

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JULIANA MARIA AZEVEDO DE LYRA

**AVALIAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
FUNGOS PATOGÊNICOS RELEVANTES PARA A SAÚDE HUMANA**

Recife

2014

JULIANA MARIA AZEVEDO DE LYRA

**AVALIAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
FUNGOS PATOGÊNICOS RELEVANTES PARA A SAÚDE HUMANA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Co-orientadora: Profa. Dra. Norma Lucena C. L. da Silva

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Marylu Souza, CRB-4/1564

Lyra, Juliana Maria Azevedo de

Avaliação de ferramentas moleculares para detecção de fungos patogênicos relevantes para a saúde humana/ Juliana Maria Azevedo de Lyra – Recife: A Autora, 2014.

97 f.: il.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Norma Lucena C. L. da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Doutorado em Inovação Terapêutica, 2014.

Inclui referências e apêndices

1. Fungos patogênicos 2. Cândida albicans 3. Infecção hospitalar I. Andrade, César Augusto Souza de II. Silva, Norma Lucena C. L. da III. Título.

571.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-426

JULIANA MARIA AZEVEDO DE LYRA

**AVALIAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE
FUNGOS PATOGÊNICOS RELEVANTES PARA A SAÚDE HUMANA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 21/03/2014

Comissão Examinadora

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Instituição: Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof(a). Dra. Máira Galdino da Rocha Pinto

Instituição: Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof(a). Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

Instituição: Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Bartolomeu Accioly dos Santos

Instituição: Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof(a). Dra. Idjane Santana de Oliveira

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

*Aos meus pais **Josué e Elizabete**, sem
os quais **nada** teria sido possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus sobre todas as coisas.

A meus pais, pelo amor incondicional, apoio, dedicação, carinho e incentivo durante toda a minha vida, sem vocês eu não conseguiria alcançar esse objetivo.

Ao meu Marido Eduardo Câmara, pelo carinho e companheirismo que foram determinantes para meu crescimento pessoal e profissional.

A profa. Dra. Suely Lins Galdino (*in memorian*) pela imensa contribuição científica ao nosso Estado e pelo apoio nesta pesquisa, a quem tenho grande admiração.

A Profa. Dra. Norma Lucena, mais que orientadora e chefe, uma grande amiga. Fonte de conhecimento, por quem sinto imenso respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Cesar Andrade, pelo apoio e contribuição para minha formação acadêmica e profissional.

Aos médicos Heberton Medeiros e Moacyr Jucá pelo compartilhamento das amostras clínicas e parceria no projeto.

A Élcia Cauas, responsável pelo Setor de Micologia do LACEN, na ocasião, que muito gentilmente cedeu culturas dos fungos utilizados neste projeto.

A Heike Brand e Jurandy Magalhães, pela contribuição em alguns experimentos realizados.

Aos meus amigos e companheiros de pesquisa pela amizade, carinho e por me ter aguentado todo esse tempo: Ester, Albert, Alessandra, Renan, Rossana, André, Laís, Renata, Vanessa, Sara, Rafael, Jeane; e demais mestrandos, doutorandos e estagiários do laboratório de Imunogenética do CPqAM.

Aos colegas do doutorado e mestrado e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica por compartilhar esta caminhada.

A Cássia Docena pelas discussões da técnica de PCR em tempo real e seqüenciamento que muito contribuiu para a execução deste projeto.

A FACEPE pela bolsa de estudo concedida integralmente.

RESUMO

Lyra, Juliana Maria Azevedo. Teste Molecular para Detecção de Fungos Patogênicos Relevantes para a Saúde Humana. 2014. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Infecções fúngicas tem aumentado sua incidência, principalmente em imunocomprometidos. No Brasil, os fungos são responsáveis por cerca de 10% das infecções hospitalares, sendo as espécies de *Candida* responsáveis por cerca de 50% dos casos, seguidas pelo *Aspergillus* e *Cryptococcus neoformans*. O diagnóstico fúngico é dado pelo exame direto, que possui reduzida sensibilidade, e cultura que é tecnicamente laboriosa e demorada. A detecção do genoma de fungos apresenta diversas vantagens como a instalação precoce da terapia antifúngica diminuindo a mortalidade relacionada à infecção fúngica, e o tempo de internação dos pacientes em unidades de saúde. Este estudo tem como objetivo o desenvolvimento e avaliação de teste molecular para a detecção de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos através de PCR do tipo multiplex utilizando a sequência ITS como alvo, e sequências de rDNA específicas para detecção de 6 espécie de fungos de importância para a saúde humana: *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*. Dos 84 pacientes analisados, 46 foram adultos em tratamento oncológico e 38 neonatos. Das 144 amostras de sangue submetidas a PCR convencional com os iniciadores para a detecção da região ITS, 84 foram positivas e 60 negativas. As amostras positivas foram submetidas a PCR multiplex para a determinação da espécie do fungo. 46 foram positivas para uma ou mais espécie fúngica, sendo as espécies mais encontradas a *C. parapsilosis* (23,8%), *C. glabrata* (19,0%), *C. neoformans* (14,2%), *C. tropicalis* e *C. albicans* (ambas 4,7% dos casos). A baixa frequência de *C. albicans* possivelmente está relacionada ao uso profilático do antifúngico fluconazol. A PCR convencional apresentou sensibilidade de 67,3% (53,2-79,0), especificidade de 47,2% (36,6-58,0), valor preditivo positivo de 44,0% (33,4-55,3) e valor preditivo negativo de 70,0% (56,6-80,8) em relação ao diagnóstico da doença, baseado na clínica, comprovação microbiológica e teste terapêutico. As curvas *melting* da PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* obtidas pela amplificação da sequência subclonada de rDNA de cada espécie em plasmídeo apresentaram formato alargado, possivelmente devido a homologia entre o iniciador e diferentes regiões das sequências de rDNA das espécies de fungos estudadas, principalmente nas espécies de *Candida*, permitindo a amplificação inespecífica em diferentes temperaturas de anelamento avaliadas. As curvas de amplificação das sequências subclonadas de rDNA de cada espécie utilizando o sistema *TaqMan* apresentaram reprodutibilidade, e especificidade nos experimentos utilizando o par de iniciador e sonda específico para uma dada espécie com sequências de rDNA clonadas das demais espécies de fungos analisadas, executando o teste para *C. neoformans*, mostrando o potencial do teste para utilização em amostras clínicas.

Palavras-chave: PCR multiplex. PCR em Tempo Real. Diagnóstico. ITS.

ABSTRACT

Lyra, Juliana Maria Azevedo. Molecular Test for Detection of Pathogenic Fungi of Relevance to Human Health. 2014. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Fungal infections have increased its incidence, especially in immunocompromised patients. In Brazil, the fungi are responsible for about 10 % of nosocomial infections, with *Candida* species account for about 50% of cases, followed by *Aspergillus* and *Cryptococcus neoformans*. Fungal diagnosis is made by direct examination, which has reduced sensitivity, and culture that is technically laborious and time consuming. The detection of the fungal genome has several advantages as the early onset of antifungal therapy decreased mortality related to fungal infection, and length of stay of patients in healthcare facilities. This study aims at the development and evaluation of molecular test for the detection of fungal infection in immunocompromised patients by multiplex PCR using ITS sequence targeted and specific rDNA sequences for detection of 6 species of fungi of importance to the human health: *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. neoformans*. Of the 84 patients studied, 46 were adults undergoing cancer treatment and 38 neonates. 144 of blood samples with conventional PCR primers for detection of the ITS region, 84 were positive and 60 negative. The positive samples were subjected to multiplex PCR to determine the species of fungus. 46 were positive for one or more fungal species and the species most commonly found in *C. parapsilosis* (23.8%), *C. glabrata* (19.0%), *C. neoformans* (14.2%), *C. tropicalis* and *C. albicans* (both 4.7% of cases). The low frequency of *C. albicans* is probably related to the prophylactic use of antifungal fluconazole. Conventional PCR had a sensitivity of 67.3% (53.2 to 79.0) , specificity of 47.2% (36.6 to 58.0), positive predictive value of 44.0% (from 33.4 to 55.3) and negative predictive value of 70.0% (56.6 to 80.8) compared to diagnosis based on clinical, microbiological and therapeutic proof test. The melting curves of real-time PCR using SYBR Green obtained by amplification of rDNA subcloned sequence of each species present in plasmid extended, possibly due to the homology between the initiator sequences and regions of rDNA of fungal species format studied, especially in *Candida* species, allowing nonspecific amplification at different annealing temperatures evaluated. The amplification curves of the subcloned rDNA sequences of each type using the *TaqMan* system showed reproducibility and specificity of the experiments using the pair of primer and probe specific for a species with cloned rDNA sequences of other species of fungi analyzed by running test for *C. neoformans*, showing the potential for use in clinical test samples.

Keywords: multiplex PCR. Real-Time PCR. Diagnosis. ITS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DIAGRAMA DO RDNA DE FUNGOS PONTUANDO INICIADORES ITS1 E ITS4 UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS1 E ITS2. ADAPTADA DE WHITE *ET AL.*, 1990.....29

FIGURA 2 - ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS DO TESTE MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE INFECÇÃO FÚNGICA. PLASMÍDEO RECOMBINANTE FORMADO PELA LIGAÇÃO DO VETOR PCR2.1 COM AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DOS FUNGOS *A. FUMIGATTUS* (AFUM), *C. ALBICANS* (CALB), *C. GLABRATA* (CGL), *C. TROPICALIS* (CTR), *C. PARAPSILOSIS* (CPA), *C. NEOFORMANS* (CN) E O ELEMENTO DE INSERÇÃO ITS.....37

FIGURA 3 - IMAGEM DE GEL DE AGAROSE DE PCR CONVENCIONAL USANDO PLASMÍDEOS CONTROLES COM SEQUÊNCIA FÚNGICA SUBCLONADAS. GEL DE AGAROSE 2,5% PARTE SUPERIOR DO GEL- PCR MULTIPLEX 1 MOSTRANDO, CGL = CONTROLE POSITIVO PARA *CANDIDA GLABRATA*; CTR = CONTROLE POSITIVO PARA *CANDIDA TROPICALIS*; CPA = CONTROLE POSITIVO PARA *CANDIDA PARAPSILOSIS*; PM = PESO MOLECULAR 100PB; CN = CONTROLE NEGATIVO DA REAÇÃO DE PCR. PARTE INFERIOR DO GEL- PCR MULTIPLEX 2 MOSTRANDO, AFUM = CONTROLE POSITIVO PARA *ASPERGILLUS FUMIGATUS*; CALB = CONTROLE POSITIVO PARA *CANDIDA ALBICANS*; CNEO = CONTROLE POSITIVO PARA *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*; PM = PESO MOLECULAR 100PB; CN = CONTROLE NEGATIVO DA REAÇÃO DE PCR.....51

FIGURA 4 - CURVA *MELTING* DOS FRAGMENTOS DE RDNA DOS DIVERSOS FUNGOS ESTUDADOS AMPLIFICADOS COM TEMPERATURA DE ANELAMENTO DE 60°C (COLUNA 1), 62°C (COLUNA 2) E DE 65°C (COLUNA 3).....56

FIGURA 5 - REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE RDNA DE (A) *C. ALBICANS*, (B) *C. TROPICALIS*, (C) *C. GLABRATA*, (D) *C. NEOFORMANS*, (E) *C. PARAPSILOSIS* E (F) *A. FUMIGATUS* NAS CONCENTRAÇÃO DE 10 NG, 1NG, 0,1NG, 0,01NG, 0,01NG E 0,001NG DOS RESPECTIVOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES E PARES DE INICIADORES.....58

FIGURA 6 - CURVA DE *MELTING* DA PCR EM TEMPO REAL USANDO O SISTEMA SYBR GREEN CONTENDO: (A) OS INICIADORES AFUM 1+ AFUM2 E CALB1 + CALB2; (B) OS INICIADORES AFUM 1+ AFUM2 E CTR1 + CTR2; (C) OS INICIADORES AFUM 1+ AFUM2 E CGL1+ CGL2; (D) OS INICIADORES CALB1 + CALB2, CTR1 + CTR2 E OS PLASMÍDEOS PCALB E PCTR; (E) OS INICIADORES CALB1 + CALB2, CGL1+ CGL2 E OS PLASMÍDEOS PCALB E PCGL; (F) OS INICIADORES CTR1 + CTR2, CGL1+ CGL2 E OS PLASMÍDEOS PCTR E PCGL.....60

FIGURA 7 - CURVA *MELTING* COM (A) ANELAMENTO ENTRE OS INICIADORES CALB1 + CALB2 E OS PLASMÍDEOS PCALB, PCTR, PCGL E

PCN; (B) ANELAMENTO ENTRE OS INICIADORES CTR1 + CTR2 E OS PLASMÍDEOS PCTR, PCALB, PCGL E PCN; (C) ANELAMENTO ENTRE OS INICIADORES CGL1 + CGL2 E OS PLASMÍDEOS PCGL, PCALB, PCTR E PCN; (D) ANELAMENTO ENTRE OS INICIADORES CN4 + CN5 E OS PLASMÍDEOS PCN, PCALB, PCTR E PCGL.....62

FIGURA 8 - TESTE DE REAÇÃO CRUZADA ENTRE DIFERENTES AMOSTRAS DE DNA PLASMIDIAL COM OS *INICIADORES* CALB1 E CALB2 + PCALB (A), *INICIADORES* CALB1 E CALB2 + PCALB + PAFUM (B), *INICIADORES* CALB1 E CALB2 + PCALB + PCGL (C), *INICIADORES* CALB1 E CALB2 + PCALB + PCTR (D) E *INICIADORES* CALB1 E CALB2 + PCALB + PCGL + PCTR (E).....63

FIGURA 9 - CURVA INCLUINDO 10 NG DE DNA PLASMIDIAL E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HUMANO: 200 NG (LINHA VERMELHA), 100 NG (LINHA AMARELA) E 50 NG (LINHA VERDE) E SUA RESPECTIVA CURVA DE MELT. A. PCALB, B. PCTR, C. PCGL, D. PCPA, E.PCNEO, F. PAFUM.....65

FIGURA 10 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO O SISTEMA *TAQMAN* PARA DETECÇÃO DE *C. ALBICANS*, *C. TROPICALIS*, *C. GLABRATA*, *C. NEOFORMANS* E *A. FUMIGATUS* REALIZADAS EM DIFERENTES MOMENTOS (TRIPLICATA). EXP.1: EXPERIMENTO N.1 REALIZADO EM 08.01.2013. EXP.2: EXPERIMENTO N.2 REALIZADO EM 09.01.2013. EXP.3: EXPERIMENTO N.3 REALIZADO EM 11.01.2013.....66

FIGURA 11 - TESTE DE REAÇÃO CRUZADA E FORMAÇÃO DE DÍMEROS ENTRE OS PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO E OS INICIADORES E SONDAS PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DOS FUNGOS: CALB, CTR, CGL, CN E AFUM.....67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR PARA DETECÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS.....	36
TABELA 2 - LISTA DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQUÊNCIA DE RDNA DE ESPÉCIES DE FUNGOS CONSTRUÍDOS NESTE ESTUDO COMO CONTROLE POSITIVO DO TESTE MOLECULAR.....	50
TABELA 3 - INDICADORES DE DESEMPENHO DA PCR CONVENCIONAL.....	52
TABELA 4 - CONCORDÂNCIA ENTRE PCR CONVENCIONAL E DADOS CLÍNICOS DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES ANALISADOS.....	53
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES FÚNGICAS DIAGNOSTICADAS PELO PCR CONVENCIONAL MULTIPLEX EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS EM DIFERENTES UNIDADES HOSPITALARES EM PERNAMBUCO.....	54
TABELA 6 - DESEMPENHO DAS CURVAS <i>MELTING</i> OBTIDAS EM DIFERENTES EXPERIMENTOS COM OS PLASMÍDEOS PCALB, PCTR, PCGL, PCN, PCPA E PAFUM E SEUS RESPECTIVOS PARES DE INICIADORES.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CT	- “ <i>Cycle threshold</i> ” – Ciclos de amplificação de referência
DEPC	- Dietil Pirocarbonato
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
dNTP	- Desoxinucleotídio trifosfato
x <i>g</i>	- Unidade de força gravitacional
HAM	- Hospital Agamenon Magalhães
HE	- Hospital Esperança
HEMOPE	- Hemocentro de Pernambuco
HIV	- “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ” – Vírus da Imunodeficiência Humana
IFI	- Infecção fúngica invasiva
ITS	- “ <i>Internal Transcribed Spacer</i> ” – Espaçador Interno Transcrito
LACEN	- Laboratório Central de Pernambuco
M	- Molar
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
mM	- Milimolar
mmol	- Milimol
ng	- Nanograma
pb	- Pares de base
PCR	- “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” – Reação em cadeia da polimerase
pmol	- Picomol
qPCR	- PCR em tempo real
rDNA	- DNA ribossomal
RFLP	- “ <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ”- Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
<i>Taq</i>	- <i>Thermophylus aquaticus</i> DNA polymerase
TM	- “ <i>Melting-temperature</i> ”- Temperatura de desnaturação
UV	- Ultra-Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- Grau Celsius
μL	- Microlitro
®	- Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	19
2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS.....	19
2.1.1 Infecção por <i>Candida albicans</i>	20
2.1.2 Infecção por <i>Candida</i> não <i>albicans</i>	20
2.1.3 Infecção por fungos não <i>Candida</i>	22
2.2 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA.....	23
2.3 ALVOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA....	28
2.4 VALIDAÇÃO DE TESTE DIAGNÓSTICO.....	29
3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 OBJETIVOS.....	33
4.1 OBJETIVO GERAL.....	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	34
5.1. CONSTRUÇÃO DE CONTROLES PLASMIDIAIS POSITIVOS PARA TESTE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA.....	34
5.1.1. Isolados de fungo.....	34
5.1.2. Extração de DNA genômico.....	34
5.1.3. Reação em cadeia da DNA polimerase.....	35
5.1.4. Reação de ligação.....	36
5.1.5. Transformação bacteriana.....	38
5.1.6. Extração do plasmídeo.....	38
5.1.7. Quantificação do DNA.....	39
5.1.8. Restrição dos plasmídeos.....	39
5.1.9. Sequenciamento.....	40
5.2. AVALIAÇÃO DO TESTE DE PCR CONVENCIONAL PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA.....	40
5.2.1. População de estudo.....	40
5.2.2. Padrão-ouro do teste.....	41
5.2.3. Diagnóstico micológico.....	42
5.2.4. PCR convencional multiplex.....	42

5.3. AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (QPCR) NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA.....	43
5.3.1. Sistema de detecção <i>sybr green</i>®.....	43
5.3.1.1. Determinação da concentração dos iniciadores.....	44
5.3.1.2. Determinação da temperatura de anelamento dos iniciadores.....	44
5.3.1.3. Determinação da concentração do DNA plasmidial das espécies de fungo estudadas e estabelecimento da curva padrão do teste.....	45
5.3.1.4. Determinação da concentração do DNA humano + DNA plasmidial das espécies de fungo estudadas.....	45
5.3.1.5. Teste de formação de dímeros com diferentes pares de iniciadores.....	46
5.3.1.6. Teste de reação cruzada utilizando diferentes plasmídeos com os iniciadores calb1 e calb2 em PCR do tipo multiplex.....	46
5.3.2. Sistemas de detecção <i>taqman</i>.....	47
5.3.2.1. Determinação de curva padrão com diferentes concentrações dos plasmídeos analisados com seus respectivos pares de iniciadores e sondas.....	47
5.3.2.2. Reação cruzada entre os iniciadores com rdna dos diferentes plasmídeos analisados.....	48
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6. RESULTADOS.....	50
6.1. CONSTRUÇÃO DE CONTROLES PLASMIDIAIS POSITIVOS PARA TESTE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA.....	50
6.2. AVALIAÇÃO DO TESTE MOLECULAR CONVENCIONAL NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA.....	51
6.3. SISTEMA DE DETECÇÃO <i>SYBR GREEN</i>	54
6.4. SISTEMAS DE DETECÇÃO <i>TAQMAN</i> ®.....	65
7. DISCUSSÃO.....	69
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	84

1 INTRODUÇÃO

Os fungos patogênicos podem causar infecções no homem que resultam desde uma simples alergia ao óbito dependendo da integridade do sistema imune do paciente. Indivíduos imunocomprometidos, como pacientes em quimioterapia, transplantados, portadores do HIV e recém-nascidos prematuros são mais susceptíveis a infecções por fungos encontrados no meio ambiente.

Os fungos são responsáveis por cerca de 10% das infecções hospitalares, sendo as espécies de *Candida* responsáveis por cerca de 50% dos casos, seguidos pelo *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis Carinni*. A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente nas infecções hospitalares. As espécies não-albicans mais frequentes são a *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* e em menor frequência a *C. krusei*.

Pacientes neutropênicos em quimioterapia e neonatos correspondem a dois importantes grupos de risco para as infecções nosocomiais.

Neutropenia febril é uma complicação infecciosa cuja incidência varia com o protocolo antineoplásico adotado. Os sítios de infecção mais comuns são o sangue por espécies de *Candida* e o trato respiratório inferior por *Aspergillus*. Os episódios de neutropenia febril com comprovação microbiológica podem chegar a cerca de 40% dos casos; sendo a intensidade da neutropenia um fator de risco para desfecho desfavorável. Nestes pacientes, a mortalidade por infecção fúngica aumenta quanto mais demorado for o início do tratamento específico, e na ocorrência de resistência ao tratamento por algumas espécies principalmente *C.glabrata* e *C.krusei*. O uso profilático de fluconazol parece reduzir a incidência e a mortalidade de infecção fúngica invasiva em pacientes com câncer, contudo, essa prática pode estar influenciando na seleção de espécies resistentes a esse antifúngico.

Óbitos de crianças no período neonatal representam mais de um terço da taxa global de mortalidade infantil. As infecções constituem a principal causa de óbitos de recém-nascidos nos países em desenvolvimento. Os fatores de risco frequentemente associados à sepse neonatal incluem a prematuridade, devido à imaturidade do sistema imunológico, procedimentos invasivos diagnósticos e/ou terapêuticos, ventilação mecânica, nutrição parenteral, antibiótico de amplo espectro, cirurgia, longa permanência hospitalar e não

segmento das normas de prevenção de infecção hospitalar. Dados da literatura sugerem que práticas inadequadas durante trabalho de parto, parto e no pós-atendimento, colocam os recém-nascidos em grande risco de infecções e de morte logo após o nascimento.

O quadro clínico do paciente com infecção sistêmica por *Candida* e outros fungos como o *Aspergillus* é inespecífico e o diagnóstico laboratorial através de métodos convencionais microbiológicos podem não ser conclusivos. A presença do fungo pode ser confirmada pelo exame direto e cultura de amostras biológicas, contudo a sensibilidade baixa do exame direto e as dificuldades técnicas de cultivo tornam a confirmação microbiológica por vezes difícil. Métodos moleculares para detecção de fungos surgem como forma de diagnóstico específico, rápido e de alta sensibilidade, características essas importantes para o estabelecimento de medida terapêutica em pacientes imunocomprometidos. Com o advento da PCR multiplex, da PCR em tempo real e melhoras na eficiência da automação, os custos das técnicas de biologia molecular estão decrescendo enquanto que o seu uso vem aumentando.

Diversas sequências do genoma de fungo vem sendo consideradas como marcadores moleculares para identificação de infecção fúngica, incluindo microssatélites, DNA mitocondrial, o gene da protease aspártica secretada e regiões que transcrevem o DNA ribossômico, sendo a principal delas a região ITS que apresenta múltiplas cópias no genoma do fungo.

Esta região ITS é de particular importância para o diagnóstico de fungos por ter áreas altamente conservadas e áreas de alta variabilidade entre diferentes espécies de fungo, o que pode possibilitar o diagnóstico diferencial dentre as espécies e também a tipificação de uma mesma espécie.

Nesse contexto, esse trabalho desenvolveu e avaliou teste molecular para detecção de infecção fúngica, utilizando PCR convencional, e PCR em tempo real usando o sistema *SYBR Green* e também o sistema *TaqMan* de detecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS:

Nos últimos anos as infecções fúngicas têm aumentado sua incidência principalmente em pacientes imunocomprometidos, com doenças neoplásicas, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), receptores de transplantes de órgãos e em pacientes hospitalizados (Bille *et al.*, 2005; Louie *et al.*, 2008; Kuleta *et al.*, 2009). Os métodos invasivos utilizados no atendimento de pacientes em unidades hospitalares, como sondas venosas para infusão de medicação, demais sondas e respiradores contribuem para o rompimento de barreiras anatômicas naturais, aumentando a possibilidade de infecções nosocomiais (Ribeiro *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2009).

O indivíduo com sistema imune comprometido permite que organismos não patogênicos para a população em geral (sendo com frequência pertencentes a microbiota humana) invadam os tecidos, proliferem e causem doenças (Siegel *et al.*, 2007; Brasil, 2010). Nesse contexto estão incluídos os fungos, os quais são responsáveis por cerca de 10% das infecções hospitalares (Colombo *et al.*, 2003a). Em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) as infecções invasivas por *Candida* estão associadas à alta morbidade e mortalidade com taxa global de mortalidade entre 40-60% (Guery *et al.*, 2009; Delaloye and Calandra, 2014).

A neutropenia prolongada presente nos pacientes com câncer e em terapia com corticosteróides, antineoplásicos, radioterapia, e pacientes em terapia imunossupressiva para prevenção à rejeição de enxertos facilitam infecções fúngicas invasivas (IFI), que se não diagnosticadas em tempo podem levar o paciente ao óbito (Mauricett and Ito, 2009). Outro efeito colateral da quimioterapia para o tratamento de câncer é a mucosite causada por fungos oportunistas na cavidade oral, que se não tratada pode levar a disseminação hematogênica (Boktour *et al.*, 2004). Em crianças com leucemia, a infecção bacteriana é a mais prevalente, contudo, a incidência das infecções fúngicas pode chegar a 10%, com uma taxa de mortalidade de até 25% nos Estados Unidos (Bailey *et al.*, 2009).

Em recém-nascidos de baixo peso ao nascer (<1000 g) a incidência da candidemia é de 4%, e a disseminação na corrente sanguínea está associada com uma mortalidade atribuível de 38% e uma mortalidade bruta de 30% a 75% nesta população específica (Shetty, 2005). Muitos fatores de riscos específicos para candidemia pré, peri e pós-natais foram identificados em pacientes de UTI neonatal tais como a estrutura imatura da pele, uso prolongado de antibióticos, procedimentos invasivos, uso de cateteres vasculares, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de corticóide sistêmico, prematuridade, baixo peso ao nascer, cirurgias do trato gastrointestinal e colonização fúngica preexistente (Saiman, 2001).

No Brasil, os fungos são responsáveis por cerca de 10% das infecções hospitalares, sendo as espécies de *Candida* responsáveis por cerca de 50% dos casos, seguidas pelo *Aspergillus* e *Cryptococcus neoformans* (Colombo *et al.*, 2003a).

2.1.1 Infecção por candida albicans

A *C. albicans* é espécie de fungo normal da microbiota endógena gastrointestinal, respiratória e de áreas genito-urinárias e o agente etiológico mais encontrado dentre as infecções fúngicas em pacientes oncológicos. Além disso, é a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas nos Estados Unidos (Boktour *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2009). No Brasil 4,3% do total das infecções hematológicas correspondem a fungemia causada pela *C. Albicans* (Colombo *et al.*, 2003b).

2.1.2 Infecção por candida não albicans

As demais espécies do gênero *Candida* também foram encontradas causando infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos, sendo as espécies não-albicans mais frequentes a *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* e em menor frequência a *C. krusei* (Colombo *et al.*, 2003b; CDC, 2012a; Oberoi *et al.* 2012).

A *C. tropicalis* é importante causa de candidemia em pacientes com neutropenia e portadores de doenças malignas hematológicas, ocorrendo em

60-80% dos pacientes infectados (Gil *et al.*, 2007). Nos países da América Latina, incluindo o Brasil, esta é a segunda espécie mais isolada nas candidemias, juntamente com a *C. parapsilosis* (Pfaller and Diekema, 2007).

A *C. parapsilosis* coloniza a pele humana, sendo frequentemente isolada das mãos de profissionais de saúde e de soluções de nutrição parenteral contaminadas. É responsável por 7-15% dos casos de candidemia nos Estados Unidos (Colombo *et al.*, 2006; Pfaller and Diekema, 2007). Em países da América Latina a *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva (Godoy *et al.*, 2003).

A *C. glabrata* ocupa o segundo lugar entre as espécies do gênero *Candida* mais isoladas nos Estados Unidos, com frequência entre 20-25% dos casos, e nos países da América Latina é responsável por entre 4-7% dos casos (Pfaller and Diekema, 2007). No Brasil a *C. glabrata* é a quarta espécie mais encontrada em pacientes com candidemia representando um total de 4-5% das infecções por candida (Goldani and Mario 2003; Colombo *et al.*, 2011). A frequência de isolamento de *C. glabrata* parece estar associada à idade dos pacientes, sendo frequente em recém-nascidos, e nos pacientes com uso do antifúngico fluconazol profilático, especialmente em pacientes portadores de neoplasias (Colombo and Guimarães, 2003).

A espécie do gênero *Candida* mais isolada em infecções hospitalares em todos os continentes é a *C. albicans*, mas variações geográficas no padrão etiológico das infecções invasivas por espécies de candida não-*albicans* foram documentadas. Na América do Norte a *C. glabrata* é a espécie predominante (Colombo *et al.*, 2003a; Delaloye and Calandra, 2014). *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são mais frequentes no hemisfério sul (América do Sul, Austrália e sul da Europa), do que no hemisfério norte (norte da Europa ou América do Norte) (Colombo, 2003b; Arendrup, 2010). No Brasil, a frequência de infecção fungica por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também é mais prevalente do que a por *C. glabrata* (Godoy *et al.*, 2003; Goldani and Mario 2003; Colombo *et al.*, 2011).

2.1.3 Infecção por fungos não *Candida*

O gênero *Cryptococcus* pode causar complicações importantes como a meningite e meningoencefalite. Aproximadamente 50% das infecções por *Cryptococcus spp.* em pacientes com câncer se apresenta na forma de meningoencefalite, sendo o agente etiológico mais isolado o *C. neoformans* (Buchanan and Murphy, 1998; Kufe *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2007). A infecção por HIV também é um fator crucial que predispõe ao desenvolvimento da criptococose (Sabitti and May, 2012). A incidência de criptococose em pacientes com HIV no mundo varia em torno de 5-30% e as maiores incidências ocorrem no Sudeste dos EUA e África Equatorial, destes pacientes 10-25% morrem no início da terapia e 30-60% em doze meses (Martinez *et al.*, 2001).

O *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico responsável por aproximadamente 90% das aspergiloses invasivas diagnosticadas em todo o mundo (CDC, 2012b). Porém, muitas outras espécies, incluindo *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. nidulans* podem causar doenças (Sharma and Chwogule, 1998; Jalava *et al.*, 2003).

A aspergilose invasiva é infecção oportunista, sendo a forma mais grave da doença. Este tipo de infecção surge em doentes imunocomprometidos, particularmente nos doentes com leucemia, com aplasia medular, nos submetidos a transplante de medula e de órgãos sólidos, e nos indivíduos com tratamentos prolongados de quimioterapia ou à base de corticosteróides (Richardson & Warnock, 2003; Jalava *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2006; Kousha *et al.*, 2011).

Na maioria dos casos de aspergilose invasiva é difícil determinar se a infecção foi adquirida dentro ou fora do ambiente hospitalar. No entanto, parece provável que alguns indivíduos colonizados por *Aspergillus spp.* antes da sua admissão no hospital possam desenvolver doença invasiva quando ficam neutropênicos (Richardson and Warnock, 2003; Pemán *et al.*, 2006).

A taxa de mortalidade causada pelo *Aspergillus spp.* chega a 50% na presença de neutropenia induzida pela quimioterapia e pode exceder 90% em pacientes submetidos à transplantes de medula óssea (Ali *et al.*, 2006; Kousha *et al.*, 2011).

2.2 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

A presença de fungos em amostras biológicas de pacientes com suspeita de infecção pode ser observada em exame microscópico direto. O referido teste permite a visualização de estruturas fúngicas, sendo um importante instrumento de diagnóstico (Mauricett *et al.*, 2009). Diferentes tipos de amostras podem ser utilizados no exame direto dependendo do local da infecção. A identificação de fungos é facilitada por meio de diferentes colorações, tais como: hidróxido de potássio 20% com ou sem adição de tinta Parker ou de dimetilsulfóxido (DMSO) e coloração por Giemsa (Ribeiro *et al.*, 2006).

Os resultados devem ser interpretados de acordo com o tipo de material e o local da lesão. Muitas vezes, o fungo é da flora local, não tendo significado clínico o seu achado no exame direto (McLintock *et al.*, 2004). O exame direto pode fornecer identificação completa (gênero e espécie) ou parcial do fungo, quando apenas o gênero ou o grupo pode ser identificado. Em ambos os casos, fornecem informações importantes para a escolha da conduta terapêutica (Ribeiro *et al.*, 2006). A sensibilidade do exame direto varia de acordo com o sítio anatômico, número de espécimes clínicos examinados, adequação da coloração empregada, estágio da doença, qualidade da objetiva e sistema óptico, qualidade e quantidade de material biológico (McLintock *et al.*, 2004). Além disso, reagentes e corantes podem estar contaminados com leveduras e fungos filamentosos do meio ambiente, que em geral não necessitam de nutrientes especiais e se multiplicam em soluções usadas na rotina do laboratório (Ferreira, 2001).

Em consequência da baixa sensibilidade do exame direto, a etiologia da infecção fúngica em muitos casos requer a cultura do material biológico para o isolamento e a identificação da espécie (Benjamin *et al.*, 2000).

A cultura em meio de ágar Sabouraud permite a inserção de antibióticos, que evitam o crescimento de bactérias, e do teste antimicótico, para identificação do crescente número de fungos resistentes às drogas usuais de tratamento (Speers, 2006). Outra vantagem da cultura é a disponibilidade de material fúngico para estudos de tipagem e caracterização de cepas em ambiente hospitalar (McLintock *et al.*, 2004). O fator limitante do método deve-

se ao tempo necessário para o crescimento do fungo, que pode chegar a duas ou três semanas (Speers, 2006; Oberoi *et al.* 2012).

O método padrão-ouro para o diagnóstico da maioria das espécies de fungos invasivos em neonatos é a cultura do sangue, de líquidos estéreis ou de fragmentos de tecido, contudo, a hemocultura não é forma de diagnóstico efetiva, como seria necessário no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas (IFI), sendo a coleta e o transporte das amostras as principais limitações, que pode diminuir a viabilidade celular e acarretar na indução de resultados falsos negativos (Benjamin *et al.*, 2000).

Testes sorológicos para pesquisa de anticorpos contra antígenos fúngicos (por exemplo, antimanana) são limitados pela ocorrência de resultados falsos negativos, especialmente em pacientes imunocomprometidos, que constituem a maioria daqueles com maior suscetibilidade à infecção fúngica (Wheat, 2006).

Diagnóstico sorológico para identificação de antígenos da parede celular fúngica como galactomanana (GM), manana, β -glucano foram desenvolvidos para serem usados como primeiro diagnóstico de infecções fúngicas invasivas. Esses antígenos fúngicos podem ser retirados rapidamente da circulação pela formação de complexos imunes e por endocitose mediada por receptor de células de Kupffer no fígado, limitando a sensibilidade dessas técnicas (Ribeiro *et al.*, 2006; Keutgen *et al.*, 2007; Theel and Doern, 2013). Alguns medicamentos podem causar resultados falsos positivos como o antibiótico piperacilina-tazobactam e os β -lactâmicos, incluindo ampicilina, amoxicilina e amoxicilina-clavulanato (Delabesse *et al.*, 2005). A proteína GM presente no leite e cereais ao atravessar a parede intestinal lesada por quimioterapia pode também originar resultados falso-positivos. Índices mais elevados de falso-positivos são registrados em pacientes pediátricos, possivelmente devido à dieta baseada em leite (McLintock *et al.*, 2004). Outras causas de falsa positividade incluem a nutrição parenteral com proteínas de grãos de soja e bacteremia por bactérias Gram positivas (Miyazaki *et al.*, 1995; Delabesse *et al.*, 2005). A hemólise, hemodiálise usando membranas de celulose, fator reumatóide e concentrações elevadas de bilirrubina ou triglicérides séricos também são inibidores desses ensaios (Keutgen *et al.*, 2007).

Testes comercialmente disponíveis para detecção de antígeno fungico apresentam bons níveis de especificidade, mas a sensibilidade fica em torno de 50% dos casos comprovados (Wheat, 2006). Pacientes com infecção disseminada podem apresentar baixas concentrações séricas do antígeno circulante, dificultando sua detecção (Delabesse *et al.*, 2005).

Os métodos de biologia molecular surgiram como alternativa para a detecção rápida de infecção fúngica que são difíceis ou até impossíveis de serem detectadas pelos métodos convencionais microbiológicos e sorológicos. Pode-se destacar que a principal técnica de biologia molecular utilizada para diagnóstico de microrganismos é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988; Nussbaum *et al.*, 2010).

A técnica PCR simples convencional consiste na amplificação de sequências de DNA “*in vitro*” a partir de reduzidas concentrações de molde de DNA, entendendo-se aqui por DNA genômico de microrganismo em amostras clínicas, e iniciadores específicos complementares às extremidades 5’ das sequências do gene alvo do microrganismo sob investigação, sendo o princípio da reação baseado nos elementos básicos da replicação do DNA (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988; Griffiths *et al.*, 2010).

O desenho de iniciadores específicos é essencial para o sucesso da reação de PCR. Erros no desenho dos iniciadores podem resultar na possível formação de dímeros de iniciadores (amplificação inespecífica a partir do anelamento das extremidades 3’ complementares dos iniciadores sobre si mesmos), assim como, na detecção de falsos positivos decorrente da limitação de ajuste da temperatura de anelamento devido às diferentes temperaturas de dissociação (TM) iniciador-molde de DNA (Luo and Mitchell, 2002).

A literatura tem relatado níveis de sensibilidade de 100% para o diagnóstico de infecção fúngica em amostras de sangue em modelo animal (Denveter *et al.*, 1995), e em pacientes neutropênicos (Hebart *et al.*, 2000; Avini *et al.*, 2010).

A PCR multiplex, variante da PCR simples, consiste na amplificação de múltiplos alvos em uma única reação, utilizando mais de um par de iniciadores (Rashmi *et al.*, 2013). As vantagens da reação da PCR multiplex podem ser ilustradas nos seguintes casos: (1) na amplificação simultânea de sequência alvo em gene humano (controle interno da preparação da amostra), e alvo em

gene do microrganismo para detecção da infecção; (2) na identificação de espécies diferentes, para diagnóstico de infecção múltipla por diferentes espécies de um mesmo microrganismo; e (3) por diferentes tipos de microrganismos infectantes (Chamberlin *et al.*, 1994; Luo and Mitchell, 2002, Lehmann *et al.*, 2007; Lamothe *et al.*, 2010; Nussbaum *et al.*, 2010, Mandhaniya *et al.*, 2011). O diagnóstico de infecção fúngica em amostra de cultura de sangue de pacientes suspeitos utilizando PCR convencional multiplex e comparados com testes microbiológicos (exame direto e cultura) tem apresentado sensibilidade e especificidade em torno de 95-100% e 85-100% respectivamente (Chang *et al.*, 2001; Luo and Mitchell, 2002). Essa técnica tem a vantagem de promover a redução do tempo e trabalho dentro do laboratório de pesquisa e diagnóstico, além da redução na quantidade de amostra e reagentes utilizados, e redução dos custos finais (Lehmann *et al.*, 2007; Louie *et al.*, 2008).

A PCR em tempo Real (qPCR), outra variante da técnica de PCR convencional, tem a vantagem de quantificar a expressão gênica, ou seja, a carga infecciosa. Os sistemas de detecção mais utilizados são o *SYBR Green* e o *TaqMan*. O sistema *SYBR Green* utiliza o fluoróforo de mesmo nome, que tem a propriedade de emissão de luz ao se intercalar com as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos em DNA fita dupla. As vantagens da utilização do *SYBR Green* são: baixo custo, facilidade no uso e maior sensibilidade em relação a PCR convencional. A limitação desse sistema deve-se a ligação inespecífica do fluoróforo em DNA dupla fita, de forma que dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos também contribuem para a fluorescência total do sistema, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo e/ou inviabilizar a detecção de baixas cópias de DNA alvo (Gachon *et al.*, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

O sistema de detecção *TaqMan* utiliza, além dos iniciadores nas extremidades da sequência alvo para a amplificação do fragmento gênico de interesse, sonda de DNA complementar e altamente específica a região interna da sequência alvo, marcadas com fluoróforos, as quais liberam fluorescência apenas na formação do produto de PCR de interesse. A sonda utilizada na reação apresenta em uma extremidade um fluoróforo e na outra extremidade um supressor - *quencher* - molécula que absorve energia do fluoróforo na

forma de luz e a dissipa na forma de calor quando estão próximos, ou seja, quando ambos estão ligados a sonda na ausência de reação de amplificação da sequência alvo. Durante a etapa de amplificação da sequência alvo, a degradação da sonda leva ao distanciamento da molécula *quencher* do fluoróforo, que emite fluorescência em um comprimento de onda superior ao da excitação promovida pelo laser, que ao ser detectada é convertida em sinal elétrico. Softwares específicos interpretam o sinal elétrico com a visualização de curva de produção de cópias de fragmentos, permitindo a quantificação das mesmas (Novais and Pires-Alves, 2004; Cuenca-Estrella *et al.*, 2009).

Dados da literatura, quanto a sensibilidade e especificidade da qPCR usando o sistema *TaqMan* para diagnóstico de infecção fúngica em amostras clínicas, tem sido bastante variados, principalmente devido aos diferentes desenhos experimentais, incluindo tipo de amostras e padrão-ouro utilizado. O diagnóstico utilizando o sistema *TaqMan* com par de iniciadores únicos (forma simples), utilizando como padrão-ouro cultura e resultados clínicos mostram melhores taxas de sensibilidade e especificidade (91,6% e 94,4% respectivamente), do que estudos utilizando PCR multiplex e comparados exclusivamente com diagnóstico microbiológico (50-63% e 41-81% respectivamente) (Cuenca-Estrella *et al.*, 2009; Mandhaniya *et al.*, 2011; Grif *et al.*, 2012).

Com o advento da PCR multiplex (Luo and Mitchell, 2002), da PCR em tempo real (Pryce *et al.*, 2003) no diagnóstico de fungos e incremento na eficiência da automação, os custos das técnicas de biologia molecular estão decrescendo enquanto que o seu uso vem aumentando para a detecção de patógenos importantes para a saúde humana (Kubista *et al.*, 2006). Métodos moleculares baseados na PCR representam uma ferramenta importante para a detecção precoce das infecções fúngicas invasivas, principalmente, quando a metodologia utilizada envolve uma etapa de hibridação específica seguida da PCR (Eriksson *et al.*, 2009).

2.3 ALVOS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

Diversos genes que codificam diferentes regiões do genoma de fungos podem ser usados como marcadores moleculares para identificação de uma infecção fúngica.

A região dos microssatélites tem sido utilizada para determinação de espécies do gênero *Candida* e *Aspergillus* usando PCR multiplex, isto se dá devido a variabilidade existente nesta região gênica entre diferentes espécies pertencentes a um mesmo gênero (Tran-Dinh and Carter 2000; Sampaio *et al.*, 2005).

O DNA mitocondrial dos fungos (mtDNA) é formado por subunidades maior (LSU) e menor (SSU), encontrado na matriz mitocondrial de estruturas chamadas nucleóidos, que podem conter de 4 a 5 cópias e considerado marcador molecular para estudo da variabilidade entre gêneros e espécies de fungos, em ensaios de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Hamari *et al.*, 2003; Juhász *et al.*, 2007).

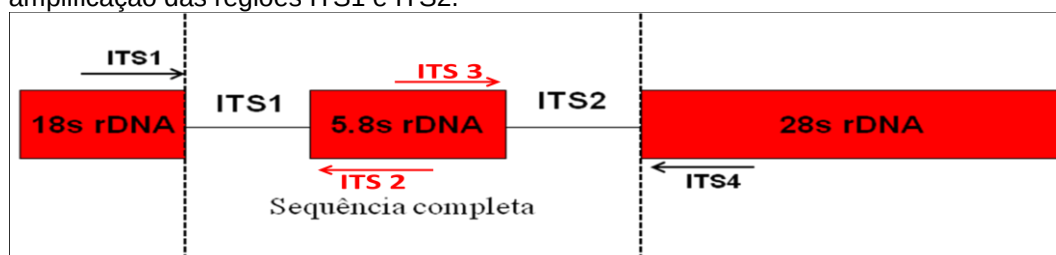
A protease aspártica secretada (SAP) é codificada por 10 genes e está relacionada à formação de biofilme, sendo importante alvo para diagnóstico devido ao número de cópias do gene e a relação direta com a resistência da *Candida* aos principais antimicóticos utilizados no tratamento contra infecção fúngica, permitindo a identificação de casos graves da doença e ajuste no tratamento (Kumamoto *et al.*, 2005). O gene que transcreve a proteína da parede das hifas (HWP1) (Staab *et al.*, 1999) e o gene para as sequências similares a aglutininas (ALS) (Hoyer *et al.*, 2008) que codificam glicoproteínas associadas a superfície celular também estão envolvidos no crescimento do biofilme em *Candida*, podendo ser detectados por técnicas de biologia molecular como PCR convencional em tempo real (Nailis *et al.*, 2011) visando relacionar a presença destes genes a maior virulência do fungo devido a sua resistência a antimicóticos (Calderone and Fonzi, 2001).

A maioria dos ensaios para detecção fúngica utiliza como alvo os genes de cópias múltiplas visando aumentar o limite de detecção da reação (Jordanides *et al.*, 2005; Gurtner *et al.*, 2007; Lamothe *et al.*, 2010; Mandhaniya *et al.*, 2011).

As regiões gênicas mais utilizadas em biologia molecular para detecção de fungos são as que transcrevem os DNA ribossômicos (rDNA), porque encontram-se em grande número de repetições consecutivas (*'tandem'*) (White *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 2006).

O rDNA dos fungos consiste em 3 genes, o gene da subunidade maior (25S), o gene da subunidade menor (18S) e o gene 5.8S. A região ITS (*"Internal Transcribed Spacer"*) é uma região conservada do genoma dos fungos que se encontra em múltiplas cópias. A ITS possui duas regiões: a ITS-1 localizada entre o gene 18S e o 5.8S, a qual é amplificada pelos oligonucleotídeos universais ITS1 e ITS2; e a região ITS2 localizada entre o gene 5.8S e o 25S, sendo amplificada pelos iniciadores ITS3 e ITS4. O fragmento total da ITS, incluindo a região 5.8S, é obtido na amplificação com os iniciadores ITS1 e ITS4, e apresenta tamanho variando entre 600 a 800 pares de bases (Figura 1) (White *et al.*, 1990; Gardes and Bruns, 1993; Mercure *et al.*, 1993).

Figura 1 - Diagrama do rDNA de fungos pontuando iniciadores ITS1 e ITS4 utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2.



Adaptada de White *et al.* (1990).

Esta região ITS é de particular importância para o diagnóstico de fungos por ter áreas altamente conservadas e áreas de alta variabilidade entre diferentes espécies de fungo, o que pode possibilitar o diagnóstico entre eles (White *et al.*, 1990; Khot *et al.*, 2009).

2.4 VALIDAÇÃO DE TESTE DIAGNÓSTICO

A impressão clínica sugere uma hipótese diagnóstica (característica que separa indivíduos, indica desfecho, tratamento e mudança de padrão pós-tratamento) que deve ser confirmada com testes paraclínicos. A identificação de casos depende de uma boa organização e estrutura para o processo

diagnóstico; a qualidade da formulação e a validação do método. Esses critérios previamente estabelecidos para definição de doença são chamados de “padrão ouro”. Desta forma uma definição diagnóstica clínica ou testes já aprovados e em uso no mercado podem ser usados como padrão ouro para comparação de resultados de novos testes diagnósticos (Almeida, 2008; Burd, 2010).

Novos testes diagnósticos devem ser capazes de categorizar corretamente as pessoas realmente doentes como positivas (sensibilidade) e as realmente saudáveis como negativas (especificidade), sendo a fração dos resultados positivos que identificam doentes o valor preditivo positivo, e a fração dos resultados negativos que indicam indivíduos saudáveis o valor preditivo negativo do teste (Branscum *et al.*, 2005; Burd, 2010).

A validação de um teste pode ser: (1) interna, quando se compara um novo teste diagnóstico, em condições específicas de laboratório, com um método de referência no mercado; tendo a finalidade de separar os indivíduos doentes dos saudáveis e de diferenciar doenças; (2) externa, quando se avalia o desempenho do teste novo em diferentes condições, i.e., diferentes ambientes, metodologia executada por diferentes profissionais, utilização de diferentes materiais etc; permitindo analisar a reprodutibilidade a partir da repetição do teste (Burd, 2010).

O processo de validação de teste diagnóstico inclui cinco etapas ou fases bem definidas. A fase I inclui o desenvolvimento, otimização e padronização das técnicas a serem utilizadas no teste diagnóstico, não apresenta grupo controle, tem a finalidade de verificar a viabilidade da técnica, e se é de fácil manuseio para ser incluída no mercado; a fase II visa estimar a acurácia, incluindo os cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos com base no “padrão ouro” para cada doença ou teste diagnóstico a ser testado, nesta etapa devem ser incluídos como controle do teste amostras sabidamente negativas (controle negativo); a fase III também estima a sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste diagnóstico em validação, mas a população alvo são casos suspeitos; a fase IV inclui a validação laboratorial com base na reprodutibilidade do teste diagnóstico e eficácia clínica; e a fase V visa a comercialização do teste diagnóstico incluindo a estimativa de custo-efetividade na rede de saúde, seu monitoramento, e

observação da manutenção do critério de validação, utiliza como controle tanto indivíduos sadios como doentes, incluindo aqueles com co-morbidade e apresentando qualquer forma ou gradiente da doença a ser diagnosticada com o teste diagnóstico (Filho, 2012).

As etapas de validação de novos testes são, portanto, importantes para consolidação de métodos de investigação de doenças em saúde pública, pois só a partir disto se torna possível aplicar técnicas diagnósticas adequadas para estudos na população visando à identificação e posterior tratamento de indivíduos portadores de doenças em sua fase pré-clínica, identificação doenças em população de difícil diagnóstico como nos imunocomprometidos e determinação da gravidade de doenças. (Crowther *et al.*, 2006)

3 JUSTIFICATIVA

A infecção fúngica não diagnosticada representa risco de morte em pacientes imunocomprometidos em uso de quimioterápicos (pacientes oncológicos) ou imunossupressores (transplantados), recém-nascidos de alto risco, idosos com redução da capacidade motora e comorbidades, portadores de HIV, dentre outros. O exame direto é pouco sensível, principalmente, em diagnóstico de fungemia. A cultura é o padrão-ouro da infecção, mas além de ser tecnicamente laboriosa e demorada, sofre influência da forma de coleta e meio de transporte da amostra. A dificuldade em firmar o diagnóstico microbiológico de infecção fúngica induz ao tratamento de exclusão, i.e., o diagnóstico é confirmado pela ausência de melhora clínica do paciente após uso de antibióticos de largo espectro, e pela melhora clínica com uso de terapia antifúngica. Nesse contexto, um teste molecular específico, sensível e rápido é indicado no diagnóstico de casos suspeitos, no controle de pacientes transplantados e na pesquisa de fontes de infecção fúngica hospitalar. A sensibilidade e a rapidez do teste molecular para infecção fúngica representam vantagens em relação à hemocultura, permitindo a instalação precoce da terapia antifúngica, contribuindo para diminuir a mortalidade relacionada à infecção fúngica, e o tempo de internação desses pacientes em unidades de saúde, levando a uma redução nos custos hospitalares.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação de desempenho de teste molecular para a detecção de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer condições de reação de PCR convencional simples e multiplex para detecção de infecção fúngica;
- Determinar a sensibilidade e especificidade dos testes moleculares para detecção de fungos patogênicos em pacientes imunocomprometidos com suspeita de infecção fúngica;
- Definir a frequência das diferentes espécies de fungos detectados;
- Avaliar a concordância entre o teste molecular e o padrão-ouro composto pelo diagnóstico micológico, clínica e teste terapêutico;
- Estabelecer as condições experimentais de PCR em tempo real utilizando o sistema SYRB *Green*® e *TaqMan*® para detecção das espécies de fungo.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1. CONSTRUÇÃO DE CONTROLES PLASMIDIAIS POSITIVOS PARA TESTE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

5.1.1. Isolados de fungo

Material inativado de isolados dos fungos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* foram gentilmente cedidos pelo Setor de Micologia do Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Pernambuco, através da Sra. Élcia Cauas. Os referidos fungos foram utilizados para testes com os iniciadores específicos obtidos na literatura para amplificação das diversas espécies fúngicas estudadas, com o objetivo de subclonagem do fragmento amplificado para a construção de controles positivos para o teste de diagnóstico da infecção fúngica.

5.1.2. Extração de DNA genômico

Massa de isolados de cultura fúngica foram submetidas a lise celular com 700 µL do reagente DNAzol BD (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e a precipitação de DNA com 200 µL de isopropanol em temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado foi obtido por centrifugação a 3.000 x g durante 6 minutos e lavado com etanol 75% e, após rápida secagem, foi ressuspenso em 250 µL de água tratada com DEPC (Diethyl Pirocarbonato, livre de RNA, DNA e resíduos de proteínas). Na presença de impurezas, o DNA extraído foi submetido à purificação com solução de fenol-clorofórmio, visando à remoção de inibidores da reação da DNA polimerase presentes no sangue. A purificação consistiu em adicionar 1 volume da solução de DNA com partes iguais de uma solução de fenol-clorofórmio, homogeneizar no vórtex e centrifugar por 5 minutos a 13.000 x g. Em seguida, a fase superior aquosa (que contém o DNA) foi transferida para um microtubo limpo e adicionado a 1 volume de clorofórmio para remoção de traços de fenol da preparação. O conteúdo de DNA foi recuperado da fase superior após nova centrifugação. O DNA genômico obtido

foi precipitado com a adição de acetato de sódio 3 M em um volume correspondente a 1/10 do volume do sobrenadante acrescidos de 2 volumes de etanol 100% permanecendo cerca de 18 h em -20°C. Após a centrifugação a 13.000 x g, a 4°C, o precipitado de DNA foi lavado com álcool 70 %, seco e ressuspensão em 30 µL de água DEPC. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade determinada pela visualização em gel de agarose a 1%.

5.1.3. Reação em cadeia da DNA polimerase

O DNA genômico extraído de cada isolado de fungo (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*) foi inicialmente submetido à reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), com iniciadores específicos para o elemento genético ITS, que consiste em sequência conservada da região intercalante do gene ribossomal comum as espécies de fungo de acordo com o descrito na literatura (Luo and Mitchell, 2002). O volume total da reação foi de 25 µL e incluiu 1,5 mmol de cloreto de magnésio (MgCl₂), 25 pmoles de cada iniciador (senso 5'cgagctgcgcgatggcgaac 3' e anti-senso 5'taggtgctggtggtccgaag 3'), 200 µmol de cada dNTP's e 1,25 unidades de DNA polimerase. As condições para amplificação do elemento ITS no aparelho termociclador foram: um ciclo de 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação; 60 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 1 minuto para extensão; e, finalmente, um ciclo de 7 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 2,5 % sob luz UV e a reação foi considerada positiva quando a banda corada por brometo de etídio correspondia a 600 pb.

O DNA genômico de cada espécie de fungo isolada (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*) também foi submetido a PCR com iniciadores específicos complementares a região do gene *DNA ribossomal* conforme descrito por Luo e Mitchell (2002) e apresentados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção de diferentes espécies fúngicas.

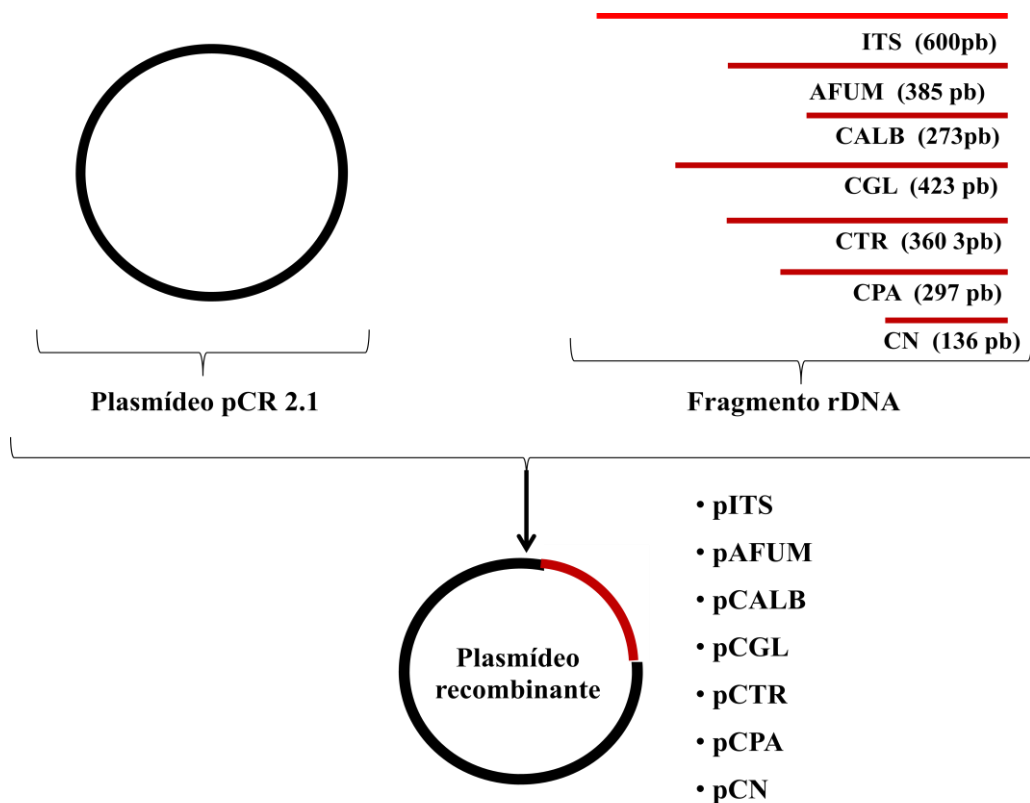
	Fungo	Nome	Tamanho fragmento	Inicializadores	Acesso no GenBank
Multiplex 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AFUM1 + AFUM2	385 pb	5'-CGCCGAAGACCCCAACATGAACGC-3' (Fwd) 5'-TAAAGTTGGGTGTCGGCTGGC-3' (Rev)	AF176662, F078889
	<i>Candida albicans</i>	CALB1 + CALB2	273 pb	5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3' (Fwd) 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3' (Rev)	L47111, L28817
	<i>Candida glabrata</i>	CGL1 + CGL2	423 pb	5'-TTATCACACGACTCGACACT-3' (Fwd) 5'-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3' (Rev)	AB032177, F167993
	<i>Candida tropicalis</i>	CTR1 + CTR2	360 pb	5'-CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT-3' (Fwd) 5'-TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT-3' (Rev)	AF287910, F268095
	<i>Candida parapsilosis</i>	CPA2 + CPA3	297 pb	5'-GCCAGAGATTAACTCAACCAA-3' (Fwd) 5'-CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC-3' (Rev)	AF287909, L47109
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CN4 + CN5	136 pb	5'-GAAGGGCATGCCTGTTTGAGAG-3' (Fwd) 5'-ATCACCTTCCCACTAACACATT-3' (Rev)	M94516, M94517

Luo and Mitchell (2002).

5.1.4. Reação de Ligação

Os produtos das PCRs para o alvo ITS e rDNA obtidos com cada uma das sequências de DNA dos fungos estudados foram inseridos no vetor pCR2.1 incluso no kit *TA Cloning®* (Invitrogen) seguindo o fluxograma apresentado na Figura 2.

Figura 2. Estratégia de construção dos controles positivos do teste molecular para detecção de infecção fúngica. Plasmídeo recombinante formado pela ligação do vetor pCR2.1 com as sequências gênicas dos fungos *A. fumigattus* (AFUM), *C. albicans* (CALB), *C. glabrata* (CGL), *C. tropicalis* (CTR), *C. parapsilosis* (CPA), *C. neoformans* (CN) e o elemento de inserção ITS.



LYRA, Juliana (2014).

A reação de ligação do inserto no vetor foi realizada na proporção de 1:1 que foi calculado como segue:

$$X \text{ ng Produto de PCR} = \frac{(Y \text{ pb Produto de PCR})(50 \text{ ng pCR@2.1 vector})}{(\text{Quantidade de pb do pCR@2.1 vector: } \sim 3900)} \quad (1)$$

Foram misturados 2 µL de vetor (25 ng/µL), 1µL de tampão (10x), 1 µL de T4 DNA ligase (4.0 Weiss u/µL) e a concentração adequada do produto de PCR de acordo com o seu tamanho, para um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 14 °C por 12 horas.

5.1.5. Transformação bacteriana

Células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue em volume de 100 µL foram misturadas a 10 µL da reação da ligação, incubadas por 30 minutos em gelo, colocadas em choque térmico a 42 °C, por 45 segundos, e imediatamente colocadas no gelo por 2 minutos. Ao tubo foram adicionados 900 µL do meio de cultura líquido (Luria-Bertani, LB) e, posteriormente, incubado a 37°C em estufa por 1 hora. As placas de meio LB sólido acrescidas de ampicilina (100 mg/mL LB) foram sensibilizadas com solução X-Gal/IPTG por 30 minutos antes de serem usadas na semeadura das bactérias transformadas. Esta solução foi preparada com 50 µL de X-Gal em dimetilsulfóxido (DMSO) acrescido de 25 µL de isopropiltiogalactosídeo (IPTG) e 25 µL de LB líquido. Colônias brancas foram consideradas positivas, ou seja, que apresentam a interrupção do gene da β-lactamase devido à inserção do fragmento de DNA de interesse.

5.1.6. Extração do plasmídeo

Os clones bacterianos recombinantes positivos foram inoculados em 3 mL de meio seletivo (LB líquido com ampicilina) a 37 °C para extração de plasmídeo e averiguação da subclonagem do DNA de interesse. O precipitado de bactérias obtido de uma cultura noturna através de centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos foi ressuspenso em 100 µL da solução GTE (50 mM glicose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) mais 1 µg/µL de RNase e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 200 µL da solução 0,2 M de Hidróxido de sódio (NaOH) / 0,2% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e colocadas em gelo por 3 minutos. A precipitação de proteínas e DNA foi obtida incubando a solução com 150 µL acetato de potássio por 10 minutos. A purificação do plasmídeo foi realizada adicionando igual volume de uma solução de fenol-clorofórmio e centrifugando por 2 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi removido para tubo limpo, e acrescido de igual volume de clorofórmio visando à remoção de restos de fenol e possível inibição das reações subsequentes. Finalmente, o plasmídeo foi concentrado através da precipitação com 0,6 volume de isopropanol P.A. por 10 min. O plasmídeo

precipitado foi lavado com álcool 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água destilada autoclavada.

5.1.7. Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada utilizando 2 µL da solução de plasmídeo e 498 µL de água destilada (diluição de 1/250) em cubeta de quartzo no espectrofotômetro *Eppendorf Bio photometer*[®]. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, sendo a concentração de DNA determinada conforme a reação abaixo considerando a leitura a 260 nm:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \text{ (DNA fita dupla)} \times 250 \text{ (fator de diluição)} \mu\text{g/mL} \quad (2)$$

A qualidade da preparação foi aferida através da relação entre as leituras na faixa 260/280 nm, que denota a relação entre DNA/proteína na solução. Uma relação entre 1,8-2,0 representa um bom grau de pureza da preparação.

5.1.8. Restrição dos Plasmídeos

Todos os plasmídeos foram clivados com as enzimas *Xba* I e *Hind* III (*Pharmacia Biotech*[®]) para detecção do inserto subclonado, na reação foram usados 1x tampão, 3µg de cada plasmídeo isoladamente, 5 U (*Xba* I), 9 U (*Hind* III) e água destilada para um volume final de 15 µL. O produto de digestão foi analisado em gel de agarose. Foi considerado positivo os clones que apresentaram duas bandas, uma correspondendo ao vetor (~3900 pb) e outra ao inserto (~250 pb).

5.1.9. Sequenciamento

Todos os plasmídeos construídos foram sequenciados. Cada reação incluiu 10 ng do DNA plasmidial, 1 µL do iniciador M13Rev (3,3 pmol/µL, oligonucleotídeo complementar a sequência do vetor que flanqueiam o sítio de inserção do fragmento clonado, 0,5 µL Big Dye, 1 µL Save Money Tampão (Amersham®) e o volume ajustado com água destilada à 10 µL. A reação foi incubada nas seguintes condições: 92 °C por 2 minutos, 40 ciclos envolvendo 92 °C por 15 segundos, 55 °C por 10 segundos, e 60 °C 4 minutos. As amostras foram precipitadas com álcool isopropílico, lavadas e ressuspensas em 10 µL do reagente *High Dye Formamide*. A corrida de sequenciamento foi realizada no equipamento ABI3100 (Applied Biosystems). Posteriormente os plasmídeos foram quantificados em espectofotômetro (Nanodrop, Thermo)

5.2. AVALIAÇÃO DO TESTE DE PCR CONVENCIONAL PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

5.2.1. População de estudo

A avaliação do teste molecular para detecção de infecção fúngica em amostra clínica foi realizada em 84 pacientes de três hospitais do Estado de Pernambuco, sendo 37 pacientes neonatos do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), 43 pacientes adultos em tratamento oncológico do Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE) e apenas 4 (3 adultos em tratamento oncológico e um neonato) do Hospital Esperança (HE) com um total de 144 amostras de sangue coletadas desses pacientes. A amostra utilizada foi sangue, devido à relação entre o risco de óbito na presença de fungemia em pacientes imunocomprometidos.

Os critérios de inclusão para os pacientes do HAM foram neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva neonatal no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2010 com suspeita de infecção, cujos genitores concordaram em participar do estudo, expressando a concordância pelo TCLE e autorizaram a coleta de 0,5 mL de sangue do infante para diagnóstico molecular de infecção fúngica. A coleta foi realizada no momento da suspeita

de infecção (menor expectativa de infecção fúngica), e após uma média de cinco dias de antibioticoterapia sem melhora do quadro clínico antes do início do tratamento antifúngico (maior expectativa de infecção fúngica), configurando primeira e segunda amostra de um mesmo evento. A avaliação clínica dessas crianças, incluindo exame radiológico, avaliação microbiológica e resposta a tratamento antifúngico, foi realizada pelo médico Moacir Batista Jucá.

Os critérios para inclusão dos pacientes do HEMOPE foram: episódios de neutropenia febril em pacientes internados com diagnóstico de neoplasia, definidos pela contagem de neutrófilos abaixo de $500/\text{mm}^3$ ou apresentando uma contagem menor que $1000/\text{mm}^3$ com tendência a redução; febre, não relacionada a transfusão de hemoderivados, definida por temperatura $> 37,5^\circ\text{C}$ independente do tempo de duração. Além disso foram incluídos os que concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido-TCLE. Para cada episódio de neutropenia febril (evento) foram colhidas uma ou duas amostras de sangue do paciente com intervalo de 3 a 5 dias entre elas a depender do início da administração de antifúngicos, i.e., a amostra foi coletada após antibioticoterapia antes do uso de antifúngico. No HEMOPE os pacientes oncológicos com neutropenia febril fizeram uso profilático com Anfotericina B, podendo interferir no diagnóstico de algumas espécies de *Candida* sensíveis ao antifúngico. A avaliação clínica dos pacientes oncológicos adultos, incluindo exame radiológico, avaliação microbiológica e resposta a tratamento antifúngico foi realizada pelo médico oncologista Heberton Medeiros Teixeira.

Os pacientes entraram na pesquisa em fluxo contínuo durante o período do estudo, conforme os critérios de inclusão mencionados. Vários eventos de um mesmo paciente foram identificados pela data da coleta da primeira amostra.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães sob registro CAAE 0065.0.095.172-09.

5.2.2. Padrão-ouro do teste

A infecção fúngica foi definida pela hemocultura positiva, imagem radiológica sugestiva, fundo de olho sugestivo, antígenos circulantes e resposta

clínica. O principal critério foi a resposta clínica, definida como desaparecimento da febre em até 72 horas após introdução do antifúngico.

5.2.3. Diagnóstico micológico

O diagnóstico micológico (exame direto e cultura) foi realizado no Setor de Micologia do Laboratório Público Central de Pernambuco (LACEN-PE). O exame direto foi realizado em esfregaço de sangue periférico tratado com solução KOH a 20-30 %, seguidos de pesquisa de tinta nankin e coloração de Giemsa. As amostras de sangue também foram cultivadas em meio Sabouraud com e sem antibiótico, e em meio BHI com antibiótico e incubadas a 37 °C por 14 a 21 dias. Métodos automatizados foram utilizados na identificação de leveduras (ID32C, BioMerieux AS) e determinação de fungigrama para leveduras (ATB Fungus 3, BioMerieux AS). Os testes foram cegos para quem realizou as reações moleculares, i.e., os resultados das culturas foram disponibilizados apenas ao final do estudo.

5.2.4. PCR convencional multiplex

DNA genômico obtido de amostras de sangue periférico (300 a 500 µL) de pacientes com suspeita de infecção fúngica foram submetidas a PCR com iniciadores direcionados para uma região alvo do DNA humano (*GAPDH* – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) visando atestar a ausência de inibidores de PCR na preparação de DNA da amostra, i.e, como controle positivo da extração de DNA.

As amostras positivas para o gene constitutivo humano *GAPDH* foram submetidas a PCR para detecção do elemento fúngico ITS, conforme descrito acima. Nessa etapa foi incluído DNA humano de indivíduo sadio, como controle de especificidade da reação.

As amostras positivas para infecção fúngica (PCR para alvo ITS positiva) foram submetidas a PCR tipo multiplex (pesquisa de mais de um alvo em mesma reação) para determinação da espécie de fungo infectada. Nessa etapa, as amostras foram submetidas a duas reações de PCR multiplex com iniciadores específicos (Tabela 1) para a identificação das espécies *Candida*

glabrata, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na multiplex 1, e para as espécies de *Aspergillus spp*, *Criptococcus neoformans* e *Candida albicans* na multiplex 2. As condições de PCR para cada reação específica foram conforme descrito por Luo e Mitchell (2002) com discretas modificações ajustadas às condições estruturais e ambientais de execução testadas durante etapas de otimização. O volume total da reação foi de 20 µL e incluiu 1,5 mmol de MgCl₂, 10 pmoles de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP e 0,75 unidades de DNA polimerase. As condições para amplificação foram: um ciclo de 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação; 60 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 1 minuto para extensão; e, finalmente, um ciclo de 7 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose a 2,0 % sob luz UV, sendo considerados positivos os resultados onde as bandas visualizadas correspondiam ao tamanho do fragmento indicado na Tabela 1.

Os controles negativos utilizados foram uma mistura da reação sem amostra de DNA e uma mistura contendo DNA humano de indivíduo sadio. Os controles positivos utilizados para cada fungo testado foram plasmídeos na concentração de 10 ng por reação.

5.3. AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (QPCR) NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

A avaliação das condições de qPCR simples foram estabelecidas utilizando os plasmídeos contendo a sequência parcial de rDNA de cada fungo testado empregando ambos os sistemas *SYBR Green*[®] e *TaqMan*[®].

5.3.1. Sistema de detecção *SYBR Green*

Esse sistema tem como princípio a propriedade intercalante do corante *SYBR-Green* na estrutura dupla fita do DNA. As etapas de otimização da reação incluíram: (1) o estabelecimento das condições ótimas da concentração dos iniciadores na reação para o diagnóstico de cada espécie de fungo estudada; (2) comprovação da temperatura de anelamento para amplificação de cada reação, do protocolo obtido na literatura e do modificado durante o processo de análise na PCR convencional; (3) testes para verificar o limite de

detecção do DNA plasmidial nas condições previamente estabelecidas para cada uma das seis espécies de fungos testados.

A análise realizada foi do tipo *plus-minus* objetivando um teste qualitativo e o equipamento utilizado um ABI7500 (Applied Biosystems, EUA) disponível do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

5.3.1.1. Determinação da concentração dos iniciadores

Testes preliminares com diferentes concentrações dos iniciadores (25 pmol, 12 pmol, 6 pmol, 3 pmol e 1,5 pmol) foram realizadas para definir quais as condições ideais de cada PCR individualmente. Foram utilizados os seguintes pares de iniciadores: CALB1 + CALB2, CTR1 + CTR2, CPA2 + CPA3, CGL1 + CGL2, CN4 + CN5 e AFUM1 + AFUM2. Em cada reação foram utilizados controles negativos da reação com ou sem DNA humano, e os plasmídeos específicos para cada reação considerando os pares de iniciadores e a espécie de fungo investigada. Todas as amostras foram aplicadas em duplicata.

A concentração dos componentes testados na reação (20 µL) foi: 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (2×), 7 µL de água DEPC e 1 µL do plasmídeo (25 ng); e, 1 µL do iniciador senso e 1 µL do iniciador anti-senso de cada espécie nas concentrações testadas. As condições iniciais para a amplificação foram as seguintes: 95 °C / 10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 60 °C / 1 min e 72 °C / 1 min.

5.3.1.2. Determinação da temperatura de anelamento dos iniciadores

Além da temperatura padrão de anelamento do termociclador (60 °C), foram testadas duas temperaturas adicionais de anelamento dos iniciadores com o objetivo de avaliar a ocorrência de aumento na eficiência da reação associada ao aumento da temperatura. As temperaturas avaliadas foram de 62 °C e 65 °C. A temperatura de anelamento de 62 °C foi utilizada para todos os conjuntos de iniciadores estudados: CALB1 + CALB2, CTR1 + CTR2, CPA2 + CPA3, CGL1 + CGL2, CN4 + CN5 e AFUM1 + AFUM2 com seus respectivos plasmídeos na reação. A temperatura de 65 °C não foi utilizada com o par de

iniciadores que detectam *A. fumigatus* e *C. parapsilosis* visto que a eficiência já foi reduzida com a temperatura de 62 °C comparada com a de 60 °C. As concentrações dos reagentes utilizados foram: 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (2X) 1 µL do iniciador senso (5 pmol), 1 µL do iniciador anti-senso (5 pmol) de cada espécie, 7 µL de água DEPC e 1 µL do plasmídeo (10 ng). Em todos os testes foram incluídos controles negativos da reação e todas as amostras foram aplicadas em duplicata. As condições para a amplificação foram as seguintes: 95 °C / 10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 62 °C / 1 min ou 65 °C / 1 min e 72 °C / 1 min.

5.3.1.3. Determinação da concentração do DNA plasmidial das espécies de fungo estudadas e estabelecimento da curva padrão do teste

Diferentes diluições dos plasmídeos pCALB, pCTR, pCPA, pCGL, pCN e pAFUM foram testadas a fim de estabelecer a curva padrão e identificar a menor concentração de DNA fúngico que poderia ser detectada na reação. As concentrações dos reagentes foram: 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (2X) 1 µL do iniciador senso (5 pmol), 1 µL do iniciador anti-senso (5 pmol) de cada espécie (CALB1 + CALB2, CTR1 + CTR2, CPA2 + CPA3, CGL1 + CGL2, CN4 + CN5 e AFUM1 + AFUM2) , 7 µL de água DEPC e 1 µL do plasmídeo (12,5 ng) e nas seguintes diluições: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 e 1/100.000. Em todos os testes foram incluídos controles negativos da reação e todas as amostras foram aplicadas em duplicata. Foram para isso testadas as 2 melhores temperaturas de anelamento obtidas nos testes de otimização dos iniciadores: 60°C e 62°C.

As condições para a amplificação foram: 95 °C / 10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 60 °C / 1 min ou 62 °C / 1 min e 72 °C / 1 min.

5.3.1.4. Determinação da concentração do DNA humano + DNA plasmidial das espécies de fungo estudadas

Diferentes concentrações de DNA humano foram aplicadas juntamente com os plasmídeos a fim de verificar a inibição da reação pela quantidade de

DNA total (humano e do fungo) na amostra. As concentrações dos reagentes foram: 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (2X) 1 µL do iniciador senso (5 pmol), 1 µL do iniciador anti-senso (5 pmol) de cada espécie, 7 µL de água DEPC, 1 µL do plasmídeo (10 ng) e 1 µL DNA humano nas seguintes concentrações: 200 ng, 100 ng e 50 ng. Em todos os testes foram incluídos controles negativos da reação e todas as amostras foram aplicadas em duplicata. As condições para a amplificação foram as seguintes: 95 °C / 10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 60 °C / 1 min e 72 °C / 1 min.

5.3.1.5. Teste de formação de dímeros com diferentes pares de iniciadores

Foram realizadas PCRs do tipo multiplex incluindo em cada reação: o plasmídeo contendo a sequência do fungo analisado, seu respectivo par de iniciadores e um par de iniciadores diferente com a finalidade de verificar reação cruzada entre os diferentes pares de iniciadores. Para este teste foram escolhidos os conjuntos de iniciadores e plasmídeos que apresentaram os melhores resultados na curva padrão.

Para a reação com o plasmídeo pAFUM foram incluídos os seguintes pares de iniciadores: AFUM + CALB, AFUM + CTR e AFUM + CGL. Para a reação com o pCALB os seguintes pares de iniciadores: CALB + AFUM, CALB + CTR e CALB + CGL; para a reação com o pCGL, os seguintes pares de iniciador: CGL+ AFUM, CGL+CALB e CGL + CTR; e, para o pCTR: CTR + AFUM, CTR + CALB e CTR + CGL. Em cada reação foram usados 10ng de plasmídeo e 5 pmol de cada iniciador. Os controles negativos usados foram todas as combinações dos iniciadores aplicadas em diferentes reações sem os plasmídeos. As condições para a amplificação foram as seguintes: 95 °C /10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 60 °C / 1 min e 72 °C /1 min, sendo todas as amostras aplicadas em duplicata.

5.3.1.6. Teste de reação cruzada utilizando diferentes plasmídeos com os iniciadores CALB1 e CALB2 em PCR do tipo multiplex

Os pares de iniciadores CALB1 e CALB2 (sendo este último o que apresentou os melhores resultados nos testes anteriores com seu respectivo

plasmídeo) foram utilizados para um teste com diferentes plasmídeos em diferentes reações, visando identificar a ocorrência de resultados inespecíficos e a ocorrência de reação cruzada entre as diferentes espécies de fungo analisadas. As reações foram as seguintes:

Reação 1: Iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB

Reação 2: Iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pAFUM

Reação 3: Iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pCGL

Reação 4: Iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pCTR

Reação 5: Iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pCGL + pCTR

5.3.2. Sistemas de detecção *TaqMan*[®]

Baseados nos resultados obtidos no sistema *SYBR Green* foram realizados testes para análise do tipo quantitativa absoluta utilizando o sistema *TaqMan* com sondas específicas desenhadas com o auxílio do programa Primer Express versão 2.0 (http://home.appliedbiosystems.com/support/tutorials/TaqMan/TaqMan_probes_121502.cfm) e checadas com o banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As sondas foram desenhadas observando os critérios: (1) Tamanho entre 20 e 27 pares de bases; (2) Não ter mais que 4 bases repetidas; (3) Distância de 10 a 20 bases do iniciador que ira anelar na sequência alvo; (4) TM de aproximadamente 10 °C acima do TM dos iniciadores, sendo o TM dos iniciadores entre 58-60 °C; e (5) Conteúdo de Guanina e Citosina (G + C%) de 40-80 %; sendo o critério mais relevante a sequência com menor homologia entre as diversas espécies utilizadas, independente dos demais critérios. Todas as sondas utilizadas foram conjugadas com a fluorescência FAM e o *quencher* MBG, exceto a sonda para o ITS, que foi conjugado com o VIC.

5.3.2.1. Determinação de curva padrão com diferentes concentrações dos plasmídeos analisados com seus respectivos pares de iniciadores e sondas

Depois de estabelecido o protocolo de reação, foram realizados três experimentos em dias diferentes para determinar a curva padrão utilizando

cada sonda com seu respectivo par de iniciador e plasmídeo contendo as sequências de rDNA da espécie de fungo testada em diluições seriadas em duplicata. A equação da reta da curva produzida em função das diferentes concentrações de plasmídeos e seus respectivos ciclos de amplificação referência (CT, *Cycle Threshold*) foi utilizada na determinação das concentrações de DNA de fungo nas amostras.

As condições dos reagentes da PCR para cada reação foram: 10 µL de *TaqMan* Master Mix (2X) 1 µL do iniciador senso (5 pmol), 1 µL do iniciador anti-senso (5 pmol), 6 µL de água DEPC, 1 µL da sonda específica (250 nM) e 1 µL do plasmídeo (100 ng até 0,001 ng). As reações foram testadas para as seguintes espécies fúngicas: *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. neoformans*. As condições para a amplificação foram: 95 °C / 10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 60 °C / 1 min e 72 °C / 1 min.

5.3.2.2. Reação cruzada entre os iniciadores com rDNA dos diferentes plasmídeos analisados

Foram realizados testes com os iniciadores de cada fungo (CALB, CTR, CGL, CN e AFUM) e suas respectivas sondas em presença de rDNA das demais espécies de fungo subclonadas em plasmídeo, visando avaliar a possível reação cruzada entre os iniciadores e sondas e as sequências de DNA de outra espécie de fungo.

As condições dos reagentes da PCR para cada reação foram: 10 µL de *TaqMan* Master Mix (2X) 1 µL do iniciador senso (5 pmol), 1 µL do iniciador anti-senso (5 pmol), 6 µL de água DEPC, 1 µL da sonda específica (250 nM) e 1 µL de plasmídeo em duas diferentes concentrações: 10 ng e 1 ng. As condições para a amplificação foram: 95 °C / 10 min, 40 ciclos de temperatura, sendo 95 °C / 15 seg, 60 °C / 1 min e 72 °C / 1 min.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação do teste molecular na identificação da infecção fúngica foram utilizadas tabelas do tipo 2×2 para cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo utilizando o

programa EpiInfo 6.04. A concordância entre os testes foi avaliada pelo índice Kappa.

6. RESULTADOS

6.1. CONSTRUÇÃO DE CONTROLES PLASMIDIAIS POSITIVOS PARA TESTE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

Sete controles positivos para o teste molecular de infecção fúngica, construídos conforme descrito em materiais e métodos, tiveram sua sequência confirmada pelo seqüenciamento do plasmídeo recombinante.

A lista de plasmídeo utilizando durante o estudo está mostrada na tabela 2.

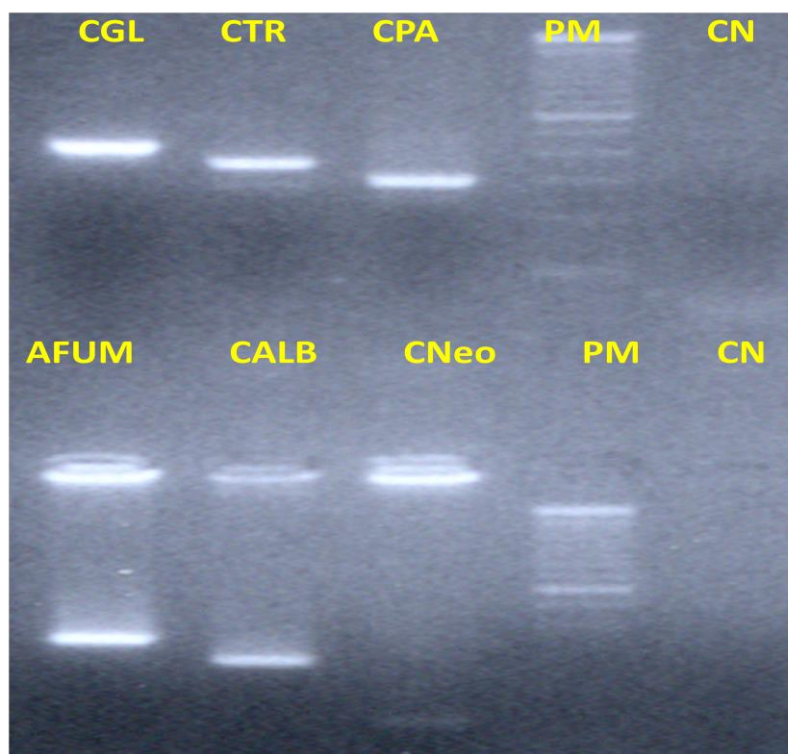
Tabela 2 - Lista de plasmídeos recombinantes contendo sequência de rDNA de espécies de fungos construídos neste estudo como controle positivo do teste molecular.

Plasmídeo	Concentração	A260	A280	260/280	260/230
pCALB	4200,1ng/μL	84,003	41,811	2,01	2,37
pCTR	4338,4ng/μL	86,768	43,206	2,01	2,39
pCGL	4522,9ng/μL	90,459	44,934	2,01	2,39
pCPA	4970,8ng/μL	99,416	49,56	2,01	2,36
pCN	5146,1ng/μL	102,921	50,904	20,02	2,38
pAFUM	5274,9ng/μL	105,498	52,617	2,01	2,36

LYRA, Juliana (2014).

As condições de PCR convencional simples e multiplex publicadas foram reproduzidas utilizando como DNA alvo cada plasmídeo contendo a sequência do rDNA das espécies de fungo subclonada (Figura 3).

Figura 3 - Imagem de gel de agarose de PCR convencional usando plasmídeos controles com sequência fúngica subclonadas. Gel de Agarose 2,5% Parte superior do Gel- PCR Multiplex 1 mostrando, CGL = controle positivo para *Candida glabrata*; CTR = controle positivo para *Candida tropicalis*; CPA = controle positivo para *Candida parapsilosis*; PM = peso molecular 100pb; CN = controle negativo da reação de PCR. Parte inferior do Gel- PCR Multiplex 2 mostrando, AFUM = controle positivo para *Aspergillus fumigatus*; CALB = controle positivo para *Candida albicans*; CNeo = controle positivo para *Cryptococcus neoformans*; PM = peso molecular 100pb; CN = controle negativo da reação de PCR.



LYRA, Juliana (2014)

6.2. AVALIAÇÃO DO TESTE MOLECULAR CONVENCIONAL NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO FÚNGICA

Dos 84 pacientes analisados na pesquisa, 46 foram adultos e 38 neonatos. Dos 46 pacientes adultos foram analisadas 82 amostras distribuídas em 74 eventos de infecção, i.e, 8 das amostras são segundas amostras coletadas de um mesmo evento, visando aumentar a probabilidade de sucesso na cultura. Dos 38 pacientes neonatos foram analisadas 62 amostras distribuídas em 58 eventos, sendo 4 delas segundas amostras de um mesmo evento. Considerando o critério clínico e microbiológico, a frequência de eventos de infecção por fungo foi de 39,2% em pacientes oncológicos adultos e

de 37,9% em neonatos. A frequência de eventos ITS positivos em pacientes adultos oncológicos foi de 67,6% (50 eventos) e 50% em pacientes neonatos (29 eventos).

Considerando os critérios microbiológico e clínico, incluindo resposta ao tratamento antifúngico, como padrão-ouro para definição de infecção fúngica, 55 amostras foram coletadas de pacientes considerados clinicamente com infecção fúngica, e 89 amostras de pacientes sem infecção fúngica. A sensibilidade do teste para detecção da infecção fúngica utilizando a sequência ITS foi de 54,5 % para o grupo neonato e 75,8% para pacientes adultos em quimioterapia. O valor preditivo positivo foi 44%, e o valor preditivo negativo foi de 70% quando analisados os grupos de neonatos e adultos em uso de quimioterápicos juntos, mais detalhes na tabela 3.

Tabela 3 - Indicadores de desempenho da PCR convencional (VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; N, número de amostras; *, número de pacientes testados).

PCR	X	N	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Padrão-ouro						
Neonatais (51*)		62	54,5% (32,7-74,9)	57,5% (41,0-72,6)	41,4% (24,1-60,9)	69,7% (51,1-83,8)
Adultos (49*)		82	75,8% (57,4-88,3)	38,8% (25,5-53,8)	45,5% (32,2-59,3)	70,4% (49,7-85,5)
Neonatais e Adultos (100*)		144	67,3% (53,2-79,0)	47,2% (36,6-58,0)	44,0% (33,4-55,3)	70,0% (56,6-80,8)

LYRA, Juliana (2014).

A PCR convencional mostrou concordância baixa em relação ao diagnóstico de infecção fúngica considerando a clínica associada ao diagnóstico microbiológico e resposta ao tratamento antifúngico como padrão ouro (Tabela 4).

Tabela 4 - Concordância entre PCR convencional e dados clínicos das amostras dos pacientes analisados.

	N	Concordância	Kappa	p-value
Neonatais	62	0,564516	0,112407	0,181542
Adultos	82	0,536585	0,131065	0,084834
Neonatais e Adultos	144	0,548611	0,131403	0,043587

LYRA, Juliana (2014)

Considerando o primeiro evento de infecção nos 38 pacientes neonatos, 15 amostras (39,5%) foram ITS positivas e dessas, 7 (46,7%) coincidiram com o resultado clínico e/ou microbiológico; das 23 primeiras amostras ITS negativas em neonatos 14 (60,9%) tiveram resultado coincidente com o padrão ouro do teste. Em relação ao primeiro evento infeccioso dos 46 pacientes adultos oncológicos, 18 (34,8%) amostras foram ITS positivas, das quais 12 (66,7%) amostras também apresentaram resultado positivo na clínica e/ou microbiológico; e das 28 amostras negativas 11 (39,3%) apresentaram o resultado negativo também quando utilizado o padrão ouro para diagnóstico.

A espécie do fungo foi determinada nas 84 amostras positivas para ITS usando a PCR multiplex conforme apresentado na metodologia. Dessas, 38 amostras apresentaram resultado negativo para todos os seis tipos de fungos testados sendo 9 (23,7%) delas provenientes de pacientes neonatos e 29 (76,3%) provenientes de pacientes adultos oncológicos. A *C. glabrata* foi a espécie mais prevalente dentre os pacientes neonatos (50% dos eventos), já as infecções em pacientes adultos imunocomprometidos apresentaram maior diversidade de espécies identificadas, sendo a *C. parapsilosis* a mais prevalente, seguida por *C. neoformans* e *C. glabrata* (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição de espécies fúngicas diagnosticadas pelo PCR convencional multiplex em pacientes imunocomprometidos em diferentes unidades hospitalares em Pernambuco.

Organismo	Neonatos (n) (HAM)	Adultos(n) (HEMOPE + HE)	Total(n)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	1	1	2
<i>Candida glabrata</i>	8	5	13
<i>Candida tropicalis</i>	1	2	3
<i>Candida parapsilosis</i>	3	9	12
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	6	7
<i>C. albicans</i> + <i>C. neoformans</i>	1	0	1
<i>C. tropicalis</i> + <i>C. parapsilosis</i>	1	0	1
<i>C. glabrata</i> + <i>C. parapsilosis</i>	2	1	3
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. neoformans</i>	1	2	3
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C. neoformans</i>	1	0	1
Total	20	26	46

LYRA, Juliana (2014).

6.3. SISTEMA DE DETECÇÃO SYBR GREEN®

Considerando as condições da PCR convencional, a qPCR, utilizando o sistema *SYBR Green*, mostrou variações na especificidade dos iniciadores obtidos na literatura (Luo and Mitchell, 2002) a julgar pela média das temperaturas *melting* obtidas em diferentes experimentos com diferentes concentrações de iniciadores e de sequência alvo, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Desempenho das curvas *melting* obtidas em diferentes experimentos com os plasmídeos pCALB, pCTR, pCGL, pCN, pCPA e pAFUM e seus respectivos pares de iniciadores. * TM = Temperatura de *Melting*.

Alvo	Curva <i>melting</i> 1		Curva <i>melting</i> 2	
	Média TM*	Desvio padrão TM	Média TM	Desvio padrão TM
pCALB	81,06	0,61		
pCTR	79,24	1,34		
pCGL	78,67	0,33		
pCN	80,38	0,41		
pCPA	79,54	1,42	74,04	0,15
pAFUM	79,23	1,91	88,40	0,56

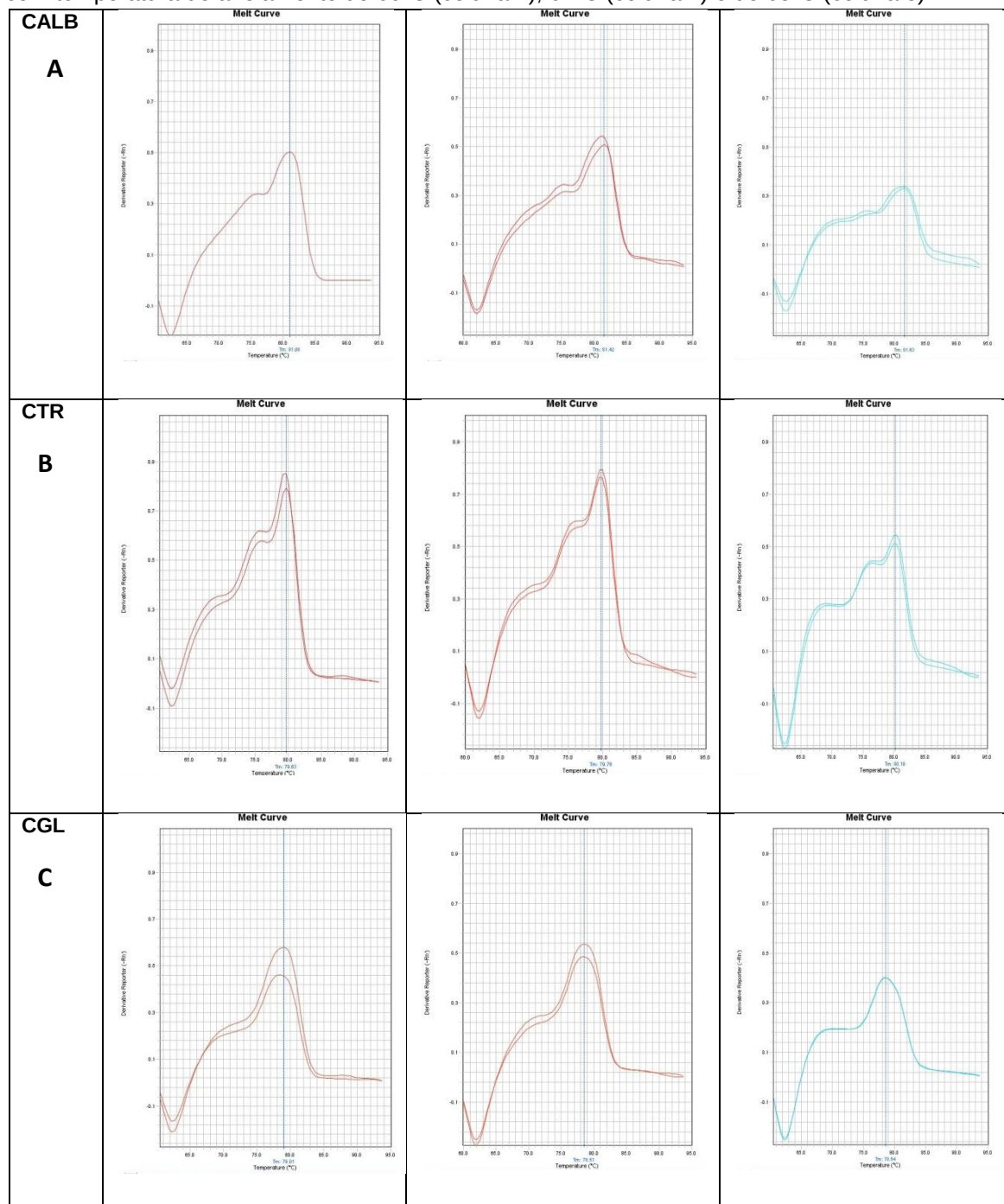
LYRA, Juliana (2014).

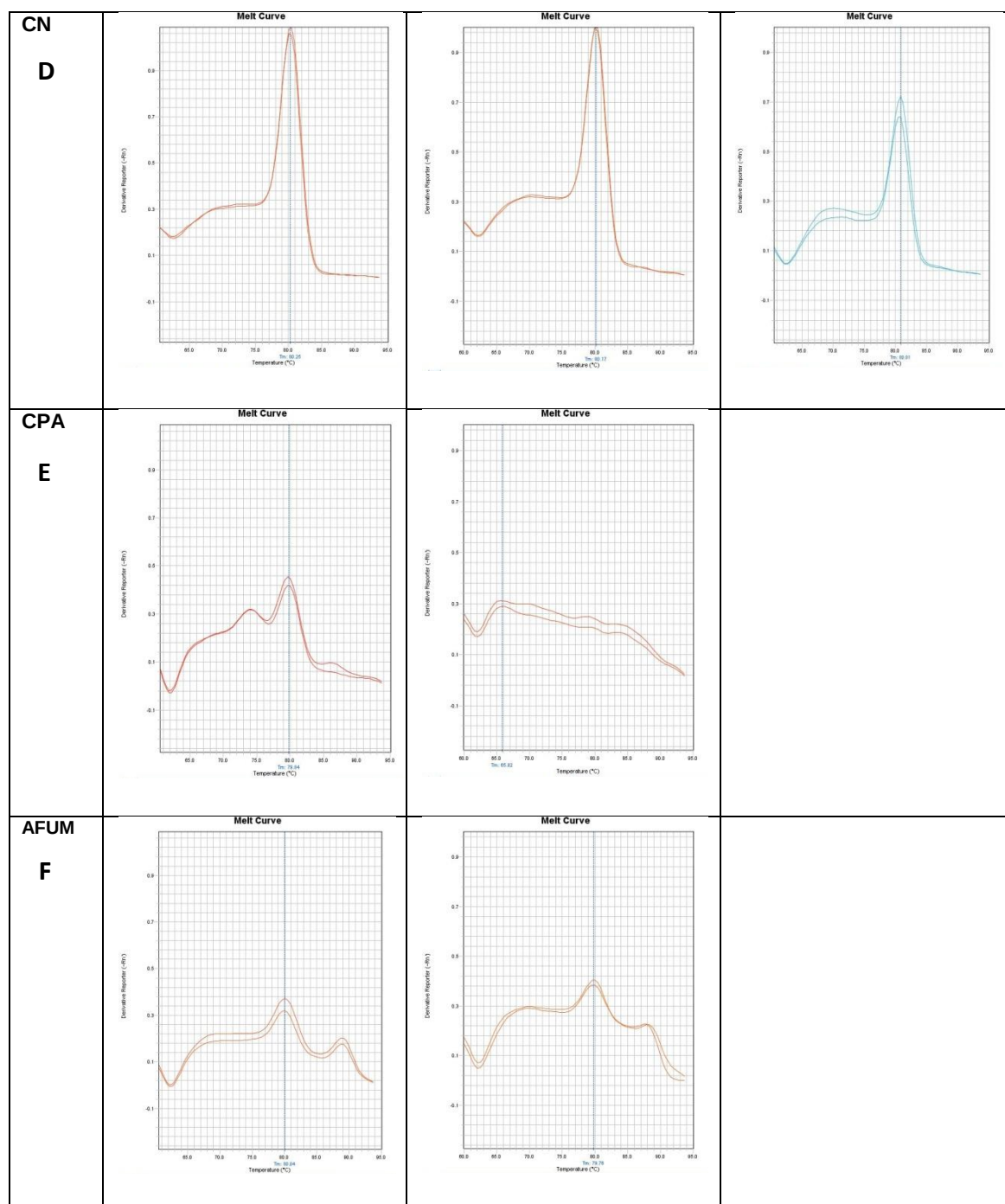
Reações realizadas com plasmídeos contendo rDNA dos diversos fungos na presença de iniciadores nas concentrações de 25 pmol, 12 pmol, 5 pmol, 3pmol e 1,5 pmol apresentaram curvas *melting* com formas semelhantes para cada sistema e amplitudes reduzidas nas concentrações de 3 e 1,5 pmol, sendo a concentração de 5 pmol de cada iniciador considerada em futuros experimentos.

Testes com diferentes temperaturas de amplificação foram realizados com o objetivo de aumentar a especificidade da reação. Reações realizadas com os plasmídeos controles a temperaturas de 60°C, 62°C e 65°C apresentaram curvas *melting* com formas semelhantes para amplificação do rDNA de *C.albicans* (Figura 4A), *C. tropicalis* (Figura 4B), *C. glabrata* (Figura 4C) e *C. neoformans* (Figura 4D), mas com menor amplitude em temperaturas maiores de 62°C. Não houve amplificação do fragmento de rDNA de *C. parapsilosis* (Figura 4E) em temperaturas maiores que 60°C, e o aumento da temperatura de amplificação não foi traduzido em melhora da especificidade da amplificação para o rDNA de *A.fumigatus* (Figura 4F). Não obstante, a forma das curvas difere do esperado, excetuando a curva *melting* do sistema para detecção do *C.neoformans*, que foi a única bem definida (Figura 4D). As reações para identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C.glabrata* apresentaram alargamento da base da curva *melting*, sugerindo a ocorrência de hibridização dos iniciadores em diferentes regiões da sequência alvo (Figura 4A, 4B e 4C). Enquanto, as reações de amplificação das sequências de rDNA de *C. parapsilosis* e *A. fumigatus* apresentaram dois picos, sugerindo a

formação de dímeros e, possível, hibridização em sequência inespecífica (Figura 4E, 4F).

Figura 4 - Curva *melting* dos fragmentos de rDNA dos diversos fungos estudados amplificados com temperatura de anelamento de 60°C (coluna 1), 62°C (coluna 2) e de 65°C (coluna 3).



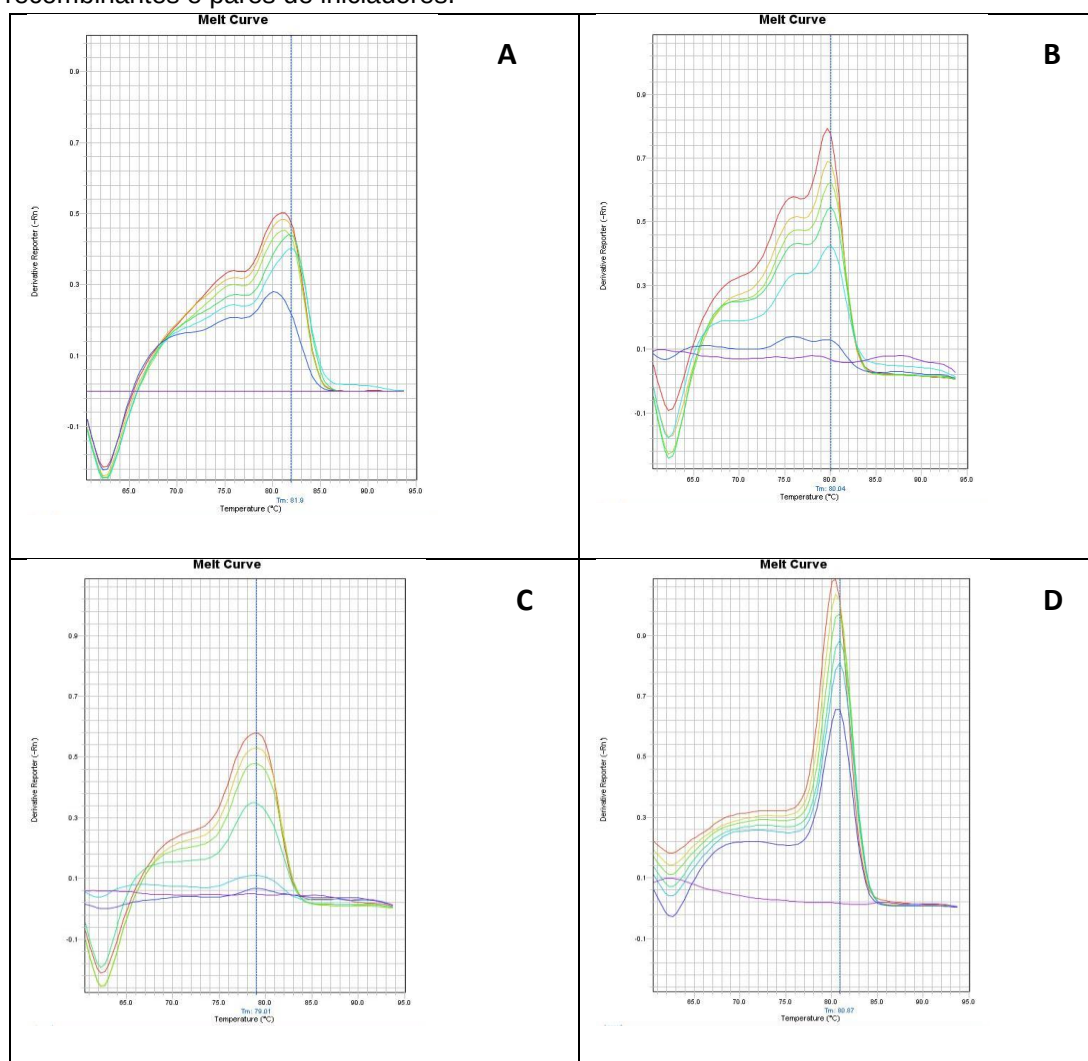


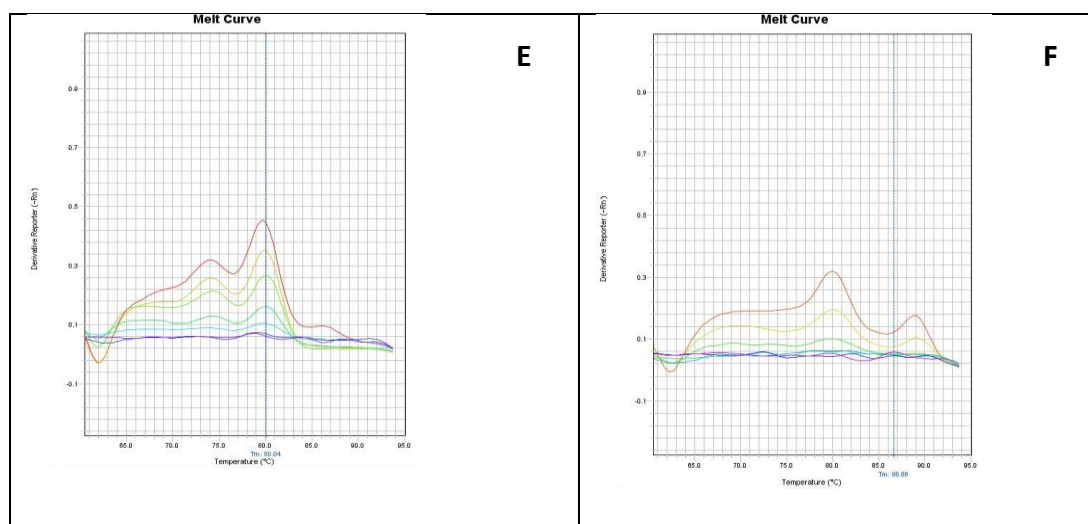
LYRA, Juliana (2014).

A amplitude da curva *melting* de cada sistema variou com diferentes concentrações de DNA plasmidial (Figura 5). Por outro lado, a forma das curvas *melting* resultantes das amplificações realizadas apenas na presença de plasmídeo recombinante e respectivos iniciadores, sugere que o desenho do iniciador utilizado para a detecção específica das espécies (sequência de bases e tamanho) permite a hibridização em outras regiões do rDNA da espécie em cada sistema testado. A dificuldade no desenho de iniciadores

específicos para cada espécie de fungo deve-se a homologia entre as sequências de *Candidas*, e, possivelmente, devido à existência de múltiplas cópias de sequências gênicas nessa região.

Figura 5 - Reações de amplificação das sequências de rDNA de (A) *C. albicans*, (B) *C. tropicalis*, (C) *C. glabrata*, (D) *C. neoformans*, (E) *C. parapsilosis* e (F) *A. fumigatus* nas concentrações de 10 ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng, 0,01ng e 0,001ng dos respectivos plasmídeos recombinantes e pares de iniciadores.

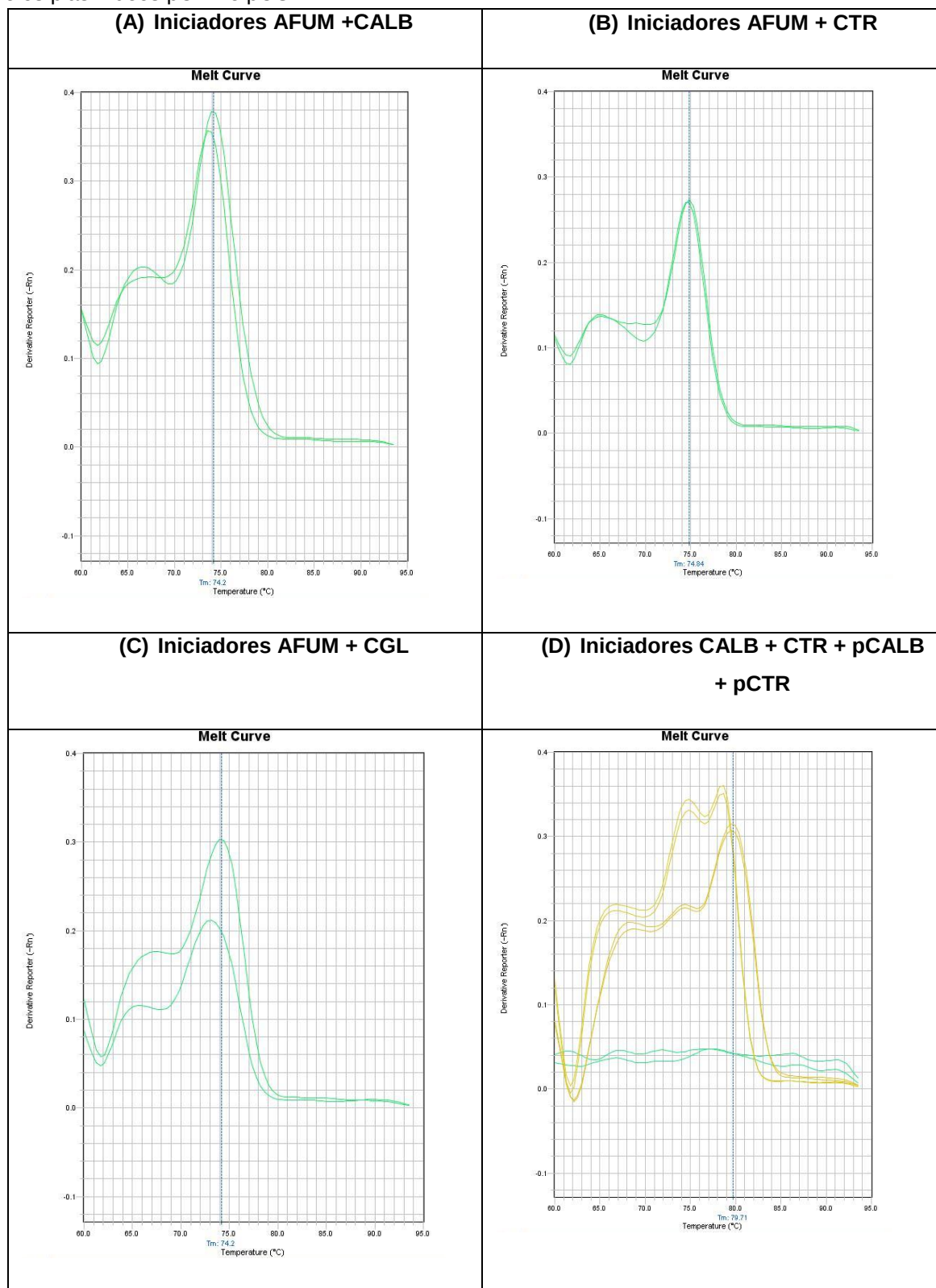


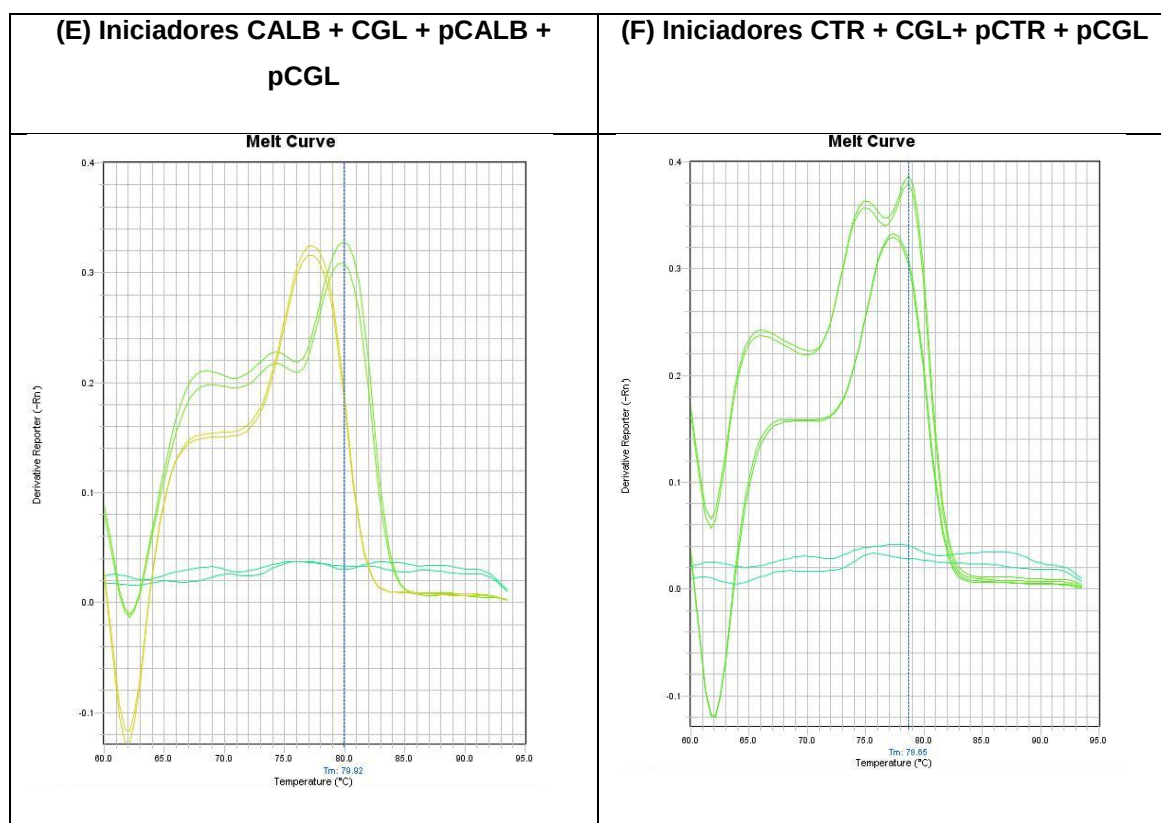


LYRA, Juliana (2014).

A formação de picos inespecíficos observada com os iniciadores do sistema de detecção de *A.fumigatus* e *C.parapsilosis* inviabilizou a utilização desses sistemas no diagnóstico de infecção fúngica. Ademais, em reações multiplex, os iniciadores AFUM1 e AFUM2 formaram dímeros com os iniciadores para detecção de espécies de *Candida* como demonstrado no tubo de reação contendo apenas reagentes da reação e diferentes pares de iniciadores (Figura 6A, 6B e 6C). Por outro lado, reação multiplex com iniciadores para detecção de *C.albicans* e *C.tropicalis* não apresentaram formação de dímeros, a julgar pela curva (*baseline*) obtida na reação com ambos pares de iniciadores e sem plasmídeo recombinante, e a curva em forma de sino correspondendo a reação na presença dos respectivos plasmídeos recombinantes (Figura 6D). Da mesma forma, nas reações multiplex com iniciadores para detecção conjunta de *C.albicans* e *C.glabrata* (Figura 6E) e para detecção conjunta de *C.tropicalis* e *C.glabrata* (Figura 6F) não foram observados a formação de dímeros.

Figura 6 - Curva de *melting* da PCR em tempo real usando o sistema SYBR Green contendo: (A) Os iniciadores AFUM 1+ AFUM2 e CALB1 +CALB2; (B) Os iniciadores AFUM 1+ AFUM2 e CTR1 + CTR2; (C) Os iniciadores AFUM 1+ AFUM2 e CGL1+ CGL2; (D) Os iniciadores CALB1 + CALB2, CTR1 + CTR2 e os plasmídeos pCALB e pCTR; (E) Os iniciadores CALB1 + CALB2, CGL1+ CGL2 e os plasmídeos pCALB e pCGL; (F) Os iniciadores CTR1 + CTR2, CGL1+ CGL2 e os plasmídeos pCTR e pCGL.



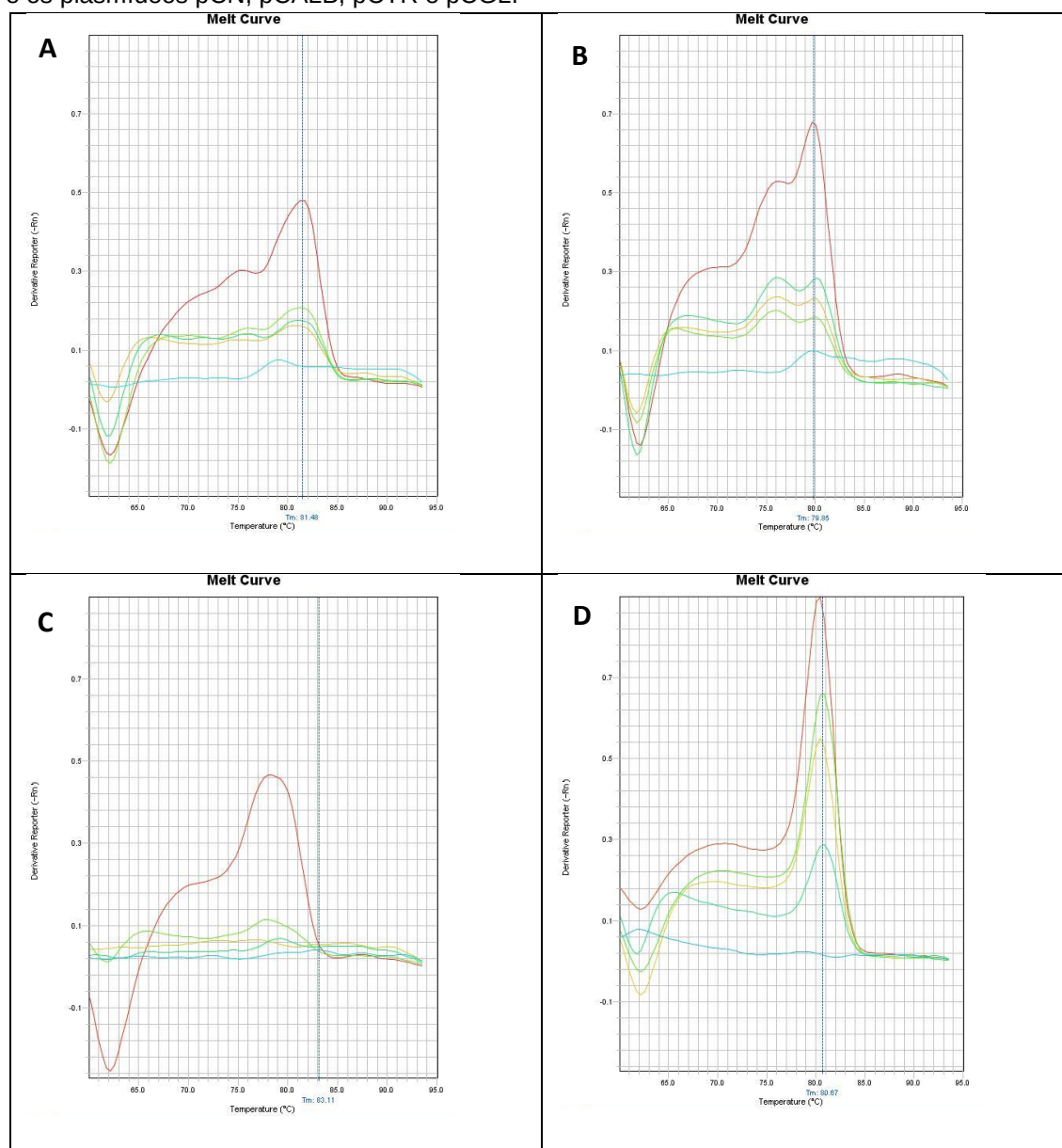


LYRA, Juliana (2014).

A possível reação inespecífica resultante da mistura de cada par de iniciador com sequências de rDNA de outras espécies na forma de plasmídeos recombinantes (pCALB, pCTR, pCGL e pCN) também foi investigada. Reações com iniciadores para detecção de *C.albicans* (Figura 7A) e *C.tropicalis* (Figura 7B) apresentaram curva *melting* de grande amplitude na presença dos respectivos plasmídeos recombinante (pCALB e pCTR); e curvas de pequena amplitude com rDNA subclonado de outras espécies fúngicas, contudo, a correspondente curva de amplificação dessas reações inespecíficas teve origem ao final da reação de amplificação (CT>30, curvas não mostradas), quando possivelmente já existe uma diminuição de oferta de alguns nucleotídeos, favorecendo o surgimento dessas curvas inespecíficas. Os iniciadores para detecção de *C.glabrata* não apresentaram amplificação inespecífica (Figura 7C). Por outro lado, o teste de especificidade com iniciadores de *C. neoformans* e cada um dos plasmídeos com rDNA subclonados dos demais fungos mostrou a presença de bandas inespecíficas para todas as reações analisadas (Figura 7D). Devido à possibilidade de

infecção mista em amostras clínicas, a reação para detecção de *C. neoformans* com esses iniciadores não foi mais considerada.

Figura 7 - Curva *melting* com (A) Anelamento entre os iniciadores CALB1 + CALB2 e os plasmídeos pCALB, pCTR, pCGL e pCN; (B) Anelamento entre os iniciadores CTR1 + CTR2 e os plasmídeos pCTR, pCALB, pCGL e pCN; (C) Anelamento entre os iniciadores CGL1 + CGL2 e os plasmídeos pCGL, pCALB, pCTR e pCN; (D) Anelamento entre os iniciadores CN4 + CN5 e os plasmídeos pCN, pCALB, pCTR e pCGL.

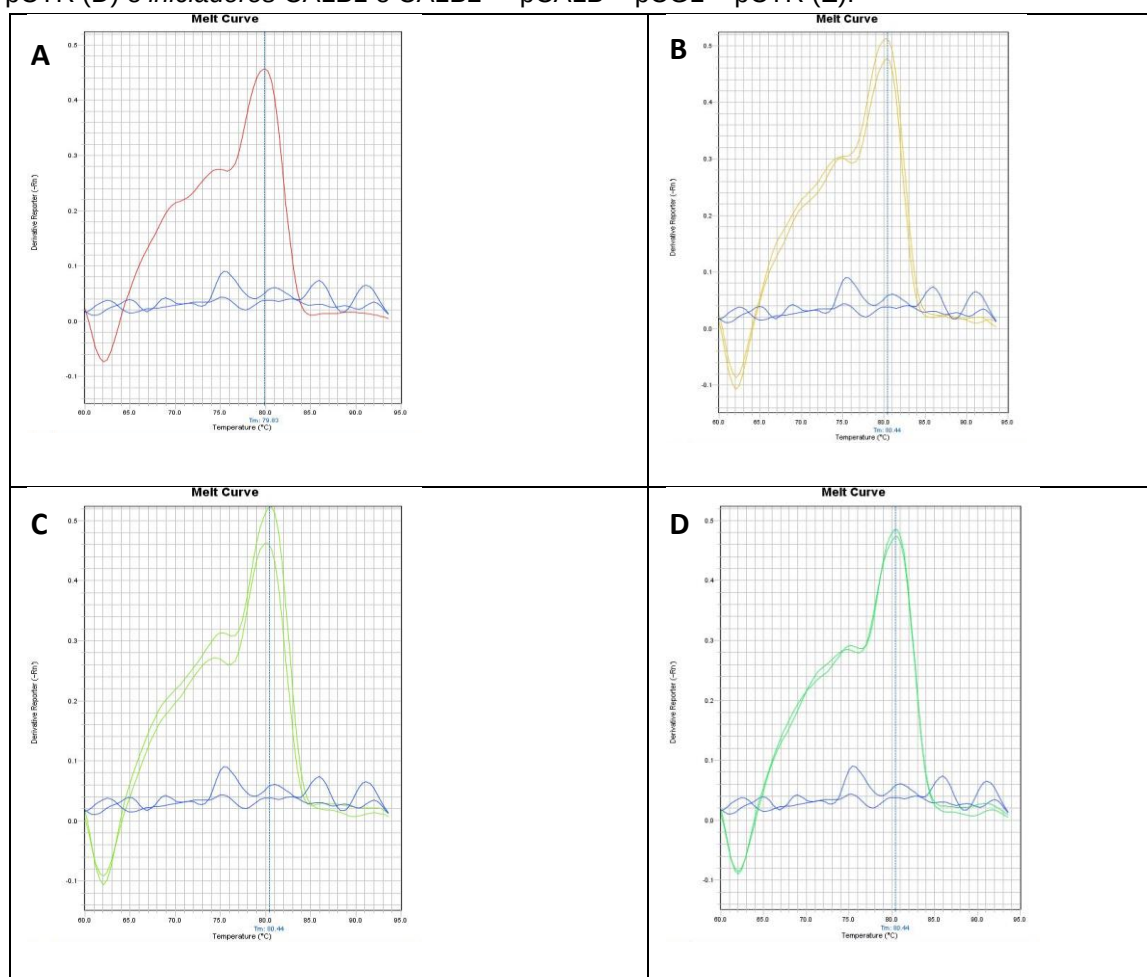


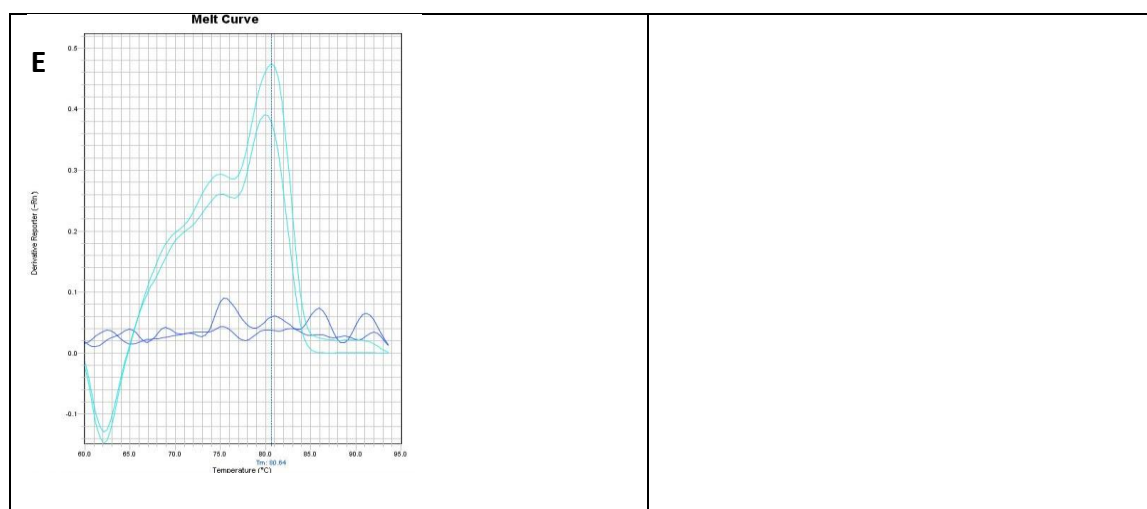
LYRA, Juliana (2014).

Os iniciadores usados para detecção de *C. albicans* foram submetidos a testes preliminares para avaliar se esses iniciadores anelavam nas sequências das demais espécies desse gênero, devido à similaridade das sequências genômicas de espécies do gênero *Candida*. Teste de reação cruzada entre

diferentes amostras de DNA plasmidial (pCALB, pCGL, pCTR) com os iniciadores CALB1 e CALB2 apresentaram curvas de *melting* semelhantes em todas as combinações, não sendo visualizado um segundo pico, confirmando a ausência de reação cruzada com os demais plasmídeos. Não afastando, contudo, a possibilidade do iniciador reconhecer outras áreas do genoma da mesma espécie de fungo para o qual foi concebido, devido a existência de repetições na região alvo para o teste molecular (Figura 8).

Figura 8 - Teste de reação cruzada entre diferentes amostras de DNA plasmidial com os iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB (A), iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pAFUM (B), iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pCGL (C), iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pCTR (D) e iniciadores CALB1 e CALB2 + pCALB + pCGL + pCTR (E).



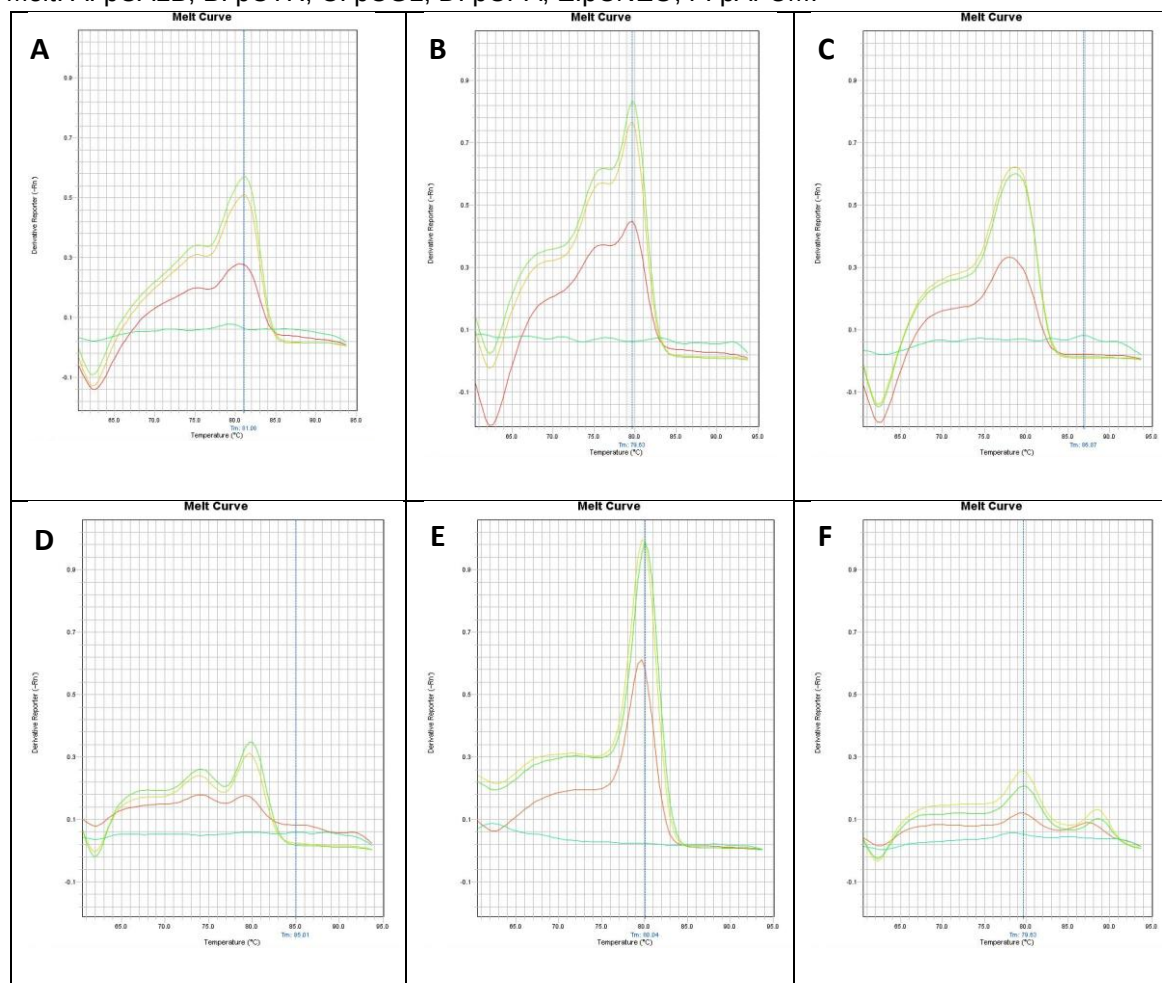


LYRA, Juliana (2014).

Na prática, a amostra biológica submetida à pesquisa de genoma de microrganismo é constituída de grande quantidade de DNA genômico humano acrescido ou não de menor quantidade relativa de DNA exógeno no caso de infecção. Nesse contexto, é necessário determinar no protocolo de reação a concentração de DNA da amostra que deve ser utilizada. A concentração ideal seria a maior possível para identificar pequenas quantidades de DNA de patógeno dissolvido em DNA humano, e a menor possível para evitar inibição da reação de PCR. Desta forma, testamos diferentes concentrações de DNA humano juntamente com o DNA plasmidial de cada fungo em concentrações fixas para avaliar a interferência de grandes quantidades de DNA na reação.

Em todas as amostras foi notada diminuição da eficácia da reação com o aumento da quantidade de DNA na amostra de 50 ng para 200 ng (Figura 9).

Figura 9 - Curva incluindo 10 ng de DNA plasmidial e diferentes concentrações de DNA humano: 200 ng (linha vermelha), 100 ng (linha amarela) e 50 ng (linha verde) e sua respectiva curva de Melt. A. pCALB, B. pCTR, C. pCGL, D. pCPA, E. pCNEO, F. pAFUM.



LYRA, Juliana (2014).

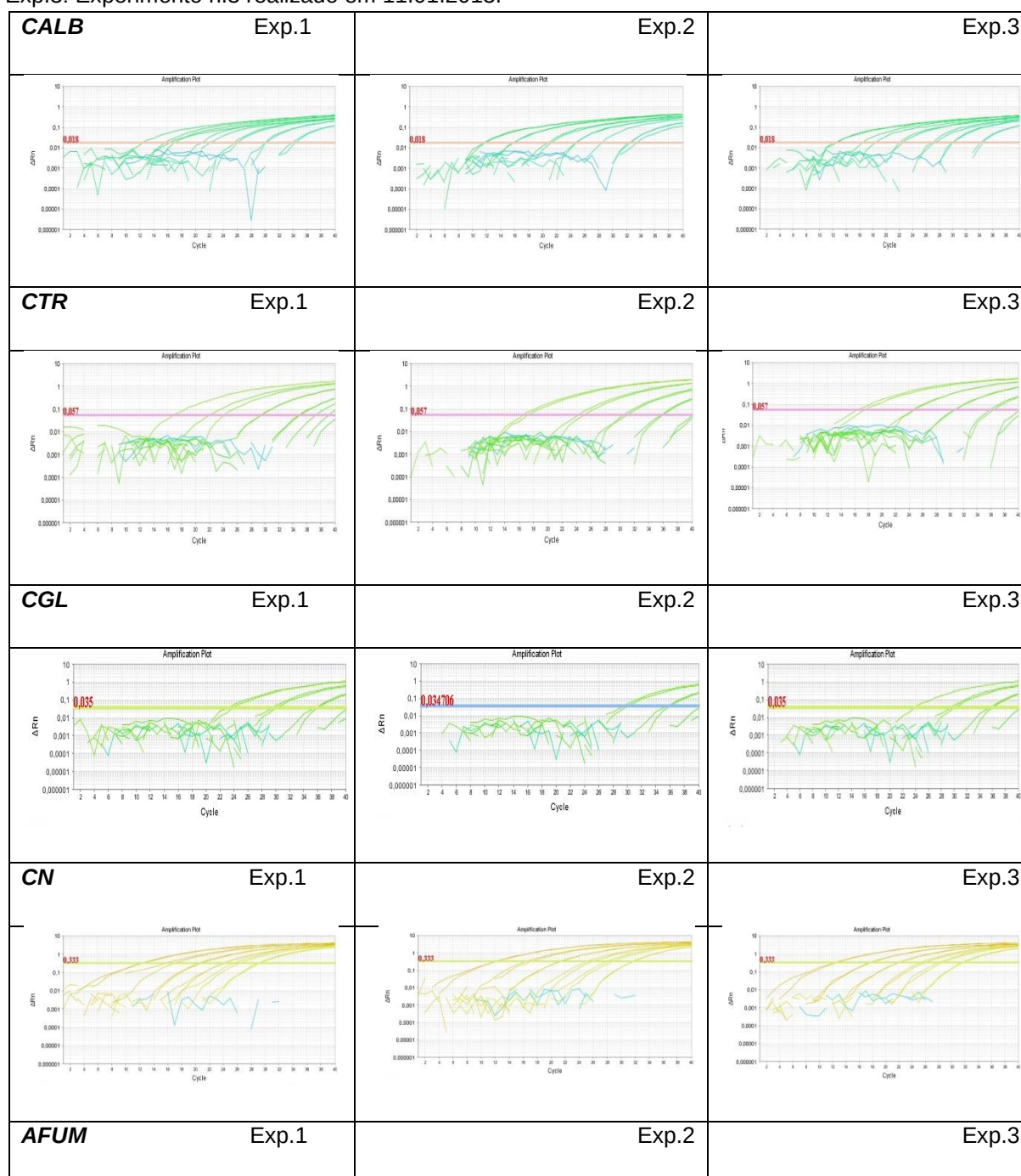
6.4. SISTEMAS DE DETECÇÃO TAQMAN®

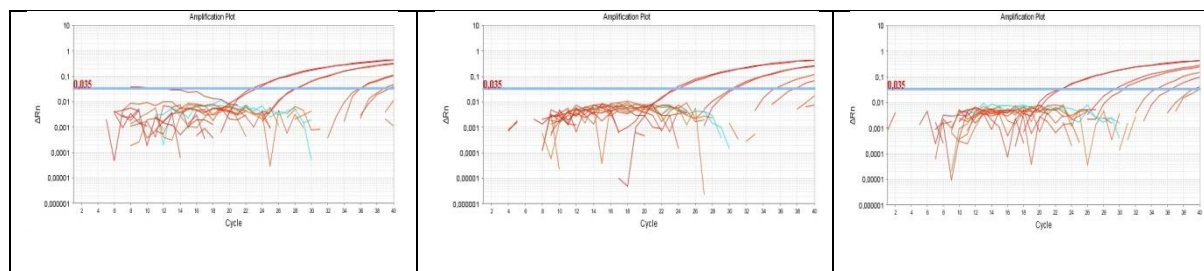
Com base nos resultados do teste utilizando o sistema *SYBR Green* para detecção de infecção fúngica, foi decidido: (1) utilizar o sistema *TaqMan* de detecção, (2) desenhar novos iniciadores para detecção de *A. fumigatus* e *C. neoformans*, além de (3) desenhar sondas para cada sistema usando como *quencher* a molécula MGB, permitindo a utilização de sondas pequenas de sequências não-homologas entre as espécies testadas.

Os testes para estabelecimento da curva padrão com os plasmídeos e sondas usados para a detecção de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*, apresentaram reprodutibilidade nos três testes realizados em dias

diferentes, o *threshold* para cada curva foi calculado com base na média individual de cada experimento, sendo o *threshold* da *C. albicans*= 0,0180, *C. tropicalis* =0,057, *C. glabrata* = 0.035, *C. neoformans* = 0,333 e *A. fumigatus* = 0,0350 (Figura 10). Em todos os experimentos foram utilizadas amostras diluídas no momento da reação.

Figura 10 - Curvas de amplificação utilizando o sistema *TaqMan* para detecção de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. neoformans* e *A. fumigatus* realizadas em diferentes momentos (triplicata). Exp.1: Experimento n.1 realizado em 08.01.2013. Exp.2: Experimento n.2 realizado em 09.01.2013. Exp.3: Experimento n.3 realizado em 11.01.2013.



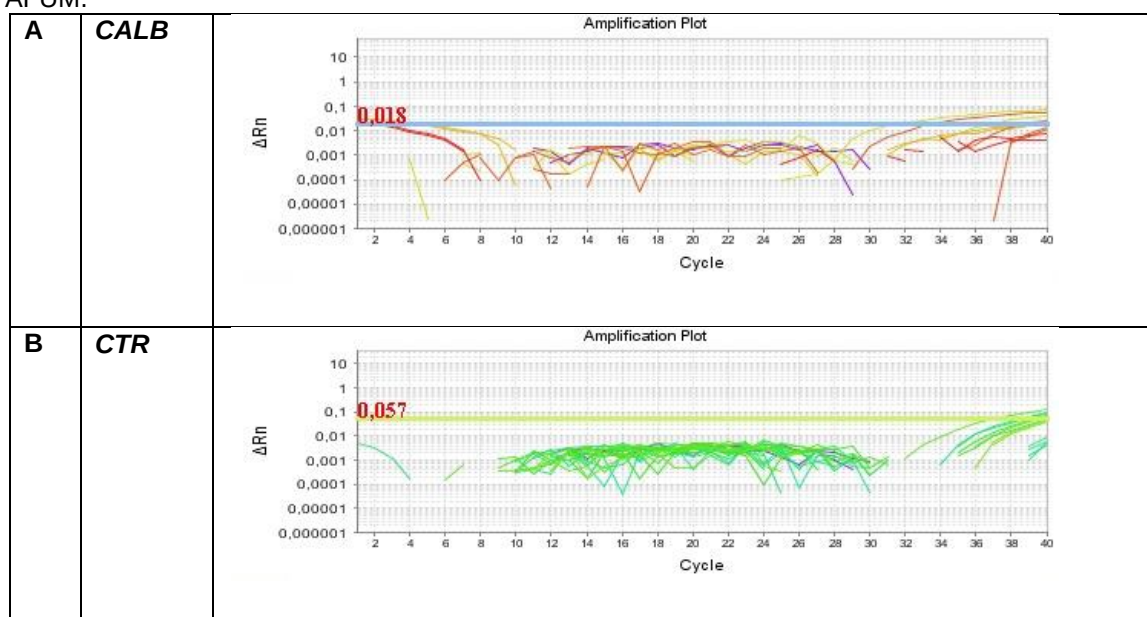


LYRA, Juliana (2014).

A reação com iniciadores e sondas específicos para detecção de *C. albicans* (Figura 11A) e de *C. tropicalis* (Figura 11B) na presença de alvos de DNA de diferentes espécies de fungo escolhidos dentre os plasmídeos pCALB, pCTR, pCGL, pCPA, pCN ou pAFUM apresentaram curva de amplificação com CT (Cycle Threshold) maior que 32 em ambas diluições testadas, enquanto a teste de reação cruzada com o sistema de detecção para *C. glabrata* (Figuras 11C) e *C. neoformans* (Figura 11D) apresentaram um CT de 31, definindo como ponto de corte de reação positiva o CT igual a 30, além desse valor a probabilidade da ocorrência de falsos positivos pode aumentar.

A mistura da reação para a detecção de *A. fumigatus* não amplificou sequencias de rDNA das demais espécies de fungos avaliadas (Figura 11E).

Figura 11 - Teste de reação cruzada e formação de dímeros entre os plasmídeos utilizados no estudo e os iniciadores e sondas para amplificação do DNA dos fungos: CALB, CTR, CGL, CN e AFUM.



C	CGL	Amplification Plot
D	CN	Amplification Plot
E	AFUM	Amplification Plot

LYRA, Juliana (2014).

7. DISCUSSÃO

A ocorrência de casos de candidemia em hospitais terciários aumentou substancialmente nas últimas décadas em diferentes partes do mundo. As melhores casuísticas sobre a relevância de candidemia em hospitais terciários foram publicadas nos Estados Unidos. Durante os anos de 1980 a 1990, o Centro de Controle de Doenças de Atlanta, coletou dados de infecções fúngicas nosocomiais em 115 hospitais, reunindo um total de 30.477 infecções fúngicas documentadas. Neste universo, foi possível observar que nos anos 80 houve um aumento da ordem de 400% na incidência de candidemia nos principais hospitais americanos (Beck-Sagué *et al.*, 1993).

Considerando apenas os critérios microbiológicos, nós encontramos uma frequência de infecção fúngica nos pacientes adultos em tratamento quimioterápico com neutropenia (39,2%) semelhante à observada em neonatos (37,9%), e inferiores as taxas observadas quando considerando a análise molecular tanto nos pacientes adultos (67,6%) quanto nos neonatos (50%), ilustrando a limitação dos testes microbiológicos como metodologia exclusiva para o diagnóstico de infecção fúngica. A expressão da doença fúngica é muitas vezes a fungemia, cuja dificuldade de diagnóstico pelo exame direto em amostra de sangue, e as limitações técnicas para o isolamento de espécies de fungo, principalmente filamentosos, devido ao meio de condicionamento, transporte, aporte de oxigênio, e período longo de cultivo sujeito à infecção secundária, em conjunto, torna difícil o diagnóstico microbiológico de infecção fúngica nesses casos (Benjamin *et al.*, 2000; McLintock *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2006).

A frequência de infecção fúngica foi superior a frequência (15,4%) relatada por Jordanides e colaboradores (2005) dentre 78 pacientes adultos com câncer no Reino Unido usando qPCR, e semelhante a frequência (46,3%) relatada por Dendis e colaboradores (2003) em 24 pacientes adultos neutropênicos internados em Hospital Universitário na Republica Tcheca diagnosticados com infecção fúngica utilizando técnicas moleculares (PCR e RFLP), e também a frequência (61,2%) observada por Mandhaniya e colaboradores (2011) em crianças com câncer em hospital da India usando a

qPCR, refletindo possivelmente a qualidade da atenção a saúde, incluindo estratégia de diagnóstico e tratamento dispensadas aos pacientes dos diferentes serviços de saúde dos diferentes países.

No Brasil, estudo realizado por Colombo e colaboradores em seis hospitais terciários do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidemia, mostrou que as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%), mostrando a relevância de infecções invasivas por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* no nosso meio (Colombo *et al.*, 2003b). Em 2011, os mesmos autores estudando pacientes adultos e pediátricos atendidos em hospitais terciários localizados em cidades distribuídas no sul, sudeste e região central do Brasil mostraram maior frequência de *C. albicans* tanto em adultos (41%) quanto em crianças (40%); a frequência dos demais tipos de fungo encontrados variou de acordo com a idade do paciente. Em adultos a segunda espécie mais encontrada foi a *C. tropicalis* (24%) seguida da *C. parapsilosis* (21%), nos pacientes pediátricos a segunda espécie mais isolada foi a *C. parapsilosis* (21%) seguida da *C. tropicalis* (15%).

A distribuição de espécies fúngicas identificadas no presente estudo diferiu da apresentada por Colombo e colaboradores. Além de não ter sido possível identificar a espécie de fungo pela PCR convencional em 38 das 84 (45,2%) amostras positivas para ITS, as espécies mais identificadas foram *C. parapsilosis* (23,8%), *C. glabrata* (19%), *C. neoformans* (14,2%), *C. tropicalis* e *C. albicans* (ambas em 4,7% dos casos). A *C. glabrata* (50%) representou a espécie responsável pela maioria das infecções nos neonatos atendidos na unidade de terapia intensiva do HAM, refletindo possível fator ambiental relacionado à circulação dessa espécie, enquanto no grupo dos pacientes adultos com neutropenia as espécies de fungo mais frequentes foram as de *C. parapsilosis*, *C. neoformans* e *C. glabrata*, sugerindo a possível influência da flora nosocomial dos hospitais HEMOPE e HE, mas também devido ao tratamento antifúngico profilático recebido pelos pacientes adultos em tratamento de câncer nessas unidades de saúde.

Apesar de vários autores ter relatado que a *C. albicans* é o agente etiológico mais frequente da infecção oportunista nosocomial (Colombo *et al.*, 2003; Shetty, 2005; Bailey, 2009 and Oberoy, 2012), a distribuição da

frequencia de fungos parece estar relacionada à população estudada e a área geográfica. A infecção oportunista em pacientes neutropênicos de alto risco na Alemanha também apresentou diferenças quanto ao agente etiológico sendo causada na maioria por *Aspergillus* (22,8%) seguida por *C.albicans* (13%) e *C.glabrata* (5,4%) (Hebart *et al.*, 2000).

Os nove casos de infecção por múltiplas espécies de fungo encontrada em nosso estudo não é usual, mas Klingspor e Jalal (2006), utilizando PCR em tempo real para avaliação de amostras clínicas de pacientes com suspeita de infecção fúngica em um hospital universitário da Suécia, encontraram em dois pacientes infecções mistas (*C. albicans* e *Aspergillus*).

Nosso estudo apresentou um teste molecular baseado em PCR convencional para detecção de infecção fúngica com sensibilidade de 67,3% (53,2-79,0), especificidade de 47,2% (36,6-58,0), valor preditivo positivo de 44,0% (33,4-55,3) e valor preditivo negativo de 70,0% (56,6-80,8). Esse desempenho é inferior ao apresentado por Hebart e colaboradores (2000) cujo protocolo da PCR convencional, visando o diagnóstico de infecção fúngica, mostrou sensibilidade de 100%, especificidade de 73%, valor preditivo positivo de 36,8 e valor preditivo negativo de 100%. A diferença entre os dois testes está na utilização de uma etapa posterior de hibridização do produto de PCR amplificado com iniciadores para a região ITS do genoma de fungos, com sondas marcadas para a identificação da espécie, aumentando a especificidade e sensibilidade do método.

Visando melhorar o desempenho do teste utilizado pelo nosso grupo, decidimos migrar para o sistema de detecção *SYBR Green* devido a sua melhor sensibilidade em relação a PCR convencional e ao seu menor custo em relação ao sistema *TaqMan*®, mas alguns resultados sugeriram a ocorrência de reações inespecíficas entre os iniciadores e entre iniciadores e outras sequências de DNA que não eram o alvo proposto, como mostrado em relação aos iniciadores AFUM para detecção de genoma de *Aspergillus*. A curva de *melting* mais alargada também sugeriu algum grau de inespecificidade dos iniciadores para espécies de *Candidas* que podem estar anelando em outra região do genoma da mesma espécie de *Candida* para o qual os iniciadores foram desenhados, isso pode ser explicado, em parte, pela presença de

sequências de repetição características da região alvo escolhida (Khot *et al.*, 2009).

Devido a dificuldade em encontrar regiões apropriadas nas sequências de rDNA das diversas espécies estudadas para desenhar novos iniciadores com menor homologia em relação a outras sequências, foi proposta a utilização do sistema de detecção *TaqMan*®, que devido ao uso de sondas de DNA muito pequenas (~15pb) ancoradas no interior da sequência amplificada pelos iniciadores diminuem as chances da sonda se anelarem em outro local que não seja a sequência alvo, aumentando a especificidade da reação. Jordanides e colaboradores (2005) descreveram protocolo para diagnóstico de infecção fúngica utilizando a unidade ribossomal 18S como alvo e a metodologia da qPCR, tendo apresentado sensibilidade de 75%, especificidade de 70%, VPP = 15% e VPN= 98%. Mas, recentemente, foi publicado outro protocolo de qPCR usando o sistema *TaqMan*® com sonda desenhada para região ITS do genoma de *Aspergillus*, testado em 83 pacientes com neutropenia febril com considerável risco de infecção por Aspergilose invasiva e os resultados mostraram uma positividade para 20 indivíduos (14,4%), representando uma sensibilidade de 91,6%, especificidade de 94,4%, valor preditivo positivo de 73,3% e valor preditivo negativo de 98,5% quando comparados com cultura e resultados clínicos (Cuenca-Estrella *et al.*, 2009).

A metodologia do qPCR usando o sistema *TaqMan*® de detecção para diagnóstico molecular da infecção fúngica vem apresentando maior sensibilidade do que testes micológicos de diagnóstico e maior especificidade em relação ao sistema *SYBR Green* de detecção. De uma forma geral, o teste molecular para diagnóstico de infecção fúngica desperta menor interesse comercial, devido (1) as infecções fúngicas serem na sua maioria oportunistas e superficiais, i.e., não ultrapassam a barreira natural da pele; (2) a frequência de infecção fúngica ser menor que infecção bacteriana e viral em ambiente hospitalar, ou ambulatorial, representando uma menor demanda para testagem; (3) a grande maioria dos casos de infecção fúngica responder bem a protocolos de tratamento conhecidos; (4) a população alvo para diagnóstico molecular de infecção fúngica ser basicamente pacientes imunocomprometidos, incluindo infectados por HIV, portadores de câncer em tratamento quimioterápico, e pacientes transplantados ou portador de doença

autoimune em tratamento imunossupressor; e (5) o custo do teste baseado no protocolo *TaqMan*® no diagnóstico da infecção fúngica, incluindo investimento de capital, formação de recursos humanos, despesas diretas (reagentes) e indireta (manutenção, custo predial, dentre outros) serem no conjunto altos. Diante desse cenário, a formulação de teste em placa para diferentes agentes etiológicos, incluindo os principais fungos, vírus e bactérias, poderia incrementar o diagnóstico rápido de infecção nessa população alvo, e também ampliar a indicação para realização da testagem em outras populações. Nesse aspecto, recai sobre a academia a responsabilidade no desenvolvimento biotecnológico de insumos para saúde e da busca de parceiros para traduzir a pesquisa de produto em benefício social.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos de PCR convencional do tipo multiplex confirmaram as condições de reação previamente publicadas para diagnóstico de seis espécies de fungos (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*) de importância médica para a saúde humana.

O teste molecular baseado em PCR convencional multiplex para detecção de infecção fúngica apresentou uma sensibilidade de 67,3% (53,2-79,0), especificidade de 47,2% (36,6-58,0), valor preditivo positivo de 44,0% (33,4-55,3) e valor preditivo negativo de 70,0% (56,6-80,8), com uma concordância considerada leve em relação ao diagnóstico da doença, baseado na clínica, comprovação microbiológica e teste terapêutico.

A distribuição das frequências das espécies fúngicas identificadas na população estudada diferiu em relação à população de estudo, sendo a *C. parapsilosis* mais frequente em pacientes adultos em tratamento quimioterápico atendidos no Hospital HEMOPE, e a *C. glabrata* em pacientes neonatos atendidos no Hospital Agamenon Magalhães. A baixa frequência de infecção por *C. albicans* pode ter sido influenciada pelo uso profilático de fungicida.

As curvas *melting* da PCR em tempo real para detecção de genoma de fungo utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* apresentaram temperatura *melting* distintas para a reação de amplificação de cada espécie de fungo testada.

A análise de diferentes concentrações de DNA humano acrescidas com o DNA plasmidial de cada fungo em concentrações fixas mostrou diminuição da eficácia da reação com o aumento da quantidade de DNA na amostra de 50ng para 200ng.

A formação de picos inespecíficos observada no sistema de detecção *SYBR Green* com os iniciadores de *A.fumigatus* e *C.parapsilosis*, cujas sequências foram retiradas da literatura, inviabilizou a utilização desse sistema no diagnóstico da infecção por estes fungos.

Os testes para estabelecimento da curva padrão utilizando o sistema *TaqMan* para a detecção de sequências do genoma de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *A. fumigatus* (iniciadores desenhados no âmbito desse projeto) subclonadas em plasmídeo apresentaram reprodutibilidade em três experimentos

em dias diferentes, podendo ser usados como controlos positivos para diagnóstico de infecção fúngica em amostras clínicas.

O valor do CT (*cycle threshold*) igual ou inferior a 30 representa o ponto de corte do teste diagnóstico, utilizando o sistema *TaqMan*, como definido no estudo, i.e., define a positividade da reação; por outro lado CT superior a 30 aumenta a probabilidade de detecção de falsos positivos.

REFERÊNCIAS

- ALI R, OZKALEMKAS F, OZCELIK T, OZKOCAMAN V, OZKAN A, BAYRAM S, ET AL. Invasive pulmonary aspergillosis: role of early diagnosis and surgical treatment in patients with acute leukemia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 5:17. 2006.
- ALMEIDA, SR. Micologia. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**. 2008.
- ARENDRUP MC. Candida e Candidemia. **Susceptibility and Epidemiology**. Dan Med J. 60 (11): B468. 2013
- AVNI T, LEONARD LEIBOVCI L, PAUL M. PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. **Jornal of Clinical Microbiology**. 665-670. 2011.
- BAILEY L, REILLY A, RHEINGOLD S. Infections in Pediatric patients With Hematologic Malignancies. **Seminars in Hematology**. 46: 313-324. 2009.
- BECK-SAGUÉ C, JARVIS WR. National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **Journal of Infectious Diseases**. 167: 1247-1251, 1993.
- BENJAMIN DK JR, ROSS K, MCKINNEY RE JR, BENJAMIN DK, AUTEN R, FISHER RG. **When to Suspect Fungal Infection in Neonates: A Clinical Comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* Fungemia With Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia**. **PEDIATRICS**. 106(4): 712-718. 2000.
- BILLE J, MARCHETTI O, CALANDRA T. Changing face of health-care associated fungal infections. **Curr. Opin Infect. Dis**.18:314-319. 2005.
- BOKTOUR M, KONTOYIANNIS D, HANNA H, HACHEM R, GIRGAWY E, BODEY G. Multiple-Species Candidemia in Patients with Câncer. **American Cancer Society**.101:1860–5. 2004
- BRANSCUM AJ, GARDNER IA, JOHNSON WO. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. **Prev Vet Med**. 68(2-4):145-63.2005.
- BRASIL. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Segurança do paciente em serviços de saúde. Limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília.2010. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/redeamb/manual-limpeza-edesinfeccaodesuperfcies>>. Acesso em: 05 agost. 2013.

BROWN S M, CAMPBELL LT, LODGE JK. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current Opinion in Microbiology**. 10:320–325. 2007.

BUCHANAN K L, MURPHY J A W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? **Emerging Infections Diseases**. 4:1. 1998.

BURD EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**. 23(3):550-76. 2010.

CALDERONE RA, FONZI WA. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**. 9(7):327-35. 2001.

Centers for Disease Control and Prevention, 2012. Disponível em <<http://www.cdc.gov/fungal/candidiasis/.a>> acesso em 12 de dezembro de 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012. Disponível em <<http://www.cdc.gov/fungal/aspergillosis/definition.html.b>> acesso em 12 de dezembro de 2013.

SHARMA OP, CHWOGULE R. Many faces of pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J*. 12(3):705-15. 1998

CHAMBERLIN JS, CHAMBERLAIN JR. Optimization of multiplex PCRs, in: Mullis, k B, Ferré, F, Gibbs RA. The Polymerase Chain Reaction. **Cambridge: Birkhäuser Boston**. 38-45. 1994.

CHANG HC, LEAW SN, HUANG AH, WU TL, CHANG TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol*. 39(10):3466-71. 2001.

COLOMBO AL, NAKAGAWA Z, VALDETARO F, BRANCHINI ML, KUSSANO EJ, NUCCI M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp.collected from Brazilian terciary care hospitals. **Med Mycol**. 41: 235-239, 2003a

COLOMBO AL, GUIMARÃES T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**. 36(5):599-607. 2003b.

COLOMBO AL, PERFECT J, DINUBILE M, BARTIZAL K, MOTYL M, HICKS P, LUPINACCI R, SABLE C, KARTSONIS N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 22:470-474. 2006.

COLOMBO AL, NUCCI M, PARK BJ, NOUÉR AS, SAKAGGS BA, MATTA DA, WARNOCK D, MORGAN J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **J Clin Microbiol**. 49(3): 1193. 2011.

CROWTHER JR, UNGER H, VILJOEN GJ. Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. **Rev Sci Tech.** 25(3):913-35. 2006.

CUENCA-ESTRELLA M, MEIJE Y, DIAZ-PEDROCHE C, GOMEZ-LOPEZ A, BUITRAGO MJ, BERNAL-MARTINEZ L, GRANDE C, JUAN RS, LIZASOAIN M, RODRIGUEZ-TUDELA JL, Aguado JM Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. **J Clin Microbiol.** 47(2):379-84. 2009.

DELABESSE E, BASILE M, JIJAKLI A, SOUVILLE D, GAY F, PHILIPPE B. Detection of *Aspergillus* Galactomannan Antigenemia To Determine Biological and Clinical Implications of Beta-Lactam Treatments. **Journal of Clinical Pathology.** 43: 5214–5220. 2005.

DEALLOY J AND CALANDRA T. Invasive Candidiasis as a Cause of Sepsis in the Critically Ill Patient. **Virulence.** 5:1, 1-9. 2014.

DENDIS M, HORVATH R, RUZICKA F, GRIJALVA M, BARTOS M, BENEDIK J. PCR-RFLP detection and Species Identification of Pathogens in Patients with Febrile Neutropenia. **Clin Microbiol Infect.** 9: 1191-1202. 2003.

ERIKSSON R, JOBS M, EKSTRND C, ULLBERT M, HERRMANN B, LANDEGREN U, NILSON M, BLOMBERG J. Multiplex and Quantifiable Detection of Nucleic Acid from Pathogenic Fungi Using Padlock Probes, Generic Real Time PCR and Specific Suspension Array Readout. **Jornal of Microbiological Methods.** 78 (2009): 195-202. 2009.

FERREIRA A, ÁVILA S. **Diagnóstico Laboratorial das Principais doenças Infecciosas e Auto-Imunes.** 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

FILHO NA. **Epidemiologia e Saúde – Fundamentos, métodos e aplicações.** 2012.

GARDES M, BRUNS TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Mol Ecol.** 2(2):113-8. 1993.

GACHON C, MINGAM A, CHARRIER B. Real – time PCR: what relevance to plant studies? **J Exp Bot.** 55: 1445-1454. 2004.

GIL L, STYCZYNSKI J, KOMARNICKI M. Infectious Complications in 314 patients after high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation: risk factors analysis and outcome. **Infections.** 2007.

GOLDANI LZ, MÁRIO PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **J Infect.** 46(3):155-60.

GODOY P, TIRABOSCHI IN, SEVERO LC, BUSTAMANTE B, CALVO B, DA MATTA DA, COLOMBO AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 98:401-405. 2003.

GRIF K, FILLE M, WÜRZNER R, WEISS G, LORENZ I, GRUBER G, ESCHERTZHUBER S, NACHBAUR D, LASS-FLÖRL C, ORTH D. Rapid detection of bloodstream pathogens by real-time PCR in patients with sepsis. **Wien Klin Wochenschr**. 124(7-8):266-70. 2012.

GRIFFITHS AJF, MILLER JH, SUZUKI DT, LEWONTIN RC, GELBART WM. **An introduction to genetic analysis**. 10th edition Freeman. 2010.

GUERY BP, ARENDRUP MC, AUZINGER G, AZOULAY E, BORGES SÁ M, JOHNSON EM, MÜLLER E, PUTENSEN C, ROTSTEIN C, SGANGA G, VENDITTI M, ZARAGOZA CRESPO R, KULLBERG BJ. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. **Intensive Care Med**. 35(1):55-62. 2009.

GURTNER C, SELITSCH B, ROTTER M, HIRSCHL A, WILLINGER B. Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 45: 906–914. 2007.

HAMARI Z, TÓTH B, BEER Z, GÁCSEER A, KUCSERA J, PFEIFFER I, JUHÁSZ A, KEVEI F. Interpretation of intraspecific variability in mtDNAs of *Aspergillus niger* strains and rearrangement of their mtDNAs following mitochondrial transmissions. **FEMS Microbiol Lett**. 221(1):63-71. 2003.

HEBART H, LÖFFLER J, REITZE H, ENGEL A, SCHUMACHER U, KLINGEBIEL T, BADER P, BÖHME A, MARTIN H, BUNJES D, KERN WV, KANZ L, EINSELE H. Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia. **Br J Haematol**. 111(2):635-40. 2000.

HOYER LL, GREEN CB, OH SH, ZHAO X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. **Med Mycol**. 46(1):1-15. 2008.

JALAVA K, LAAKSONEN S, ISSAKAINEN J, VAURAS J, NIKOSKELAINEN J, VILJANEN M. Semiquantitative Detection by Real Time PCR of *Aspergillus fumigatus* in Bronchoalveolar Lavage Fluids and Tissue Biopsy Specimens from Patients with Invasive Aspergillosis. **Journal of Clinical Microbiology**. 14: 4304–4311. 2003.

JORDANIDES NE, ALLAN EK, MCLINTOCK LA, COPLAND M, DEBANEY M, STUART K, PARKER AN, JOHNSON PRE, HOLYAKE TL AND JONES BL. **Bone Marrow Transplantation**. 35: 389-395. 2005.

JUHÁSZ A, ENGI H, PFEIFFER I, KUCSERA J, VÁGVÖLGYI C, HAMARI Z. Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 91(3):209-16. 2007.

KEUTGEN X, HACHEM R, JIANG Y, WILLIAMS T, TARRAND J, RAAD I. A comparison of galactomannan-ELISA and a newly developed galactomannan-LATEX test in the serologic diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 26:655–658. 2007.

KHOT PD, KO DL, FREDRICKS DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays. **Appl Environ Microbiol**. 75:1559-65. 2009.

KLINGSPOR L. AND JALAL S. Molecular Detection and Identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. From Clinical Samples using Real-time PCR. **Clin Microbiol Infect**. 12: 745-753. 2006.

KOUSHA M, TADI R, SOUBANI AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **Eur Respir Rev**. 20:121, 156-174. 2011.

KUBISTA M, ANDRADE JM, BENGTSSON M, FOROOTAN A, JONA´K J, LIND K, SINDELKA R, SJOBACK R, SJOGREEN B, STROMBOM L, STAHLBERG A, ZORIC N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**. 27: 95–125. 2006

KUFE W, POLLOCK E, WEICHSELBAUM R, BAST C, GANSLER S, HOLLAND F. Infections in the Cancer Patient Hamilton (Canada). **BC Decker Inc**. 39:160. 2003.

Kuleta J, Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta biochimica polonica**. 56: 211–224. 2009.

KUMAMOTO CA. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 102(15):5576-81. 2005.

LAMOTH F, JATON K, PRODHOM G, SENN L, BILLE J, CALANDRA T, MARCHETTI O. Multiplex Blood PCR in Combination with Blood Cultures for Improvement of Microbiological Documentation of Infection in Febrile Neutropenia. **Journal of Clinical Microbiology**. 3510 – 3516. 2010.

LEHMANN LE, PLUNFELD K-P, EMRICH T, HABERHAUSEN G, WISSING H, HOEFT A, STUBER F. **Med Microbiol Immunol**. 197: 313-324. 2008.

LOUIE RF, TANG Z, ALBERTSON TE, COHEN S, TRAN NK, KOST GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. **Crit Care Med**. 36(5):1487-92. 2008

LUO G AND MITCHELL TG. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by using multiplex PCR. **J Clinical Mycobiology**. 40: 2860-65. 2002.

MANDHANIYA S, IQBAL S, SHARAWAR SK, XESS I, BAKSHI S. Diagnosis of Invasive Fungal Infections using Real-Time PCR assay in Pediatric acute Leukemia induction. **Mycoses**. 55: 372-379. 2012.

MARTINEZ LR, GARCIA-RIVERA J, CASADEVALL A. Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotype D) strains are more susceptible to heat than C. neoformans var. grubii (serotype A) strains. **J Clin Microbiol**. 39(9):3365-7. 2001

MAURICETT MICHALLET, JAMES I. ITO. Approaches to the management of Invasive fungal Infections Hematologic Malignancy and Hematopoietic cell Transplantation. **J Clin Oncol**. 27: 3398-3409. 2009.

MCLINTOCK L, JONES B. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. **British Journal of Haematology**. 126: 289–297. 2004.

MERCURE S, ROUGEAU N, MONTPLAISIR S, LEMAY G. Complete nucleotide sequence of Candida albicans 5.8S rRNA coding gene and flanking internal transcribed spacers. **Nucleic Acids Res**. 21(19):4640. 1993.

MIYAZAKI T, KOHNO S, MITSUTAKE K, MAESAKI S, TANAKA K, ISHIKAWA N, ET AL. Plasma (133)-b-D-Glucan and Fungal Antigenemia in Patients with Candidemia, Aspergillosis, and Cryptococcosis. **Journal of Clinical Pathology**. 33: 3115–3118. 1995.

MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**. 155:335-50. 1987.

NOVAIS CM, PIRES-ALVES M. PCR em tempo real. Uma inovação tecnologica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia ciência e desenvolvimento**. Ed. 33. 2004

NUSSBAUM, MCINNES E WILLARD. **Genetics in Medicine**, 7th edition Thompson & Thompson. 2010.

OBEROI JK, WATTAL C, GOEL N, RAVEENDRAN R, DATTA S AND PRASAD K. Non-albicans Candida Species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. **Indian J Med Res** 136: 997-1003. 2012.

PEMÁN J, SALAVERT M, CANTÓN E, JARQUE I, ROMÁ E, ZARAGOZA R, VIUDES A, GOBERNADO M. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections. **Ther Clin Risk Manag**. 2(2):129-58. 2006.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol**. 20(1):133-63. Review. 2007.

PRYCE TM. Real time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida Albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high –risk patients. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. 47:487-496, 2003.

RASHMI R, RAMANA MV, SHYLAJA R, UPPALAPATI SR, MURALI HS, BATRA HV. Evaluation of a multiplex PCR assay for concurrent detection of four major mycotoxigenic fungi from foods. **J Appl Microbiol**. 114(3):819-27. 2013

RIBEIRO P, COSTA F, MONTEIRO A, CALDAS J, SILVA M, FERREIRA G. Polymerase chain reaction screening for fungemia and/or invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. **Support Care Cancer**. 14: 469–474. 2006.

RICHARDSON, M. D. AND D. W. WARNOCK. Fungal Infection **Diagnosis and Management**, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd. 2003.

SABIITI W, MAY RC. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**. 7(11):1297-313. 2012.

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 239(4839):487-91. 1988

SAIMAN L, LUDINGTON E, DAWSON JD, PATTERSON JE, RANGEL-FRAUSTO S, WIBLIN RT, BLUMBERG HM, PFALLER M, RINALDI M, EDWARDS JE, WENZEL RP, JARVIS W. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**. Dec;20(12):1119-24. 2001.

SAMPAIO P, GUSMÃO L, CORREIA A, ALVES C, RODRIGUES AG, PINA-VAZ C, AMORIM A, PAIS C. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. **J Clin Microbiol**. 43(8):3869-76. 2005.

SHETTY SS, HARRISON LH, HAJJEH RA, TAYLOR T, MIRZA SA, SCHMIDT AB, SANZA LT, SHUTT KA, FRIDKIN SK. Determining risk factors for candidemia among newborn infants from population-based surveillance: Baltimore, Maryland, 1998-2000. **Pediatr Infect Dis J**.;24(7):601-4. 2005.

SIEGEL JD, RHINEHART E, JACKSON M, CHIARELLO L. **Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings**. Download the complete PDF version [Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings 2007](#). The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Download realizado em 05/08/2013 as 10:00 horas.

SPEERS DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. **Clin Biochem Rev.** 27(1):39-51. 2006.

STAAB JF, BRADWAY SD, FIDEL PL, SUNDSTROM P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science.** 283(5407):1535-8. 1999.

THEEL ES, DOERN CD. β -D-glucan testing is important for diagnosis of invasive fungal infections. **J Clin Microbiol.** 51(11):3478-83. 2013.

TRAN-DINH N, CARTER D. Characterization of microsatellite loci in the aflatoxigenic fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mol Ecol.** 9(12):2170-2. 2000.

WHEAT LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. **Transpl Infect Dis.** 8: 128-139. 2006

WHITE TJ, BRUN T, LEE S, TAYLOR J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal and applications.** Academic Press, San Diego, USA: 315-320. 1990.

ZWEIG MH, CAMPBELL G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clin Chem.** 39(4):561-77. 1993.

APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Avaliação de teste molecular para detecção de infecção fúngica em população vulnerável: pacientes em uso de quimioterápicos e neonatos.

Pesquisadora responsável: Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde. Endereço: Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420. Tel: 21012618, 99623975.

Eu,.....

aceito participar de forma voluntária desta pesquisa na qual procurarei contribuir respondendo a perguntas sobre a minha doença (a doença do meu filho) através de um questionário e doação de amostra de sangue ou secreção que será colhida para os exames de rotina e encaminhada para o laboratório, para que seja também utilizada nesse estudo. Esse estudo tem por objetivo desenvolver um teste de laboratório para a detecção de infecção, sei que os testes realizados nesse estudo poderão não me beneficiar, e que eu não terei nenhuma despesa com os testes realizados. Os resultados desse estudo serão divulgados com a garantia de sigilo sobre a identidade dos participantes.

Os riscos a que estarei exposto são aqueles relacionados com a coleta de sangue, ou seja, dor, infecção, sangramento e manchas arroxeadas no local da coleta, que serão minimizados com cuidados de higiene na coleta e a pressão local após a coleta do sangue. Estarei livre para interromper a qualquer momento minha participação no estudo, para isso bastando apenas comunicar ao responsável pela pesquisa acima referida. O acompanhamento da minha doença não será alterado, caso eu desista de participar deste estudo.

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Aggeu Magalhães e qualquer dúvida ligarei para o número 21012500.

Sendo assim, concordo em participar como voluntário não remunerado dessa pesquisa, estando ciente dos riscos e benefícios desses procedimentos para minha pessoa, conforme exposto acima. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo para mim. Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento em duas vias (uma ficará comigo).

Recife, _____, _____, _____

Voluntário

Assinatura

1º testemunha

Assinatura

Pesquisador responsável