetadas nos buracos do gel com Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, CA) na proporção de 1 para 10 v/v. A cuba foi conectada a uma fonte para uma corrida de 45 minutos a 900V. O gel foi então visualizado através de raios ultravioletas no equipamento Alphamager (Alpha Innotech, San Jose, CA) e os parâmetros ajustados para melhor visualização da foto obtida. A Figura 1 contém um esquema dos métodos utilizados.

Figura 1 - Fluxograma dos métodos de extração testados para *Fusarium*

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia para identificação de espécies de *Fusarium*.

Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento esperado	Método em que foi utilizado	Referência
ITS1	TCCGTAGGTG AACCTGCGG	550 - 570pb	1 a 8	(66)
ITS4	TCCTCCGCTT ATTGATATGC		1 a 8	(66)
ITS-Fu-f	CAACTCCCAA ACCCCTGTGA	~389pb	9	(17)
ITS-Fu-r	GCGACGATTA CCAGTAACGA		9	(17)
P28SL	ACAAATTACA ACTCGGGCCC GAGA	~320pb	9 a 12	(5)
P58L	AGTATTCTGG CGGGCATGC CTGT		9 a 12	(5)

Método 1

A suspensão de conídios foi centrifugada por 30 minutos a 6000rpm, parte do sobrenadante foi retirada. Esse processo foi repetido mais duas vezes. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi utilizado para a extração com “kit” comercial illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Uma reação de PCR foi realizada com 5µL do DNA extraído e o par de iniciadores ITS1/4 conforme as tabelas 3 e 4 (66).

Tabela 3 - Reagentes (e suas respectivas concentrações) utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS1/4

Reagente	Concentração
Água	-
Tampão	1X
Cloreto de Magnésio	1,5mM
dNTP mix	200µM
Iniciador ITS1	100nM
Iniciador ITS4	100nM
Taq DNA polimerase	2,5U

Tabela 4 - Tempos e temperaturas utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS1/4

Número de ciclos	Tempo	Temperatura
1	2 minutos	94°C
	30 segundos	94°C
30	90 segundos	50°C
	75 segundos	72°C
1	10 minutos	72°C

Método 2

Uma adaptação de um protocolo manual (67,68) foi testada na suspensão de conídios e “pedaços” de cultura de *Fusarium* (três espécies: *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*). O protocolo seguiu os seguintes passos:

- a) Centrifugação a 13000rpm por 10 minutos;
- b) Adição dos seguintes reagentes Tris 50mM, EDTA 10mM, liticase (*Arthrobacter luteus* - código L4025 - Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 250U/mL, β-mercaptoetanol 10%;
- c) Incubação a 37°C por 2h30;
- d) Adição de 12µL de SDS a 12%;

- e) Adição de uma solução de proteinase K 20mg/mL;
- f) Incubação a 65°C por 45 minutos;
- g) Retirada de 40% de sobrenadante;
- h) Adição do mesmo volume de isopropanol;
- i) Refrigeração “overnight” a -20°C;
- j) Centrifugação a 13000rpm por 20 minutos;
- k) Adição de 500µL de etanol 70%;
- l) Centrifugação a 13000rpm por 5 minutos;
- m) Secar em banho seco a 70°C por 30 minutos;
- n) Adicionar uma solução de Tris 100mM e EDTA 10mM.

O DNA extraído foi submetido à leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware). Uma reação de PCR foi realizada com o material genético com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Método 3

A suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* foi centrifugada por 30 minutos a 6000rpm, parte do sobrenadante foi retirada. Esse processo foi repetido mais duas vezes. Uma etapa com o equipamento Tissue LT (QIAGEN, Germany) foi acrescentada. Foram acrescentadas micropérolas de vidro à suspensão e o tubo foi submetido ao aparelho supracitado a 40Hz por 3 minutos. O precipitado resultante foi utilizado para extração de duas formas: com “kit” comercial illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) e com o método 2 a partir da etapa b). Uma reação de PCR foi realizada com o DNA extraído com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Método 4

A suspensão de conídios de *Fusarium solani* foi submetida a dois pulsos de 3 segundos no microondas. Foram acrescentadas micropérolas de vidro à suspensão e o tubo foi submetido ao aparelho supracitado a 40Hz por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado para extração de duas formas:

com “kit” comercial illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) e com o método 2 a partir da etapa b). Uma reação de PCR foi realizada com o DNA extraído com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Método 5

Outra adaptação do protocolo manual foi testada em suspensões de conídios de *Fusarium* (três espécies: *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*).

- a) Centrifugação a 13000rpm por 10 minutos;
- b) Adição dos seguintes reagentes Tris 50mM, EDTA 10mM, liticase (código L4276 - Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 250U/mL, β-mercaptoetanol 10%;
- c) Agitar em vórtex por 3 minutos;
- d) Incubação a 37°C por 2h30;
- e) Colocar em banho seco a 85°C por 10 minutos;
- f) Adição de 12μL de SDS a 12%;
- g) Adição de uma solução de proteinase K 20mg/mL;
- h) Incubação a 65°C por 45 minutos;
- i) Centrifugação a 12000rpm por 10 minutos;
- j) Retirada de 40% de sobredanante;
- k) Adição do mesmo volume de isopropanol;
- l) Refrigeração “overnight” a -20° C;
- m) Centrifugação a 13000rpm por 20 minutos;
- n) Adição de 500μL de etanol 70%;
- o) Centrifugação a 13000rpm por 5 minutos;
- p) Adicionar 100μL da solução de Tris 100mM e EDTA 10mM

O DNA extraído foi submetido à leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware)®. Uma reação de PCR foi realizada com o material genético com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Método 6

Pedaços de cultura de *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*) crescidos em meio BHI por 5 dias a 37°C foram utilizados para trituração com

nitrogênio líquido. Foram adicionados 5mL de tampão PBS 0,1M (pH6,0) ao fungo pulverizado e a suspensão foi centrifugada a 4500rpm por 15 minutos. Parte do sobrenadante foi desprezada e a amostra foi novamente centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “kit” comercial illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) foi utilizado para finalizar a extração. O DNA extraído foi submetido à leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware)®. Uma reação de PCR foi realizada com o material genético com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Método 7

Suspensões de conídios foram preparadas conforme já descrito diversas concentrações com o auxílio do equipamento Densicheck plus (bioMérieux). Suspensões de conídios de *Fusarium oxysporum* (nas concentrações correspondentes aos números 0,5; 1; 2; e 3 da escala de Mac Farland), *Fusarium solani* (correspondente a 0,5 na escala de Mac Farland), *Aspergillus flavus* (correspondente a escala 1 de Mac Farland) e *Aspergillus fumigatus* (correspondente a escala 2 de Mac Farland) foram submetidas a 98°C por 15 minutos e a -80°C “overnight”. As amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 5 minutos. O precipitado foi descartado. O DNA extraído foi submetido à leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware). Uma reação de PCR foi realizada com o material genético com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Método 8

Suspensões de conídios de *Fusarium* (*F. moniliforme* e *F. oxysporum*) foram utilizadas para adição de tampão PBS 0,1M (pH 6,0) e liticase. Foram utilizadas duas liticases em paralelo (código L4025 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO ou código L1412 - Sigma-Aldrich, St Louis, MO). As amostras foram incubadas a 25°C por 90 minutos, depois a 37°C por 30 minutos e centrifugadas a 13000rpm por 20 minutos. O sobrenadante e o precipitado foram utilizados em paralelo para extração com “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Um esquema das principais

etapas realizadas neste método está representado na Figura 1. O DNA extraído foi utilizado para leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e reação de PCR com o par de iniciadores ITS1/4 conforme já descrito acima.

Figura 2 - Esquema das principais etapas do Método 8 de extração de DNA de espécies de *Fusarium*

Método 9

Suspensões de conídios de *Fusarium* (*F. moniliforme* e *F. oxysporum*) foram utilizadas para adição de tampão PBS 0,1M (pH: 6,0) e 100U de liticase (código L4025 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO). As amostras foram incubadas a 25°C por 90 minutos, depois a 37°C por 30 minutos e centrifugadas a 14000rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado para extração com “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA extraído foi utilizado para leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e reação de PCR com os pares de iniciadores 28SL/58L (Tabelas 5 e 6) (5) e ITS-Fu-f/r (Tabelas 7 e 8) (69). O método foi repetido mais 2 vezes, além de ser testado para *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus arrhizus* e *Penicillium citrinum*.

Tabela 5 - Reagentes (e suas respectivas concentrações) utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores P28SL/P58L para amplificação de DNA do gênero *Fusarium*

Reagente	Concentração
Água	-
Tampão	1X
Cloreto de magnésio	1,5mM
dNTP mix	200µM
Iniciador P28SL	100nM
Iniciador P58L	100nM
Taq DNA polimerase	2,5U

Tabela 6 - Tempos e temperaturas utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores P28SL/P58L para amplificação de DNA do gênero *Fusarium*

Número de ciclos	Tempo	Temperatura
1	5 minutos	94°C
	1 minuto	94°C
40	1 minutos	68°C
	1 minutos	72°C
1	10 minutos	72°C

Tabela 7 - Reagentes (e suas respectivas concentrações) utilizados na reação de reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS-Fu-f/-r para amplificação de DNA do gênero *Fusarium*

Reagente	Concentração
Água	-
Tampão	1X
Cloreto de magnésio	1,75mM
dNTP mix	200µM
Iniciador P28SL	100nM
Iniciador P58L	100nM
Taq DNA polimerase	2,5U

Tabela 8 - Tempos e temperaturas utilizados na reação em cadeia da polimerase com os iniciadores ITS-Fu-f/-r para amplificação de DNA do gênero *Fusarium*

Número de ciclos	Tempo	Temperatura
1	2 minutos	95°C
	1 minuto	94°C
30	30 segundos	58°C
	1 minutos	72°C
1	10 minutos	72°C

Método 10

Suspensões de conídios foram preparadas, conforme já descrito, em diversas concentrações com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Um mililitro de cada suspensão de conídios (*Fusarium solani* - na concentração de 10^4 e *Fusarium oxysporum* - em duas concentrações: 10^3 e 10^6) foram adicionadas a um litro de água milliQ estéril. Cada litro foi filtrado em um filtro de 47 mm de porosidade. Cada filtro foi então triturado com nitrogênio líquido. Foram adicionados 3 mL de tampão PBS 0,1M (pH6,0) ao filtro pulverizado e 100U de liticase (código L4025 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO). As amostras foram incubadas a 25°C por 90 minutos, depois a 37°C por 30 minutos e centrifugadas a 14000rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado para extração com “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA extraído foi utilizado em para leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e reação de PCR com o par de iniciadores P28SL/58L.

Método 11

Suspensões de conídios foram preparadas, conforme já descrito, em diversas concentrações com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Três suspensões de conídios de *Fusarium oxysporum* (na concentração de 10^6) foram adicionadas a um litro de água milliQ estéril em três volumes diferentes: 1mL, 0,5mL e 0,25mL. Cada litro foi filtrado em um filtro de 47 mm de

porosidade. O filtro foi transferido para um tubo tipo Falcon com pérolas de vidro. Dois mililitros de tampão PBS 0,1M (pH: 6,0) foram adicionados ao tubo. O tubo foi imerso em nitrogênio líquido por 15 segundos e agitado por 30 segundos. Este processo foi repetido mais duas vezes. Cem unidades de liticase (código L4025 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO) foram adicionadas às amostras. Elas foram incubadas a 25°C por 90 minutos, depois a 37°C por 30 minutos e centrifugadas a 14000rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado para extração com “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA extraído foi utilizado para leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e reação de PCR com o par de iniciadores 28SL/58L.

Método 12

Suspensões de conídios foram preparadas, conforme já descrito, em diversas concentrações com o auxílio do equipamento Densichek plus (bioMérieux, Durham, NC). Um mililitro de 3 suspensões de conídios de *Fusarium oxysporum* (em concentrações diferentes correspondentes a 0,5; 0,4 e 0,3 na escala de Mac Farland) foram adicionadas a um litro de água milliQ estéril. Cada litro foi filtrado em um filtro de 47 mm de porosidade. O filtro foi transferido para um tubo cônico com pérolas de vidro. O tubo foi imerso em nitrogênio líquido por 15 segundos e agitado por 30 segundos. Este processo foi repetido mais duas vezes. Dois mililitros de tampão de extração e 100U de liticase (código L4025 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO) foram adicionados aos tubos contendo filtros pulverizados. O tampão de extração continha: 0,9M sorbitol, 0,1M Tris-HCl pH8,0 e 0,1M EDTA. Elas foram incubadas a 25°C por 90 minutos, depois a 37°C por 30 minutos e centrifugadas a 13000rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado para extração com “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA extraído foi utilizado para leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e reação de PCR com o par de iniciadores 28SL/58L.

O método foi repetido para as espécies de *Fusarium moniliforme* e *Fusarium solani* sem dosagem de concentrações.

b. Determinação do limite de detecção

O método 12 de extração de DNA foi padronizado e comparado ao método de cultura para detecção de *Fusarium* em água MilliQ estéril. Foram utilizadas três espécies de *Fusarium* (*F. moniliforme* ATCC 38159, *F. oxysporum* ATCC 48112, *F. solani* ATCC 36031). Elas foram cultivadas em ágar batata (tubo) por 7 dias a 25°C em aerobiose. Os conídios da cultura foram extraídos introduzindo dois mililitros de solução salina 0,9% estéril no tubo de ágar batata e passados para um tubo estéril. Essa suspensão de conídios foi utilizada para determinar os limites de detecção dos métodos de cultura e extração. Para ambos os meios de cultura testados (PDA e DRBC) foram utilizadas as seguintes concentrações: 1000 células/litro, 500 células/litro, 400 células/litro, 20 células/litro, 10 células/litro, 5 células/litro, 1 células/litro. Para o método de extração de DNA foram utilizadas as seguintes concentrações: 1000 células/litro, 500 células/litro, 400 células/litro, 300 células/litro, 200 células/litro, 100 células/litro, 50 células/litro, 25 células/litro, 10 células/litro, 5 células/litro. Foram utilizados como controle negativo DNA extraído dos seguintes organismos: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *Aspergillus flavus* (204304) e *Penicillium citrinum* (28752).

c. Utilização da técnica molecular em situação real

Em janeiro de 2013 um caso de fusariose foi diagnosticado em um paciente na Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O método desenvolvido foi utilizado para testar amostras ambientais de água de chuveiro e pia de diversos quartos.

Assim, o método molecular desenvolvido foi testado em uma situação real. Foram coletadas amostras de água e “swab”. A coleta das amostras de água foi feita utilizando-se um recipiente previamente autoclavado e a água foi coletada após 15 segundos de água correndo. Os “swabs” das torneiras ou dos ralos foram coletados após a coleta de água para que as superfícies já estivessem úmidas. Os “swabs” foram esfregados na parte interna da torneira de forma circular ou na parte interna do ralo de forma também circular.

A extração de DNA a partir da água foi feita conforme descrito no método 12, mas com as seguintes alterações: não houve inoculação e ambos os iniciadores gênero-específicos citados anteriormente no método 9 foram testados.

A extração de DNA a partir de “swabs” foi feita de forma a adaptar o método 12 para “swabs”. Cada “swab” foi imerso em dois mililitros de tampão de extração (contendo 0,9M sorbitol, 0,1M Tris-HCl pH8,0 e 0,1M EDTA) e 100U de liticase (código L4025 – Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cada tubo foi incubado a 25°C por 90 minutos, depois a 37°C por 30 minutos e centrifugadas a 13000rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi utilizado para extração com “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA extraído foi utilizado para leitura pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e reação de PCR com os pares de iniciadores 28SL/58L e ITS-Fu. Para o iniciador ITS-Fu uma reação “nested” também foi realizada com as mesmas condições da primeira etapa.

4. RESULTADOS

a. Desenvolvimento da técnica molecular

A reação de PCR foi negativa para os métodos 1 a 5. Para o método 6 , apenas 2 das 3 espécies foram amplificadas (*Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*). O DNA de todas as cepas testadas foi amplificado pelos métodos de 7, 8 e 9. No método 10, no entanto, apenas o DNA extraído a partir da água que foi inoculada com a suspensão não diluída de *Fusarium oxysporum* foi amplificado. No método 11, somente o DNA extraído da água com um mililitro de suspensão foi amplificado. Finalmente a amplificação teve sucesso para todas as cepas testadas no método 12. A tabela 9 abaixo resume os resultados obtidos para os 12 métodos de extração de DNA testados.

Tabela 9 - Resumo dos resultados das leituras espectrofotométricas e de reação de polimerase em cadeia (PCR) das amostras utilizadas no desenvolvimento do método de extração de DNA

Método	<i>Fusarium moniliforme</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium solani</i>	
	Concentração de DNA (µg/µL)	Reação de PCR	Concentração de DNA (µg/µL)	Reação de PCR	Concentração de DNA (µg/µL)	Reação de PCR
1	Não detectada	Negativa	Não realizada	Negativo	Não realizada	Negativo
2	Não detectada	Negativa	Não detectada	Negativo	Não detectada	Negativo
3	Não realizada	Não realizada	Não realizada	Negativo	Não realizada	Negativo
4	Não realizada	Não realizada	Não realizada	Não	Não realizada	Negativo
5	Não detectada	Negativo	Não detectada	Negativo	Não detectada	Negativo
6	2,5	Negativo	3,1	Positivo	2,8	Positivo
7	Não realizada	Não realizada	4,3 - 17,9	Positivo	5,9	Positivo
8	8,0 - 19,1	Positivo	7,8 - 19,4	Positivo	Não Realizada	Não Realizada
9	12	Positivo	16,4	Positivo	14,3	Positivo
10	Não realizada	Não realizada	Concentração (10^3): 1,8 Concentração (10^6): 2,3	10^6 : Positivo 10^3 : Negativo	1,6	Negativo
11	Não realizada	Não realizada	1mL:3,3 0,5mL: 3,8 0,25mL: 2,8	Positivo	Não realizada	Não realizada
12	Não realizada	Não realizada	0,5Mac Farland: 1,6 0,4 Mac Farland: 2,0 0,3 Mac Farland: 1,8	Positivo	Não realizada	Não realizada

Método 1

Não houve a formação de um precipitado visível após a centrifugação. A extração foi feita após a retirada do sobrenadante cuidadosamente, de forma que se houvesse um precipitado invisível esse não fosse sugado ao pipetar. Ainda assim, a reação de PCR foi negativa.

Método 2

O DNA extraído não foi detectado e não houve amplificação na reação de PCR. O método foi repetido 3 vezes sempre resultando em não detecção pela leitura espectrofotométrica não amplificação do material genético.

Métodos 3 e 4

A reação de PCR foi negativa.

Método 5

O DNA extraído resultou em valores não detectados e não houve amplificação na reação de PCR. O método foi repetido 2 vezes sempre resultando em valores não detectáveis e não amplificação do material genético.

Método 6

O DNA extraído resultou em valores positivos (Tabela 10) e houve amplificação na reação de PCR para as espécies *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (Figura 2).

Tabela 10 - Resultados das leituras por espectrofotometria pelo equipamento Nanodrop® para o método 6 de extração de DNA de espécies de *Fusarium* em água

Amostra	Concentração (ng/μL)
<i>F. moniliforme</i>	2,5
<i>F. oxysporum</i>	3,1
<i>F. solani</i>	2,8

Figura 3 - Resultado da reação em cadeia da polimerase realizada para o método 6¹

Método 7

O DNA extraído resultou em valores positivos (Tabela 11) e houve amplificação na reação de PCR para as três espécies testadas.

¹ 1) Água; 2) Controle negativo Inicial; 3) *F. moniliforme*; 4) *F. oxysporum*; 5); *F. solani*; 6) Controle positivo; 7) Controle negativo Final

Tabela 11 - Resultados das leituras por espectrofotometria pelo equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) para o método 7 de extração de DNA de espécies de *Fusarium* em água

Amostra	Concentração (ng/ μ L)
<i>F. oxysporum</i> (número 3 da escala de Mac Farland)	2,96
<i>F. oxysporum</i> (número 2 da escala de Mac Farland)	2,04
<i>F. oxysporum</i> (número 1 da escala de Mac Farland)	0,96
<i>F. oxysporum</i> (número 0,5 da escala de Mac Farland)	0,55
<i>F. solani</i> (número 0,5 da escala de Mac Farland)	0,50
<i>Aspergillus flavus</i> (número 1 da escala de Mac Farland)	1,05
<i>Aspergillus fumigatus</i> (número 2 da escala de Mac Farland)	1,94

Figura 4 - Reação em cadeia da polimerase utilizando o método 7²

Método 8

Os resultados da leitura por espectrofotometria foram positivos (Tabela 12). Além disso, a razão entre as leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda 260/280nm foi acima de 1,5, o que indica uma

² 1) *F. solani* 0,5MF; 2) *F. oxysporum* 0,5MF; 3) *F. oxysporum* 1MF; 4) *F. oxysporum* 2MF; 5) *F. oxysporum* 3MF; 6) *Aspergillus flavus* 1MF; 7) *Aspergillus fumigatus* 2MF; 8) Controle negativo inicial; 9) Controle negativo final; 10) Água

qualidade razoável de DNA recuperado. A reação de PCR amplificou todas as amostras.

Tabela 12 - Resultados de leituras por espectrofotometria pelo equipamento Nanodrop® para concentração de material genético e qualidade do mesmo (relação 260/280) após o método 8 de extração de DNA de espécies de *Fusarium* em água.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Relação 260/280
<i>F. oxysporum</i> (liticase 4025) - precipitado	19,0	1,65
<i>F. oxysporum</i> (liticase 1412) – precipitado	19,4	1,60
<i>F. moniliforme</i> (liticase 1412) – precipitado	18,1	1,50
<i>F. moniliforme</i> (liticase 4025) – precipitado	16,0	1,58
<i>F. oxysporum</i> (liticase 4025) - sobrenadante	10,4	1,53
<i>F. oxysporum</i> (liticase 1412) – sobrenadante	7,8	1,68
<i>F. moniliforme</i> (liticase 1412) – sobrenadante	8,0	1,81
<i>F. moniliforme</i> (liticase 4025) - sobrenadante	9,1	1,65

Figura 5 - Revelação do gel da reação em cadeia da polimerase utilizando o método 8³

Método 9

O método 9 foi realizado três vezes. A reação PCR amplificou todas as amostras conforme as Figuras 5 e 6 da primeira vez. Nas outras duas repetições, somente o iniciador P28SL/P58SL foi capaz de amplificar o DNA. Os outros fungos filamentosos testados para verificar a especificidade dos iniciadores não apresentaram banda em nenhuma reação de PCR realizada.

³ 1) *F. oxysporum* (liticase 4025) - precipitado; 2) *F. oxysporum* (liticase 1412) – precipitado; 3) *F. moniliforme* (liticase 1412) – precipitado; 4) *F. moniliforme* (liticase 4025) – precipitado; 5) *F. oxysporum* (liticase 4025) - sobrenadante; 6) *F. oxysporum* (liticase 1412) – sobrenadante; 7) *F. moniliforme* (liticase 1412) – sobrenadante; 8) *F. moniliforme* (liticase 4025) - sobrenadante; 9) Controle positivo; 10) Controle inicial; 11) Controle final; 12) água. Par de iniciadores: ITS1/4.

Figura 6 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 9 com o par de Iniciadores: P28SL/P58L⁴

Figura 7 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 9 com os iniciadores: ITS-FU⁵

Método 10

Todas as amostras apresentaram resultados positivos na leitura espectrofotométrica. Somente a amostra de *Fusarium oxysporum* (10^6) foi amplificada na reação de PCR conforme Figura 7.

⁴ 1) *F. oxysporum*; 2) *F. moniliforme*; 3) Controle Positivo; 4) Controle inicial; 5) Controle final; 6) água

⁵ 1) *F. oxysporum*; 2) *F. moniliforme*; 3) Controle Positivo; 4) Controle inicial; 5) Controle final; 6) água

Figura 8 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 10⁶

Método 11

Todas as amostras apresentaram resultados positivos na leitura espectrofotométrica. Somente a amostra de água em que se havia adicionado 1mL da suspensão foi amplificada na reação de PCR.

Figura 9 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 11⁷

⁶ 1) *F. oxysporum* 10⁴; 2) *Fusarium oxysporum* 106; 3) *Fusarium solani*; 4) Controle positivo; 5) Controle negativo; 6) Água

⁷ 1) *F. oxysporum* (0,25mL); 2) *F. oxysporum* (0,5mL); 3) *F. oxysporum* (1mL); 4) Controle positivo; 5) Controle inicial; 6) Controle final; 7) Água; PM: peso molecular

Método 12

A reação de PCR amplificou todas as amostras das três espécies conforme a Figura 9.

Figura 10 - Revelação do gel contendo “amplicons” da reação em cadeia da polimerase após extração com método 12⁸

b. Determinação do limite de detecção

O método de extração escolhido para a determinação do limite de detecção foi o método 12. Os resultados positivos e negativos dos experimentos de cultura e PCR estão listados nas tabelas 13 e 14 por concentração (células por litro). O método molecular necessitou de dois dias de trabalho para a obtenção de um resultado enquanto o método molecular necessitou de 2 semanas para a obtenção do resultado.

⁸ 1) *F. oxysporum* 0,3MF; 2) *F. oxysporum* 0,4MF; 3) *F. oxysporum* 0,5MF; 4) Controle Positivo; 5) Controle inicial; 6) Controle final; 7) Água

Tabela 13 - Resultados de detecção de *Fusarium* spp. pelo método de reação em cadeia da polimerase em água artificialmente inoculada com concentrações conhecidas do fungo

Concentração (células/litro)	Amostras positivas / amostras testadas			Número total de amostras estudadas
	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	
1000	3/3	3/3	3/3	9
500	3/3	3/3	2/3	9
400	2/3	2/3	3/3	9
300	2/3	2/3	2/3	9
200	3/3	3/3	3/3	9
100	2/3	2/3	2/3	9
50	2/3	1/3	3/3	9
25	2/3	3/3	1/3	9
20	1/3	1/3	0/3	9
10	3/3	1/3	1/3	9
1	0/3	0/3	0/3	9
Número total de amostras estudadas de água artificialmente inoculadas				99

Tabela 14 - Resultados de detecção de *Fusarium* spp. pelo método de cultura nos meios de cultura ágar dextrose batata e ágar dicloran rosa bengala em água artificialmente inoculada com concentrações conhecidas do fungo

Concentração (células/litro)	Amostras positivas / amostras testadas						
	Ágar batata dextrose			Ágar dicloran rosa bengala			Número total de amostras estudadas
	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	
1000	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	18
500	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	18
400	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	18
300	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	18
200	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	18
20	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	18
10	3/3	2/3	1/3	3/3	3/3	3/3	18
5	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	18
1	2/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	18
Número total de amostras estudadas de água artificialmente inoculadas							162

c. Utilização em condições reais

Em janeiro de 2013 um caso de fusariose foi diagnosticado em um paciente na Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram colhidas amostras do quarto em que o paciente com fusariose estava internado e também de 3 outros quartos.

As amostras coletadas e seus resultados estão listados na tabela 15. A cultura foi realizada com o meio de cultura PDA.

Tabela 15 - Resultados de culturas e testes moleculares realizados em água e “swab” de superfícies da unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, utilizando-se os pares de iniciadores ITS-Fu (normal e “nested”) e P28SL/P58L

Quarto	Material coletado	Resultados			
		Cultura (PDA)	PCR (iniciador ITS-Fu)	PCR <i>nested</i> (iniciador ITS-Fu)	PCR (iniciador: P28SL/P58L)
1 (paciente com fusariose)	Água	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	Swab de torneira	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Swab de ralo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
2	Água	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Swab de torneira	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Swab de ralo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Água	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
	Swab de torneira	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	Swab de ralo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Água	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
	Swab de torneira	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	Swab de ralo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

5. DISCUSSÃO

O gênero *Fusarium* é considerado um fungo filamentoso de importância clínica em pacientes imunocomprometidos, pois apresenta uma alta taxa de mortalidade que pode chegar a 100%, muitas vezes pela demora do seu diagnóstico (6). Isto pode ocorrer porque a detecção de fungos filamentosos como do gênero *Fusarium* costuma ser feita a partir da cultura que necessita de pelo menos cinco dias para a identificação por observação morfológica (34). Além disso, esse gênero costuma ser resistente à maioria dos antifúngicos (6), o que levanta a importância da vigilância ativa como forma de prevenção da forma disseminada da fusariose.

A epidemiologia das infecções fúngicas sistêmicas em pacientes transplantados tem, nos últimos anos, mudado significativamente. O gênero *Fusarium* está entre os fungos oportunistas cuja incidência tem aumentando (21) e alcançou 11,33 casos por 1000 transplantados (14). A incidência pode parecer pequena, mas considerando-se que a primeira fusariose disseminada foi descrita em 1973 (22) e a partir de então vários outros casos foram relatados, a incidência desse gênero tem aumentado e por isso, deve ser foco de atenção.

Em um ambiente hospitalar com pacientes de alto risco, culturas de vigilância podem ser cruciais na prevenção de infecções oportunistas. Entretanto a cultura, tanto para o diagnóstico quanto para a vigilância do meio ambiente, é muito demorada, além de ser inespecífica em comparação com métodos moleculares em geral (48). Vários estudos recentes têm demonstrado a utilidade de métodos moleculares para a identificação de espécies do gênero *Fusarium* (47). Tais métodos estão sendo desenvolvidos e provavelmente substituirão os métodos clássicos de identificação em um futuro próximo (34). Assim o presente trabalho se propôs a desenvolver um método molecular baseado em PCR para a detecção mais eficiente do gênero *Fusarium*.

A extração de DNA objetiva a obtenção de DNA purificado para realização de técnicas moleculares (como, por exemplo, uma PCR). A maioria dos

protocolos de extração consiste em duas etapas: a primeira geralmente consiste em uma lise celular e solubilização do DNA e a segunda na remoção dos contaminantes. Essa remoção pode ser química ou enzimática, e os contaminantes são, via de regra, outras organelas e moléculas presentes na célula que estão suspensas ou dissolvidas juntamente com o DNA(70). Além disso, em amostras ambientais (como solo e água) ou clínicas (sangue) outros componentes do meio podem estar presentes. Em amostras de solo, substâncias húmicas e fenólicas são comuns e podem dificultar a extração de DNA (71) por inibir a digestão enzimática (72). Tais substâncias húmicas podem estar presentes em água também.

O isolamento do DNA é a etapa inicial e crucial para a identificação genética. Por isso, vários estudos já foram conduzidos com o intuito de desenvolver métodos de extração de DNA a partir de amostras ambientais, clínicas ou suspensões contendo células fúngicas de vários gêneros (73).

Várias empresas oferecem diversos “kits” comerciais para o isolamento de DNA para diversos tipos de organismos a partir de vários tipos de amostras. Os “kits” comerciais possuem a vantagem de serem mais rápidos, de fácil manuseio e não requerem muita infraestrutura. Assim, o “kit” de extração de DNA de eucariotos disponível no laboratório foi testado em uma suspensão de células. No método 1 a suspensão de conídios foi centrifugada por 30 minutos a 6000rpm com o intuito de concentrá-los no fundo do tubo para a extração com o “kit” comercial.

A velocidade de 6000rpm foi utilizada, pois um volume de 50 mL de suspensão foi utilizado e a centrífuga disponível para esse volume somente funcionava até uma rotação de 6000rpm. Entretanto a velocidade foi, provavelmente, insuficiente para que os conídios fossem depositados no fundo do tubo cônico, uma vez que não houve a formação de precipitado visível e o eluído não resultou em amplificação pela PCR. Uma etapa de centrifugação prévia à extração não foi mencionada em outros estudos (5,17,74,47,49).

O método pode não ter funcionado pela baixa rotação ou pelo “kit” comercial, já que em outro estudo, uma série de “kits” comerciais em amostras

de água e esgoto não foram eficazes na extração de DNA para o micro-organismo estudado (75). Nesse mesmo estudo, o método mais eficaz foi um método “in house” com uma enzima lítica (75). Além disso, o autor relata que muitos “kits” comerciais não são apropriados para amostras contendo poucas moléculas de DNA. Assim, um novo método “in house” foi testado no laboratório.

A centrifugação inicial foi aumentada para 13000rpm para um volume menor de suspensão por 10 minutos para garantir que um precipitado fosse formado. A extração de DNA foi baseada em quebra enzimática e com detergente com ajuda do β -mercaptoetanol.

A eficácia do processo de extração de DNA pode afetar a interpretação dos resultados obtidos de experimentos realizados a partir do DNA extraído. A pureza do DNA obtido pode ser um fator interferente, portanto, diferentes formas de purificação podem ser utilizadas. Essa purificação pode ser realizada antes ou durante o processo de extração (76). No método 2 o princípio da purificação utilizado foi a precipitação com isopropanol e etanol.

O método 2 foi testado com o intuito de aumentar a recuperação de DNA, pois existe, na literatura, a menção de que “kits” comerciais recuperam menos DNA do que métodos “in house”. Entretanto, os “kits” comerciais geram soluções de DNA mais purificadas e, portanto, melhores para serem utilizadas na PCR. Entretanto, a solução final foi submetida à leitura espectrofotométrica para verificar se o método havia sido capaz de extrair DNA, e a leitura resultou em valores não detectáveis. Assim, pode-se inferir que o Método 2 não foi capaz de extrair o DNA das células fúngicas presentes na suspensão inicial.

“Kits” comerciais resultam, geralmente, em DNA de melhor qualidade quando comparados com métodos químicos (CTAB - brometo de cetil-trimetilamônio, fenol/clorofórmio e etanol) ou físicos (trituração, sonicação, nitrogênio líquido e “bead beating”), pois estes últimos podem danificar também o DNA, reduzindo a sua qualidade(77). O método mais encontrado na literatura para extração de DNA fúngico é à base de clorofórmio (73,78,72,76,79). O uso deste método é, entretanto, obsoleto, pois é tóxico e cancerígeno. Além disso,

esse método é trabalhoso, demorado, gera resíduos perigosos e a quantidade de DNA extraída varia de um analista para outro (76). Um estudo que utilizava a extração de DNA com fenol clorofórmio em conjunto com um “kit” comercial foi considerado não reprodutível, provavelmente pela perda de DNA associada às várias transferências de tubos durante a extração (75). Já o método físico “bead beating” citado acima consiste em um aparelho de vibração que promove a lise e homogeneização de amostras biológicas através dos efeitos da vibração do aparelho e da moagem pelas “beads” contidas no tubo (80). Esse método foi, em combinação com a utilização de proteinase K, o melhor em uma comparação de métodos de extração de DNA para o protozoário *Thraustochytrids* (77). O método também foi a melhor escolha como pré-tratamento para extração de DNA bacteriano em amostras de fezes, seguido da utilização de “kit” comercial(80), bem como para a extração de microbiota a partir de amostras de solo (81). O equipamento TissueLyzer LT (QIAGEN, Germany) utilizado no método de “bead beating” também foi usado para plantas (que possuem uma estrutura de parede e membrana celular similares aos fungos) e foi capaz de simplificar o processo de extração de DNA eficazmente (82). Além disso, o método já foi utilizado em fungos filamentosos como *Aspergillus* (83) e *Fusarium* (78). Assim, o método seguinte testado (Método 3) foi baseado na lise mecânica através de “bead beating” seguida de “kit” comercial para obtenção de um DNA purificado que possa ser utilizado na reação de PCR.

Dessa forma, o equipamento TissueLyzer LT (QIAGEN, Germany) foi adicionado ao método 1. Entretanto, não foi suficiente para a extração do DNA, pois a reação de PCR foi negativa. Por causa da necessidade de romper a parede celular fúngica, técnicas especializadas são necessárias tais como: nitrogênio líquido, “bead beating”, lise enzimática, sonicação ou micro-ondas (73). Alguns grupos de micro-organismos só podem ser satisfatoriamente lisados através da integração de diferentes métodos, uma vez que há na literatura relatos de métodos isolados que não foram capazes de extrair DNA fúngico (84). Isso é consistente com relatos de que células fúngicas são mais difíceis de romper (84). Assim, outra etapa de lise foi incorporada ao método:

micro-ondas. Esse princípio já foi utilizado como pré-tratamento para amostras parafinizadas com o intuito de remover a parafina (85), mas também como parte do processo de extração de leveduras e bactérias (81,71). Para bactérias gram positivas o aquecimento em forno microondas foi a técnica mais eficiente, além de resultar em uma maior quantidade de DNA mais puro e íntegro que outras técnicas (71). Entretanto, a extração do DNA ainda não foi exitosa. Por esse motivo, no método 4 duas técnicas de lise mecânica (micro-ondas e “bead beating”) foram utilizadas antes do “kit” comercial.

O método 4 não foi capaz de extrair DNA para a reação de PCR. A eficácia e utilidade do método de “bead beating” é controverso na literatura. Ele já foi utilizado para diversos tipos de organismos tais como bactéria e levedura (81), swab clínico (86), protozoário (82), vírus em plantas (87) e até fungos filamentosos (83,78). A técnica foi considerada a melhor opção em alguns casos (81,77,82,78), mas não ofereceram qualquer vantagem em outros (83,87). Esse pré-tratamento mecânico antes da utilização do “kit” comercial facilita a lise e homogeneização do material, levando a uma maior recuperação de DNA (80). O método gera, entretanto, um DNA mais curto, fragmentado e danificado (81,84), levando a necessidade de um DNA íntegro para melhor desenvoltura de métodos moleculares posteriores (71). O intuito da utilização de “kit” comercial (que é mais caro) foi a obtenção de DNA de melhor qualidade (77) para favorecer a reação de PCR, o que não estava acontecendo. Assim, a atenção deste estudo voltou-se para o método “in house” já testado (método 2), mas com algumas modificações.

Células fúngicas são difíceis de romper, pois possuem uma parede resistente que dificulta o processo de extração do DNA. Assim 3 enzimas líticas foram testadas: Liticase de *Arthrobacter luteus* (L4025), Liticase de *Oerskovia xanthineolytica* (L4276) e Liticase de *Trichoderma harzianum* (L1412). As enzimas L4025 e L4276 hidrolisam ligações poli- β (1 $\rightarrow$ 3)-glicose presentes na parede do fungo a 25°C formando esferoplastos que são subsequentemente lisados liberando o DNA da célula. A enzima L1412 também possui atividade sobre as ligações poli- β (1 $\rightarrow$ 3)-glicose mas a uma temperatura de 37°C e também apresenta atividade de quitinase a 25°C e protease a 37°C. Uma vez

que os métodos 1 a 4 não apresentaram reação de PCR positiva, a enzima lítica L4025 de *Arthrobacter luteus* utilizada no método 3 foi substituída, no método 5, pela L4276 de *Oerskovia xanthineolitica*. Uma vez que a susceptibilidade de fungos filamentosos às enzimas líticas para leveduras é menor (88) provavelmente devido à diferença entre as estruturas celulares entre leveduras e fungos filamentosos, uma nova β - 1,3 - glucanase foi testada para ver se a recuperação de DNA se mostraria mais eficiente e a posterior PCR seria positiva. Mesmo com todas as alterações, o DNA extraído resultou em valores não detectados pela leitura do equipamento Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware) e não houve amplificação na reação de PCR.

Em vista da dificuldade de extração de gênero *Fusarium* descrito neste trabalho até o momento, uma nova busca foi realizada na literatura científica com o intuito de verificar os métodos de extração utilizados para *Fusarium* spp. ou outros fungos filamentosos.

Dois métodos foram escolhidos para serem testados: choque térmico (74) e trituração de botão fúngico (6) como pré-tratamento. O método do choque térmico foi escolhido para ser testado devido à sua extrema facilidade de execução. Já a trituração foi escolhida, por ser o método mais recente encontrado e utilizado em alguns estudos de *Fusarium* (20,50). Dessa forma, os métodos 6 e 7, correspondem aos métodos de trituração (6) associado a “kit” comercial e choque térmico (74), respectivamente. O método 6 foi eficiente para 2 das 3 espécies, mas foi descartado, pois não se adequava ao objetivo de desenvolver um método molecular diretamente da água. Além disso, o método, apesar de ter sido o primeiro capaz de extrair DNA, apresentou resultados baixos, insuficientes ao propósito deste estudo. A esta baixa recuperação de DNA foi atribuído o “kit” utilizado. Apesar de “kits” para tecido ou células mamíferas ou sangue já terem sido utilizados para o gênero *Fusarium* (64,49,53), células fúngicas possuem uma estrutura diferenciada, em especial os fungos filamentosos, e por esse motivo devem apresentar melhor rendimento quando utilizado um método mais adequado ao alvo.

Dessa forma, um segundo “kit” comercial foi testado no método 8 para verificar se a troca de “kit” traria resultados mais satisfatórios. Os resultados

demonstraram que de fato o “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) apresentou melhores resultados para a extração de DNA de *Fusarium* spp. a partir de uma suspensão de conídios, pois o DNA gerado pelo experimento foi amplificado pela PCR em todas as amostras testadas. Além disso, duas enzimas líticas foram testadas em paralelo (L4025 e L1412). Ambas as enzimas são β -(1,3)-glucanases, entretanto o extrato de L1412 também possui atividade de celulase, protease e quitinase. O intuito nesta etapa era verificar qual enzima apresentaria melhor desempenho em conjunto com o novo “kit”. Além disso, após a etapa de incubação com a enzima lítica, o sobrenadante e o precipitado foram utilizados em paralelo para a utilização do “kit”. Não foi observada uma diferença significativa entre ambas as enzimas testadas, entretanto, o preço da enzima L1412 era quase o dobro da enzima L4025. Com relação à extração de precipitado e sobrenadante, o precipitado apresentou valores mais altos de DNA extraído. Essa diferença na obtenção de DNA pode significar que a quantidade de enzimas utilizadas não foi suficiente para quebrar todas as células fúngicas presentes na amostra, uma vez que a suspensão utilizada no princípio do processo era muito concentrada. Assim, o “kit” nesse processo, deve ter sido responsável pela lise das células fúngicas que ainda estavam inteiras. Além disso, a execução da etapa de filtração (pelo “kit”) foi muito dificultada pelo precipitado. Durante a execução foi percebido que a coluna entupiu pela quantidade de massa presente no precipitado, dificultando também o processo. Assim, foi decidido que a maior eficácia do método seria atingida através da utilização da enzima L4025, com a utilização do sobrenadante e o “kit” comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit Invitrogen, Carlsbad, CA.

O método 8 utilizou um iniciador genérico para fungos. O próximo passo seria a utilização de um iniciador gênero específico. Foram encontrados 2 iniciadores na literatura para o gênero *Fusarium* e testados durante o método 9. Os iniciadores P28SL/P58L apresentaram melhor desempenho em relação aos iniciadores ITS-Fu-f/r, e por isso foram escolhidos para a continuação do desenvolvimento do método.

A partir do momento em que um método eficaz para uma suspensão de conídio de *Fusarium* foi alcançado, a próxima etapa de desenvolvimento do método seria incluir uma etapa de filtração para adequá-lo a quantidades maiores de água, pois em uma situação real, amostras de 1 litro de água são geralmente coletadas para a realização das análises. Assim, o método 9 foi realizado para verificar se o método anterior poderia ser modificado para quantidades maiores de água. O método 10 foi positivo para a maior concentração testada.

Uma perda importante ocorre durante a trituração do filtro em cadinho. Apesar de o cadinho ser estéril, a trituração aumenta a possibilidade de contaminação. Por isso uma forma alternativa de trituração foi testada com pérolas de vidro estéreis inseridas no tubo cônico e agitação após imersão em nitrogênio líquido. Dessa forma o tampão de extração deveria ser congelado pela imersão em nitrogênio líquido e provocar uma ruptura intensa no filtro durante a agitação. Entretanto, o que aconteceu foi que o tampão congelado não promoveu a ruptura do filtro e somente após o descongelamento do tampão foi possível que a agitação triturasse o filtro. Ainda assim, as três concentrações testadas foram positivas indicando a validade do método em desenvolvimento.

Por fim a adição do tampão de extração foi realizada após a trituração após congelamento em nitrogênio líquido e agitação com pérolas de vidro. Isso possibilitou uma melhor pulverização do filtro. O método 12 amplificou todas as amostras testadas, demonstrando que era adequado para quantidades maiores de água, como um litro. O método também pode ser adaptado para quantidades maiores de água. No presente trabalho, amostras de apenas 1 litro foram consideradas, pois a coleta e transporte dessas amostras do local da coleta para o laboratório é trabalhosa e o intuito do presente estudo era desenvolver um método o mais simples possível e praticável numa situação real.

Assim que a metodologia de extração de DNA a partir de água artificialmente contaminada com o gênero *Fusarium* estava desenvolvida, o

limite de detecção do método foi testado em comparação com o padrão ouro (cultura).

Em ambos os meios de cultura a concentração de teste foi reduzida drasticamente de 200 para 20 células por litro, pois na concentração de 200 células por litro as placas de crescimento apresentavam crescimento de incontáveis unidades formadoras de colônia. Como o intuito era encontrar o limite de detecção, a concentração do teste foi reduzida drasticamente para outra menor que se acreditou estar mais próxima do limite de detecção. O limite de detecção da cultura foi menor que o do método molecular em situações controladas de laboratório. No entanto, em situações reais, outras condições devem influenciar o desempenho dos métodos, de forma que esses resultados não necessariamente se repetirão de forma idêntica fora dessas condições controladas. Entre os fatores que afetariam o método de cultura estão: a interferência de outros micro-organismos que poderiam inibir o crescimento do gênero *Fusarium* e a presença no sistema de células viáveis.

Existe a possibilidade de subcrescimento de fungos filamentosos e uma consequente inibição competitiva por nutrientes em favor das bactérias ou uma inibição de outros micro-organismos unicelulares pela produção de micotoxinas. Dessa forma, podemos dizer que existem vários micro-organismos presentes na água que poderão exercer algum tipo de influência entre si. Porém essas relações ainda são incipientes em um sistema de distribuição de água e por isso uma situação como a desse estudo não pode garantir que os valores encontrados sejam completamente aplicáveis em situações reais(89).

Outro fator importante é a viabilidade das células. As cepas utilizadas neste estudo foram semeadas até quatro dias antes do experimento e por isso podem ser consideradas recentes. A viabilidade das células é diretamente influenciada por esse fator uma vez que, pelo pequeno tempo, as suspensões continham provavelmente apenas esporos viáveis, podendo assim influenciar diretamente no limite de detecção e de reprodutibilidade da cultura em condições reais.

É possível considerar que o método molecular poderia então detectar células não viáveis e que, em princípio, não representariam risco ao paciente imunocomprometido. Entretanto, os meios de cultura utilizados apenas mimetizam um meio rico ou pobre em nutrientes e não o organismo humano. Por esse motivo não poderíamos assegurar que os esporos que cresceram na cultura seriam uma ameaça ao paciente. Além disso, um resultado negativo pode significar que as células presentes na amostra somente não foram capazes de crescer naquele meio de cultura, ou seja, não há garantia que essas mesmas células não seriam capazes de infectar um organismo humano debilitado.

No presente estudo foram utilizados 2 meios de cultura: ágar dextrose batata e ágar dicloran rosa bengala. O ágar dextrose batata é um meio comumente utilizado para fungos filamentosos. Já o meio ágar dicloran rosa bengala foi, em um estudo, capaz de otimizar o valor de Unidades Formadoras de Colônias por obter uma maior variedade e um maior número de colônias em comparação com outros meios de cultura (44). Além disso, na literatura é possível encontrar uma variedade muito grande de meios de cultura utilizados para estudos de análise de fungos filamentosos (incluindo o gênero *Fusarium*) em água o que pode resultar em algum tipo de seletividade com relação ao gênero ou espécie(90).

Apesar do limite de detecção do método molecular parecer insuficiente perante o da cultura, não existe uma quantidade definida que um método deveria detectar para estimar o risco de pacientes expostos àquela água, pois não existem diretrizes com relação à existência de fungos filamentosos em água. As informações relacionadas ao comportamento de fungos filamentosos nos sistemas de água são limitadas e os valores de referência para a presença aceitável desses micro-organismos não existem(90). Além disso, não existem rotinas de análise de água para fungos filamentosos ainda que casos de contaminação do sistema de água já tenham sido descritos (37,38,23,91,40,43). Além disso, a extração direta de material genético também disponibiliza material para outros tipos de tipagem molecular para as amostras positivas (92,93,74).

Os métodos e conhecimentos relacionados ao tema ainda são muito incipientes e insuficientes para que possamos entender as reais especificações necessárias a esse método. Entretanto, comparando-se os resultados deste trabalho com relatos da literatura, a metodologia de extração mostrou-se eficiente. Para o fungo filamentos *Aspergillus* spp. um limite de detecção de 1 célula por mL para (equivalente a 1000 células por litro) foi encontrado (58). O presente estudo é o primeiro na literatura sobre a detecção direta para o gênero *Fusarium*. O limite de detecção reprodutível encontrado foi similar ao encontrado para a bactéria *Bordetella pertussis* (55).

A literatura científica contém diversos relatos de investigações de surtos de fusariose em ambiente hospitalar (23,92,14,94,95) ou análise de água para busca de fungos filamentosos contaminantes (89,43,39,41,44,40). Entretanto, todos os estudos encontrados analisavam as amostras através de cultura. Assim, o método desenvolvido é inédito na literatura e promete reduzir o tempo de detecção do agente e permitir a vigilância ativa de áreas de alto risco.

Um estudo foi capaz de detectar *Fusarium oxysporum* e outros fungos nos olhos de voluntários saudáveis e com queratite. O estudo utilizou um papel de filtro para a coleta de amostras e um “kit” comercial para a extração de DNA seguida de uma reação de PCR do tipo “nested”. A segunda reação poderia apresentar 3 tamanhos de banda, sendo um deles para *Fusarium oxysporum*(96). O “kit” utilizado por esse estudo foi adequado para detectar o agente causador de queratite, mas não seria adequado para amostras de água, pois o filtro deve ser esfregado na superfície ocular, da mesma forma que o “swab” foi esfregado no bocal de torneiras ou chuveiros. O método pode ser uma alternativa para superfícies, mas apresenta a limitação de detectar somente uma espécie do gênero causador da fusariose invasiva. Além disso, o “kit” foi testado no olho e não para água não estéril, ou seja, a água poderia conter substâncias e outros microrganismos que seriam capazes de interferir no processo.

Ao coletar as amostras de água, percebeu-se que as torneiras e os chuveiros continham muita sujeira no bocal. Existem vários relatos na literatura que indicam a presença de *Fusarium* em biofilmes em meio aquático. Assim,

uma adaptação do método foi feita para testar a presença desse gênero na água corrente e nos resíduos presentes no bocal de torneiras e chuveiros.

O presente estudo não tem o objetivo de estudar o surto supracitado, mas esta ocorrência foi incluída por ter sido uma oportunidade de testar o método desenvolvido em situações reais. Assim, o objetivo dessa etapa foi verificar como seria em situações reais a detecção do gênero *Fusarium* em água.

Outro ponto a se destacar é a maior positividade do “swab” em relação às amostras de água. Isso se deve provavelmente a maior presença do fungo no biofilme formado ao redor do bocal de torneiras e chuveiros do que conídios dispersos em água. Existem relatos na literatura que sugerem que algumas espécies ou cepas de *Fusarium* estejam mais adaptadas a ambientes aquáticos. Entre as espécies citadas estão os membros do complexo FOOSC e FDSC (97).

Apesar de o “swab” ter apresentado maior positividade, ele não necessariamente é o método mais indicado para monitorar a presença do gênero em sistemas de água. Uma avaliação deve ser feita em cada caso para a determinação do método mais adequado a ser utilizado com relação à que tipo de amostra deve ser analisada: a água ou o biofilme.

Entre as limitações do método desenvolvido neste trabalho estão: a não quantificação das amostras de inóculo utilizadas durante o desenvolvimento do método molecular, a não dosagem da quantidade de DNA extraído antes da reação de PCR e a utilização de poucas espécies e variantes do gênero *Fusarium*.

As amostras utilizadas durante o desenvolvimento molecular não foram quantificadas, pois o intuito dessa etapa não objetivava um resultado quantitativo e sim apenas um teste piloto de um método que pudesse ser utilizado para a comparação com a cultura. Uma vez que o método foi desenvolvido, o objetivo passou a ser quantitativo, ou seja, encontrar o limite de detecção. Dessa forma, a amostra inicial passou a ser dosada, permitindo encontrar o limite de detecção para aquele método.

A quantidade de DNA extraído não foi sempre dosada, pois não foi considerada uma prioridade. Uma vez que o método foi desenvolvido para ser utilizado no meio ambiente, o DNA de vários outros microrganismos também seriam extraídos e a quantificação de DNA não representaria em nada a presença ou ausência do gênero *Fusarium* na amostra. Assim, se o método fosse padronizado a partir de uma quantidade volumétrica de DNA, ela deveria ser reprodutível para extrações que contivessem aquele volume de DNA do gênero *Fusarium*. Entretanto, conforme já citado, o método foi desenvolvido para ser utilizado onde há a presença de outros micro-organismos, fazendo assim a dosagem de DNA durante a padronização do método de extração secundária.

As reações de PCR utilizadas neste trabalho foram todas importadas de outros estudos. O iniciador genérico para fungos e mais adiante os dois iniciadores gênero-específicos testados para o método de extração de DNA desenvolvidos. Considerou-se que os trabalhos fossem suficientes para a detecção do gênero, dentro da sua alta variabilidade, e apenas outros fungos filamentosos foram utilizados para verificação da especificidade em relação a outros gêneros.

O presente estudo desenvolveu um método de extração de DNA fúngico a partir de amostras de água filtrada e comparou com o método padrão de cultura. Ambos os métodos foram submetidos à determinação do limite de detecção. Os dados encontrados revelam que a utilização do método molecular direto da água apresenta um limite de detecção muito semelhante ao da cultura, mas é capaz de prover um resultado positivo ou negativo muito mais rapidamente. Além disso, o método foi testado em um ambiente hospitalar onde um caso de fusariose foi descrito e mostrou ser capaz de detectar a presença do fungo em água. Uma adaptação do método de extração também foi feita para “swabs” e mostrou-se também eficiente para a detecção do gênero *Fusarium* em superfícies onde pode haver a formação de biofilme.

6. CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver uma técnica de extração de DNA para o gênero *Fusarium* diretamente de água. O método envolvendo a agitação com nitrogênio antes da adição de liticase e posteriormente o kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit e PCR gênero específica com o par de iniciadores 28SL/58L foi o método mais eficiente.

A técnica molecular desenvolvida foi comparável à cultura em relação à determinação do limite de detecção.

7. ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **23.11.11**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **434/11**, intitulado: "**Avaliação de dois métodos para detecção direta de Fusarium em água**", apresentado pelo Departamento de **Moléstias Infecciosas e Parasitárias**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Anna Sara S. Levin

Pesquisador (a) Executante: Mariana Geraldi Graça

CEP-FMUSP, 23 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador Interino
Comitê de Ética em Pesquisa

8. REFERÊNCIAS

1. Rex HJ. Doctor Fungus: The Official Website of the Mycoses Study Group. [Online]. [cited 2011 8 2. Available from: <http://www.doctorfungus.org>.
2. Nelson P, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. Clinical Microbiological Reviews. 1994: p. 479 - 504.
3. Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J, Barreiro MD, Gonçalves RT. Fungemia due to *Fusarium sacchari* in an immunosuppressed patient. Journal of Clinical Microbiology. 2000: p. 419-421.
4. Leslie JF, Anderson LL, Bowden RL, Lee YW. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology. 2007 Oct: p. 25 - 32.
5. Hue F, Huerre M, Rouffault MA, Bievre C. Specific Detection of *Fusarium* Species in Blood and Tissues by a PCR Technique. Journal of Clinical Microbiology. 1999: p. 2434-2438.
6. Wang H, Xiao M, Kong F, Chen S, Dou HT, Sorrell T, et al. Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and an in vitro antifungal susceptibility study. Journal of Clinical Microbiology. 2011: p. 1890-1898.
7. Milicevic DR, Krijnar MI, Baltic T. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. Toxins. 2010 Apr: p. 572 - 592.
8. Duarte-Vogel S, Villamil-Jiménez LC. Micotoxinas en la Salud Publica. Revista de Salud Publica. 2006 Feb: p. 129 - 135.
9. Lucca AJ. Harmful fungi in both Agriculture and Medicine. Revista Iberoamericana de Micologia. 2007: p. 3 - 13.
10. Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vanderbroucke V, et al. The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. Toxins. 2014 Jan: p. 430 - 452.
11. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous Intefection by *Fusarium* Species in Healthy and Immunocompromised Hosts Implications for Diagnosis and Management. Clinical Infectious Diseases. 2006: p. 909 - 920.
12. Hwang SM, Suh MK, Ha GY. Onychomycosis due to nondermatophytic molds. Annals of Dermatology. 2012 May: p. 175 - 180.
13. Kuruvilla TS, Dias M. *Fusarium solani*: a causative agent of skin and nail infections. Indian Journal of Dermatology. 2012 Jul: p. 308 - 309.

14. Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, et al. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 May: p. 1237 -1242.
15. Walsh TJ, Gamaletsou MN. Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013: p. 423 - 427.
16. Muñoz P, Murillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011: p. 38 - 45.
17. Ahmad A, Khan ZU, Theyyathel AM. Development of a nested PCR assay for the detection of *Fusarium solani* DNA and its evaluation in the diagnosis of invasive fusariosis using an experimental mouse model. *Mycoses*. 2008: p. 40-47.
18. Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DJ, Kalser MH. Fungal flora of the normal human small and large intestine. *The New England Journal of Medicine*. 1969 Mar: p. 638 - 641.
19. Jureen R, Koh TH, Wang G, Chai LY, Wong YW, Wang Y, et al. Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore. *BMC Infectious Diseases*. 2008 Jul.
20. O'Donnell K, Sarver BA, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ, et al. Phylogenetic Diversity and Microsphere Array-Based Genotyping of Human Pathogenic *Fusarium*, Including Isolates from Multistate Contact Lens-associated U.S. Keratitis Outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 Jul: p. 2235 - 2248.
21. Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2002 Dec: p. 569 - 574.
22. Cho CT, Vats TS, Lowman JT, Brandsberg JW, Tosh FE. *Fusarium solani* infection during treatment for acute leukemia. *The Journal of Pediatrics*. 1973.
23. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Müller FM, et al. Fusariosis Associated with Pathogenic *Fusarium* Species Colonizations of a Hospital Water System: A New Paradigm for the Epidemiology of Opportunistic Mold Infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2001: p. 1871-1878.
24. Carneiro HA, Coleman JJ, Restrepo A, Mylonakis E. *Fusarium* infection in lung transplant patients: report of 6 cases and review of the literature. *Medicine*. 2011 Jan: p. 69 - 80.
25. Hamaki T, Kami M, Kishi A, Kusumi E, Kishi Y, Iwata H, et al. Vesicles as initial skin manifestation of disseminated fusariosis after non-myeloablative stem cell transplantation. *Leukemia & Lymphoma*. 2004 Mar: p. 631 - 633.

26. Miyazaki M, Miyakoshi S, Kami M, Mori M, Kishi Y, Inagawa H, et al. Systemic fusariosis after a preparative regimen including thiotepe, VP-16 and busulfan used for blood stem cell transplantation in Hodgkin's disease. *Leukemia & Lymphoma*. 2001 Jan: p. 441 - 444.
27. Mowbray DN, Paller AS, Nelson PE, Kaplan RL. Disseminated *Fusarium solani* infection with cutaneous nodules in a bone marrow transplant patient. *International Journal of Dermatology*. 1988 Dec: p. 698 - 701.
28. Saito T, Imaizumi M, Kudo K, Hotchi M, Chikaoka S, Yoshinari M, et al. Disseminated *Fusarium* infection identified by the immunohistochemical staining in a patient with a refractory leukemia. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 1999: p. 71-77.
29. Helm TN, Longworth DL, Hall GS, Bolwell BJ, Fernandez B, Tomecki KJ. Case report and review of resolved fusariosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1990 Aug: p. 393 - 398.
30. Rippon JW, Larson RA, Rosenthal DM, Clayman J. Disseminated cutaneous and peritoneal hyalohyphomycosis caused by *Fusarium* species: three cases and review of the literature. *Mycopathologia*. 1988: p. 105-111.
31. Park A, Muntz HR, Smith ME, Afify Z, Pysher T, Pavia A. Pediatric invasive fungal rhinosinusitis in immunocompromised children with cancer. *Otolaryngology - Head Neck Surgery*. 2005: p. 411-416.
32. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jenschke MG, Sanford AP, Herndon DN. Emerging Infections in Burns. *Surgical Infections*. 2009: p. 389-397.
33. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*. 2007 Jun: p. 321 - 346.
34. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudella JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008: p. 805-809.
35. Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E, Boktour M, et al. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infection of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002 Sep: p. 532 - 537.
36. Dignani MC, Anaissie E. Human Fusariosis. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004: p. 67-75.
37. Arvanitidou M, Kanellou K, Constantinides TC, Katsouyannopoulos V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letter in Applied Microbiology*. 1999.
38. Arvanitidou M, Spaia S, Velegraki A, Parzaloglou M, Kanetidis D, Pangidis P, et al. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *Journal of*

Hospital Infection. 2000.

39. Warris A. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection*. 2001: p. 143-148.
40. Papagopolou P, Filioti J, Petrikkos G, Giakouppi P, Anatoliotaki M, Farmaki E, et al. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *Journal of Hospital Infection*. 2002.
41. Varo SD, Martins CH, Cardoso MJ, Sartori FG, Montanari LB, Pires-Gonçalves RH. Isolation of filamentous fungi from water used in a hemodialysis unit. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007 Jun: p. 326 - 331.
42. Kauffmann-Lacroix C, Bousseau A, Dalle F, Brenier-Pinchart MP, Delhaes L, Machouart M, et al. Prevention of fungal infections related to the water supply in French hospitals. *La Presse Médicale*. 2008 May: p. 751 - 759.
43. Haytte MP, Christiaens G, Mutsers J, Barbier C, Huynen P, Melin P, et al. Filamentous fungi recovered from the water distribution system of a Belgian university hospital. *Medical Mycology*. 2010.
44. Pereira VJ, Fernandes D, Carvalho G, Benoliel MJ, San Romão MV, Barreto Crespo MT. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research*. 2010: p. 4850-4859.
45. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology*. 2010 Feb: p. 166 - 176.
46. Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gené J, Symoens F, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009: p. 634-642.
47. Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkatapathy N, Guarro J. Less-Frequent *Fusarium* Species of Clinical Interest: Correlation between Morphological and Molecular Identification and Antifungal Susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009 May: p. 1463 - 1468.
48. Balajee AA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology*. 2007: p. 475-490.
49. Ladlinger C, Preuner S, Willinger B, Haberpursch B, Racil Z, Mayer J, et al. Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009 Apr: p. 1063 - 1073.

50. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BA, Balajee SA, Schroers HJ, et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Oct: p. 3708 - 3718.
51. Debourgogne A, Gueidan C, Hannequin C, Contet-Audonneau N, de Hoog S, Machouart M. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates. *Journal of Microbiology Methods*. 2010 Sep: p. 319 - 323.
52. Pujol I, Guarro J, Gené J, Sala J. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997 Feb: p. 163 - 167.
53. Nitschke E, Nihlgard M, Varrelmann M. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction-amplified translation elongation factor 1alpha gene fragment. *Phytopathology*. 2009 Aug: p. 921 - 929.
54. Reid TM, Schafer MP. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-staged PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 1999 Aug: p. 269 - 273.
55. De Donno A, Quattrochi M, Ansaldi F, Campa A, Rollo MC, Gabutti G. Direct detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: comparison of polymerase chain reaction and culture. *Journal of the International Medical Research*. 2006.
56. Johnston LM, Elhanafi D, Drake M, Jaykus LA. A simple method for the direct detection of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 from raw alfalfa sprouts and spent irrigation water using PCR. *Journal of Food Protection*. 2005: p. 2256-2263.
57. Lipp EK, Rivera IN, Espeland EM, Choopun N, Louis VR, Roussek-Cohen V, et al. Direct detection of *Vibrio cholerae* and ctxA in Peruvian coastal water and plankton by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003: p. 3676-3680.
58. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mösch C, et al. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *Journal of clinical Microbiology*. 1999: p. 3865-3871.
59. Lee CS, Wetzel K, Buckley T, Wozniak D, Lee J. Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting gyrB gene using real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2011: p. 893-903.
60. Joyner J, Wanless D, Sinigalliano CD, Lipp EK. Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014.

61. Filion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2003 Apr: p. 67 - 76.
62. Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 Aug: p. 2902 - 2908.
63. Suguwara Y, Nakase K, Nakamura S, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, et al. Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *European Journal of Haematology*. 2013 Apr: p. 331 - 339.
64. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 Feb: p. 380 - 385.
65. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013.
66. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols : A guide to Methods and Applications*. 1990: p. 315-322.
67. Ponton J, Jones JM. Identification of two germ-tube specific cell wall antigens of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 1986: p. 864 - 868.
68. Van Burik JA, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*. 1998: p. 299–303.
69. Abd-Elsam KA, Aly IN, Abdel-Satar MA, Khalil MS, Verreet JA. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*. 2003: p. 82-85.
70. O'Brien K, Milette G, Campbell M. Rice Genome Annotation Project. [Online].; 2005 [cited 2015 Abril 01. Available from: http://rice.plantbiology.msu.edu/home_training_cereal.shtml.
71. Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X, Simonet P. Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992: p. 2717-2722.
72. Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*. 2001: p. 17 - 20.

73. Lech T, Syguła-Cholewinska J, Szostak-Kot J. An economical and combined method for rapid and efficient isolation of fungal DNA. *Genetics and Molecular Research*. 2014: p. 10779 - 10786.
74. Llorens A, Hinojo MJ, Mateo R, González-Jaén MT, Valle-Algarra FM, Logrieco A, et al. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *International Journal of Food Microbiology*. 2006: p. 297 - 306.
75. Merk S, Neubauer H, Meyer H, Greiser-Wilke I. Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2001: p. 127 - 131.
76. Hwang C, Ling F, Andersen GL, LeChevallier MW, Liu WT. Evaluation of Methods for the Extraction of DNA from Drinking Water Distribution System Biofilms. *Microbes and Environment*. 2012: p. 9 - 18.
77. Ranasinghe CP, Harding R, Hargreaves M. An improved protocol for the isolation of total genomic DNA from Labyrinthulomycetes. *Biotechnology letters*. 2015: p. 685 - 690.
78. Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology*. 2009: p. 309 – 320.
79. Vazquez-Angulo JC, Medez-Trujillo V, González-Mendonza D, Morales-Trejo A, Grimaldo-Juarez O, Cervantes-Díaz L. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from *Trichoderma* spp (*Hypocreaceae*). *Genetics and Molecular Research*. 2012: p. 1379-1384.
80. Smith B, Li N, Anderse AS, Slotve HC, Krogfelt KA. Optimising Bacterial DNA Extraction from Faecal Samples: Comparison of Three Methods. *The Open Microbiology Journal*. 2011: p. 14 - 17.
81. Lakay FM, Botha A, Prior BA. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology*. 2007: p. 265 – 273.
82. Balijja A, Kvarnhedenb ,A, Turchetti T. A non-phenol–chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods*. 2008: p. 32 - 37.
83. Peeters D, Peters IR, Helps CR, Dehard S, Day MJ, Clercx C. Whole blood and tissue fungal DNA quantification in the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis. *Veterinary Microbiology*. 2008: p. 194 – 203.

84. Jiang YX, Wu JG, Yu KQ, Ai CX, Zou F, Zhou HW. Integrated lysis procedures reduce extraction biases of microbial DNA from mangrove sediment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011: p. 153 - 157.
85. Coombs JN, Gough AC, Primrose JN. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acid Research*. 1999.
86. Findley K, Oh J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, Schoenfeld D, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013: p. 367 - 372.
87. Nakaune R, Nakano R. Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods*. 2006: p. 244 – 249.
88. Salazar O, Ansejo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*. 2007: p. 985 – 994.
89. Gonçalves AB, Paterson RR, Lima N. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2006: p. 257-264.
90. Hageskal G, Gaustad P, Heier BT, Skaar I. Occurrence of moulds in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*. 2007: p. 774-780.
91. Warris A, Gaustad P, Meis JF, Voss A, Verveij PE, Abrahamsen T. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection*. 2001.
92. Litinov N, da Silva MT, van der Heijden IM, Graça MG, Marques Oliveira L, Fu L, et al. An outbreak of invasive fusariosis in a children's cancer hospital. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014.
93. Yörük E, Albayrak G. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random-amplified polymorphic DNA. *Genetic and Molecular Research*. 2013: p. 1360 - 1372.
94. Georgiadou SP, Velegraki A, Arabatzis M, Neonakis I, Chatzipanagiotou S, Dalekos GN, et al. Cluster of *Fusarium verticillioides* bloodstream infections among immunocompetent patients in an internal medicine department after reconstruction works in Larissa, Central Greece. *Journal of Hospital Infection*. 2014 Apr: p. 267 - 271.
95. Mesquita-Rocha S, Godoy-Martinez PC, Gonçalves SS, Urrutia MD, Carlesse F, Seber A, et al. The water supply system as a potential source of fungal infection in paediatric haematopoietic stem cell units. *BMC Infectious Diseases*. 2013 Jun.
96. Menassa N, Bosshard PP, Kaufmann C, Grimm C, Auffarth GU, Thiel MA. Rapid Detection of Fungal Keratitis with DNA-Stabilizing FTA Filter Paper. *Investigative ophthalmology &*

visual science. 2010 Apr: p. 1905 - 1910.

97. Steinberg C, Laurent J, Edel-Hermann V, Barbezant M, Sixt N, Dalle F, et al. Adaptation of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium dimerum* to the specific aquatic environment provided by the water systems of hospitals. *Water Research*. 2015 Jun: p. 53 65.
98. Cole-Parmer. Cole-Parmer: Delivering solutions to you. [Online]. [cited 2015 Abril 2. Available from: <http://www.coleparmer.com/TechLibraryArticle/30>.
99. Lade BD, Anita PS, Paikrao HM. Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. *Springer Plus*. 2014.
100. Gaikwad AB. DNA extraction: Comparison of methodologies. [Online]. [cited 2015 Abril 02. Available from: http://www.nbpgr.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20extraction-Comparison%20of%20methodologies.pdf.
101. Kennedy S. BitesizeBio. [Online].; 2009 [cited 2015 Abril 02. Available from: <http://bitesizebio.com/2839/dna-precipitation-ethanol-vs-isopropanol/>.
102. Hadwiger LA, Beckman JM. Chitosan as a Component of Pea-*Fusarium solani* Interactions". *Plant Physiology*. 1980: p. 205 - 211.
103. Hwang C, Ling F, Andersen GL, LeChevallier MW, Liu WT. Evaluation of Methods for the Extraction of DNA from Drinking Water Distribution System Biofilms. *Microbes and Environmentr..*