

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Amanda Herter

**Validação da Técnica de Amplificação
Isotérmica de DNA Mediada por *Loop*
(LAMP) em Isolados de *Candida* spp. e
*Nakaseomyces glabrata***

Porto Alegre
2023

Amanda Herter

Validação da Técnica de Amplificação Isotérmica de DNA Mediada por *Loop* (LAMP) em Isolados de *Candida* spp. e *Nakaseomyces glabrata*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Vanessa Suñé Mattevi
Coorientadora: Dra. Helena Schirmer

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2023

Catálogo na Publicação

Herter, Amanda

Validação da técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em isolados de *Candida* spp. e *Nakaseomyces glabrata* / Amanda Herter. -- 2023.

58 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Profa. Dra. Vanessa Suñé Mattevi ;
coorientador(a): Profa. Dra. Helena Schirmer.

1. Micologia. 2. Diagnóstico laboratorial. 3. Diagnóstico molecular. 4. Candidíase. I. Título.

Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA e Laboratório de Micologia da UFCSPA

Fontes financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fátima e Nelson, e a minha irmã, Estela, pelo apoio, pela compreensão e pelo incentivo que sempre me deram e que foram indispensáveis ao longo da minha jornada até aqui. Obrigada!

À professora Vanessa, pelo acolhimento e pela pronta disposição em me ajudar em todos os momentos, até nos mais desafiadores.

À professora Helena, por todo auxílio ao longo dos anos e pelas palavras de incentivo e otimismo.

Às técnicas do Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, Grasiela e Marília, por todos os ensinamentos ao longo da parte experimental deste trabalho e pelas boas conversas no laboratório.

Aos meus amigos, por me escutarem nos momentos alegres e difíceis e por me encorajarem tantas vezes.

Aos funcionários, servidores, docentes e discentes do PPG Biociências e da UFCSPA pelo suporte e pelo aprendizado mútuo.

A caminhada ao longo destes anos de trabalho e aprendizados foi mais leve graças a todos vocês. Obrigada!

RESUMO

A prevalência das doenças invasivas causadas por fungos oportunistas tem aumentado nos últimos anos. Os fungos do gênero *Candida* são os principais agentes etiológicos, estando associados a taxas de mortalidade de até 70%. O diagnóstico da candidíase invasiva permanece difícil e demorado graças à utilização de métodos que exigem o isolamento do fungo em meio de cultura, impedindo o tratamento adequado no tempo certo. A técnica de LAMP se mostra uma alternativa promissora para o diagnóstico da infecção, por ser simples, rápida e de baixo custo. Este trabalho teve como objetivo investigar a viabilidade da utilização dessa metodologia na identificação de diferentes espécies de *Candida* e *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), analisando especificidade, sensibilidade e custo-efetividade. Os isolados de *Candida* spp. e *N. glabrata* foram aquecidos a 65°C por 30 minutos com Chelex-100 para o isolamento do DNA e as reações de LAMP utilizaram primers com sequências-alvo nas regiões ITS2 e SAP1. A especificidade foi determinada pela inclusão de outras espécies de *Candida* e outros gêneros de fungos e a sensibilidade analítica foi estimada através de uma diluição em série de DNA. Foram realizados testes quanto ao desempenho da reação direto em matriz biológica (sangue em garrafa de hemocultura e em tubo de EDTA). Ainda, foi realizada a análise de custo-efetividade do LAMP, comparando o uso de kit comercial e da técnica *in house*. Os resultados de especificidade e sensibilidade analítica foram 100% e 100pg/μL, respectivamente. A sensibilidade diagnóstica variou entre 75% e 100% conforme a espécie e o tempo de reação. O LAMP direto em matriz biológica atingiu resultados satisfatórios no sangue em EDTA. A análise de custo-efetividade demonstrou que o uso do kit comercial é mais vantajoso devido ao menor tempo de resultado, maior facilidade de execução e menor risco de contaminação, apesar de a técnica *in house* apresentar o menor custo. A técnica de LAMP apresentou resultados promissores de especificidade e sensibilidade e se mostra um método com potencial para implementação em laboratórios pequenos e com poucos recursos.

Palavras-chave: Micologia. Diagnóstico laboratorial. Diagnóstico molecular. Candidíase.

ABSTRACT

Invasive diseases caused by opportunistic fungi have increased in recent years. Fungi of the genus *Candida* are the main etiological agents, being associated with mortality rates of up to 70%. The diagnosis of invasive candidiasis remains difficult and time-consuming due to the use of methods that require the isolation of the fungus in a culture medium, preventing adequate treatment at the right time. The LAMP technique is a promising alternative for diagnosing the infection, as it is simple, fast and inexpensive. This work intended to analyze the feasibility of using this methodology to identify different species of *Candida* and *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), analyzing specificity, sensitivity and cost-effectiveness. *Candida* spp. samples were boiled with Chelex-100 for 30 minutes at 65°C for the DNA isolation and LAMP reactions used primers with target sequences in the ITS2 and SAP1 regions. Specificity was determined by including other *Candida* species and other fungal genera and analytical sensitivity was obtained by serial dilution of DNA. The performance of the direct reaction in a biological matrix (blood in a blood culture bottle and an EDTA tube) was also evaluated. Furthermore, a cost-effectiveness analysis was carried out, comparing the use of a commercial kit and the *in-house* technique. Specificity and analytical sensitivity results were 100% and 100pg/μL, respectively. The diagnostic sensitivity varied between 75% and 100% depending on the species and reaction time. Direct LAMP in biological matrix achieved satisfactory results in blood in EDTA. The cost-effectiveness analysis showed that the use of the commercial kit is more advantageous due to the shorter result time and easier execution, despite the fact that the *in-house* technique has the lowest cost. The LAMP technique showed promising specificity and sensitivity results and appears to be a method with potential for implementation in small laboratories with limited resources.

Palavras-chave: Mycology. Laboratory diagnosis. Molecular diagnosis. Candidiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Estruturas microscópicas básicas dos fungos.....	10
Figura 2 – Invasão tecidual e disseminação sanguínea de leveduras do gênero <i>Candida</i>	11
Figura 3 – Macroscopia de <i>Candida</i> spp.....	13
Figura 4 – Reação de LAMP.....	16
Figura 5 – Produto de reação de LAMP em gel de agarose 1,5%.....	17
Figura 6 – Visualização dos produtos de LAMP. (A) Colorimetria. (B) Turbidez. (C) Fluorescência através da adição de SYBR Green.....	18

ARTIGO

Figure 1 – Sequence alignment.....	41
Figure 2 – Lower limit detection of <i>Candida albicans</i> LAMP reaction.....	44
Figure 3 – Time consumption of the commercial kit protocol and the <i>in house</i> protocol.....	47

LISTA DE TABELAS

Table 1 – LAMP primers used in this study.....	40
Table 2 – Specificity of the LAMP reaction.....	42
Table 3 – Sensitivity of LAMP for each <i>Candida</i> species and <i>Nakaseomyces glabrata</i> according to time of reaction.....	43
Table 4 – LAMP results for three different DNA isolation protocols of human blood and fungi samples inoculated in blood culture bottles and EDTA tubes.....	45
Table 5 – Cost-effectiveness of LAMP.....	46

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

CI	Candidíase Invasiva
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification – “Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i> ”
MALDI-TOF MS	Matrix Associated Laser Desorption/Ionization Time of Flight – “Tempo de voo de dessorção/ionização de <i>Laser</i> Associado à Matriz”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
UTIs	Unidades de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

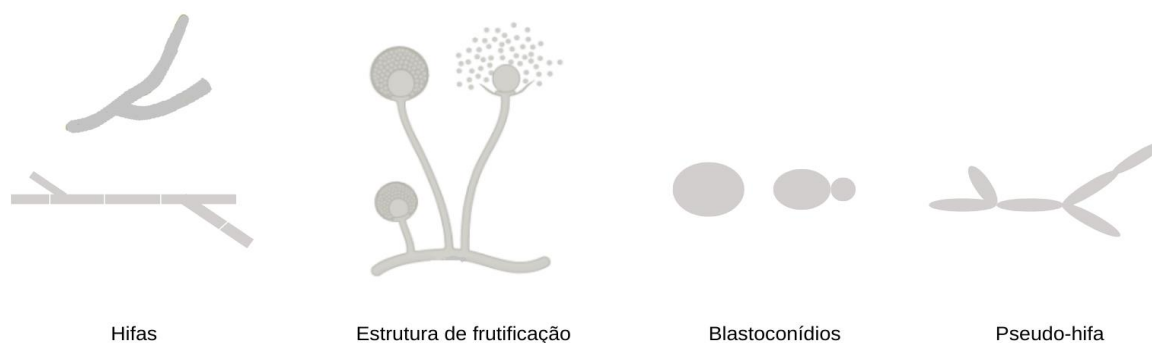
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL.....	13
1.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	15
1.2.1 Amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i>	15
1.3 MALDI-TOF MS.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 ARTIGO CIENTÍFICO	21
4 DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO A – Registro do Projeto de Pesquisa.....	57
ANEXO B – Currículo Lattes	58

1 INTRODUÇÃO

O reino *Fungi* constitui um grupo de microrganismos eucariotos e heterotróficos, uni ou pluricelulares. A célula fúngica é formada por parede celular, membrana plasmática, citoplasma e núcleo, e, em certos gêneros, cápsula mucopolissacarídea. A parede celular, composta por glicoproteínas, define a rigidez celular; enquanto que a membrana plasmática, constituída de fosfolípidos, proteínas e ergosterol, permite as trocas de substâncias entre o citoplasma e o meio externo. No citoplasma, portanto, ocorrem as reações do metabolismo fúngico, definidas pelo material genético detido no núcleo celular. Já a cápsula, confere importante fator de virulência a certos gêneros fúngicos.¹

Classicamente, os fungos se dividem em filamentosos, leveduras e fungos dimórficos. O grupo dos filamentosos caracteriza-se por microrganismos pluricelulares cujas células, as hifas, constituem um micélio e se reproduzem através de estruturas de frutificação (Figura 1). Já as leveduras são unicelulares, caracterizadas por estruturas denominadas blastoconídios e pseudo-hifas, podendo ocorrer a presença de hifas verdadeiras em alguns gêneros (Figura 1). Por fim, os fungos dimórficos são aqueles cuja aparência - filamentosa ou leveduriforme - depende da temperatura a qual ele está exposto.¹

Figura 1 – Estruturas microscópicas básicas dos fungos.



Fonte: Autora (2023).

As infecções causadas por fungos representam uma importante parcela das doenças infectocontagiosas, principalmente em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados. Durante o curso da pandemia de COVID-19 iniciada em dezembro de 2019, notou-se um aumento nessa incidência, uma vez que os pacientes graves permanecem internados por longos períodos, agravados por comorbidades (como

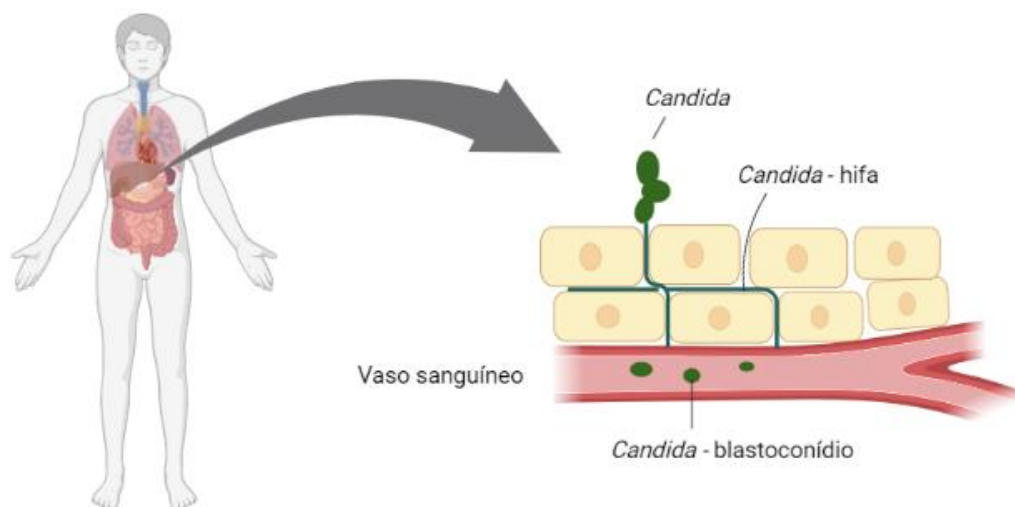
diabetes e hipertensão) e fazendo uso de diversos medicamentos, principalmente corticosteróides.²

O gênero *Candida* se destaca como principal agente etiológico das infecções invasivas causadas por fungos oportunistas. Em outubro de 2022, a Organização Mundial da Saúde³ (OMS) divulgou uma lista de agentes fúngicos a serem considerados prioridade em saúde pública mundial. Tal material classifica duas espécies de *Candida* - a *C. albicans* e a *C. auris* - como “prioridade crítica”, ou seja, o nível mais elevado de importância médica.

Apesar de ser colonizadora dos tratos respiratório, digestivo e genitourinário, as espécies de *Candida* apresentam mecanismos de virulência que permitem a sua disseminação patológica de acordo com o estado imunológico do indivíduo. Características como a produção de enzimas hidrolíticas, adesinas, proteases e fosfolipases, além da capacidade de formação hifas e de biofilme, auxiliam a célula fúngica na invasão e disseminação pelos tecidos do hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes, as infecções por *Candida* spp. costumam ser localizadas e autolimitadas, como a candidíase oral e a candidíase vulvovaginal. Já em pacientes imunologicamente debilitados, a capacidade de invasão tecidual da levedura é favorecida, aumentando os riscos do desenvolvimento da forma mais agressiva da infecção, a candidíase invasiva (CI).⁴

A Figura 2 ilustra a invasão tecidual pelas leveduras do gênero *Candida* e a sua disseminação sanguínea.

Figura 2 – Invasão tecidual e disseminação sanguínea de leveduras do gênero *Candida*.



Fonte: Autora (2023).

A CI apresenta uma incidência de até 2,49/1000 internações e acomete majoritariamente pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTIs), apresentando mortalidade de até 70%.^{5, 6} Além das longas internações em UTIs, alguns outros fatores predis põem o indivíduo ao desenvolvimento da CI, como: idade inferior a um ano e superior a 65 anos, doenças hematológicas e oncológicas, uso de corticosteroides, antibióticos e antifúngicos, e uso de cateter venoso central.⁷

A CI é classicamente dividida em candidíase profunda (invasão da levedura em sítios estéreis) e candidemia (infecção disseminada na corrente sanguínea), sendo esta segunda a sua principal apresentação.⁶ O espectro de sintomas clínicos da CI é bastante amplo e não-específico, sendo normalmente semelhante a outras infecções. Além disso, o diagnóstico laboratorial costuma ser deficiente - seja pelas limitações inerentes aos métodos utilizados, seja pela impossibilidade de aplicação de metodologias mais sofisticadas. De acordo com o consenso internacional de diagnóstico de doenças fúngicas invasivas, uma provável CI é aquela em que o paciente apresenta manifestações clínicas e histórico médico compatíveis à infecção e resultado positivo em testes sorológicos; já a CI comprovada é aquela em que se tem, ainda, a confirmação da presença da levedura por métodos padrão-ouro (histopatológico, isolamento em cultivo e/ou métodos moleculares).^{6, 8}

Em todo o mundo, a espécie mais comumente associada à CI é a *C. albicans*. Nas últimas décadas, entretanto, o padrão de prevalência das espécies tem se modificado, e as infecções causadas por *C. não-albicans*, como *C. parapsilosis* e *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), têm se tornado cada vez mais frequentes. A prevalência dessas diferentes espécies varia conforme a região, o que está relacionado a fatores como o uso de antifúngicos ou a ocorrência de surtos.^{7, 9}

Na América do Sul, a espécie *não-albicans* mais prevalente é a *C. parapsilosis*, enquanto que nos Estados Unidos e em parte da Europa, a *N. glabrata* (*C. glabrata*) é mais frequentemente isolada depois da *C. albicans*.^{7, 9} Já no Brasil, embora *C. albicans* seja a mais prevalente em todo o território, a segunda posição varia de norte a sul do país: *C. parapsilosis* parece ser a mais frequente no sul, e *N. glabrata* (*C. glabrata*) e *C. tropicalis* no norte e nordeste, respectivamente.⁷ A grande relevância dessa mudança epidemiológica incide no tratamento e no prognóstico dos pacientes, uma vez que as espécies *não-albicans* de *Candida* e a

N. glabrata (*C. glabrata*) são conhecidamente menos suscetíveis - e até resistentes - aos principais antifúngicos utilizados na rotina médica.⁶

Ao longo da pandemia de Covid-19, a CI foi a segunda infecção oportunista fúngica mais comum em pacientes acometidos pelo vírus Sars-Cov-2. Segundo estudo publicado por Basile *et al.*¹⁰ (2022), houve um aumento na incidência de candidemia de 2 a 10 vezes nos pacientes com a Covid-19 em comparação com aqueles sem a infecção viral. A incidência dessa candidíase associada à Covid-19 variou entre 0,7% e 23,5%, e a candidemia apareceu como principal forma de apresentação. No mundo, a espécie mais frequentemente isolada foi *C. albicans*, contudo, diferente do que se via até então, neste caso, a segunda espécie mais prevalente foi a *C. auris* - espécie multirresistente de notificação compulsória no Brasil.

1.1 DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL

Os métodos tradicionais de diagnóstico da CI envolvem o isolamento do fungo em meio ágar *sabouraud* dextrose acrescido de cloranfenicol (SCL), seguido de provas bioquímicas ou crescimento em meio cromogênico *Candida* (para identificação da espécie), além de exame direto em amostras de biópsia (histopatologia) e alguns testes sorológicos. Quando isolado em SCL, o gênero *Candida*, no geral, se apresenta na forma de colônias brancas, cremosas e lisas (Figura 3); já a microscopia dessas colônias é marcada pela presença majoritária de blastoconídios.^{1, 11}

Figura 3 – Macroscopia de *Candida* spp.



Fonte: Autora (2023).

Embora considerado um método padrão-ouro, o cultivo apresenta limitações, como a baixa sensibilidade para amostras de sangue (principal amostra utilizada no diagnóstico da CI) e a demora na obtenção do resultado. A hemocultura (cultivo de amostras de sangue) não consegue constatar a presença da levedura em até 70% dos casos de CI porque a técnica detecta apenas estruturas fúngicas ativas, as quais, muitas vezes, se encontram no sangue periférico por apenas um curto período da infecção.^{6, 12} Ainda, o tempo médio de identificação da levedura varia entre 3 e 7 dias, levando a um atraso na terapêutica adequada e a um pior prognóstico.⁶

As amostras de hemocultura são inicialmente incubadas por um período entre 24 horas e 72 horas para que se aguarde o crescimento fúngico; em caso positivo, uma alíquota é cultivada em novo meio de cultura por até 48 horas para isolamento do fungo, e, por fim, procedem-se as provas fenotípicas para identificação a nível de espécie - que podem levar até 48 horas. No caso das leveduras, testes de assimilação de carbono e nitrogênio e de fermentação de açúcares são bastante utilizados. O teste do tubo germinativo auxilia no diagnóstico diferencial de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, enquanto o cultivo em meio cromogênico permite diferenciar *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *N. glabrata* (*C. glabrata*).^{6, 11}

O exame histopatológico também é de grande valia e muito utilizado no diagnóstico da CI. O método consiste na investigação das estruturas fúngicas em amostras de tecido (biópsias), através de diferentes colorações que permitem a sua visualização ao microscópio. Contudo, essa técnica não permite a identificação a nível de espécie - o que é de grande importância para a adequação do tratamento - e apresenta uma sensibilidade muito baixa dependendo do corante utilizado.⁹

Por fim, existem as metodologias sorológicas que, embora não possam ser aplicadas para a definição diagnóstica, podem auxiliar na identificação de uma CI. Os testes incluem a detecção dos antígenos *Candida mannan* e beta-D-glucano (BDG) e do anticorpo *anti-mannan* em amostras de soro ou plasma. O BDG apresenta sensibilidade de 92% e especificidade 81%, sendo o mais amplamente utilizado.⁶ A sua grande desvantagem, entretanto, se deve ao fato de que o BDG compõe a célula de outros gêneros fúngicos, como *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis* spp., sendo seu resultado válido apenas como indicativo de uma infecção fúngica invasiva. Além disso, a identificação sorológica é restrita ao gênero, não sendo possível a distinção a nível de espécie.^{6, 13}

1.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A fim de superar as limitações das metodologias tradicionais de diagnóstico, tem se investido cada vez mais em técnicas de biologia molecular para a identificação dos fungos. Os testes moleculares incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como PCR em tempo real, *multiplex* PCR e *nested* PCR, e as mais recentes técnicas de amplificação isotérmica do DNA. A PCR é aplicada em diversas áreas e consiste na amplificação do material genético através de ciclos não-isotérmicos com o uso de um termociclador. As metodologias derivadas da PCR apresentam elevada sensibilidade e especificidade e menor tempo de resultado (cerca de 2 a 4 horas), permitindo um diagnóstico preciso e rápido para as micoses invasivas.^{9, 14, 15}

No caso da CI, apesar da baixa quantidade de estruturas fúngicas ativas no sangue periférico, o material genético do microrganismo permanece detectável neste ao longo da infecção, permitindo que esta seja uma excelente forma de detecção. Além disso, essa característica permite, também, a identificação precoce de casos de CI em pacientes de alto risco.^{6,12} Avni *et al.*¹⁶ (2011) revelaram, em um estudo de revisão sistemática e metanálise, que a PCR apresenta sensibilidade e especificidade para a detecção de CI de, em média, 95% e 92%, respectivamente - desempenho superior ao da hemocultura.

Apesar disso, a necessidade de equipamentos sofisticados e o alto custo desses métodos dificultam a sua aplicabilidade em muitos laboratórios. Ainda, a DNA polimerase utilizada na reação é bastante sensível a interferentes que possam estar presentes na amostra analisada, por isso, as técnicas de PCR exigem um protocolo - que pode ser extenso e trabalhoso - de extração prévia do DNA.^{9, 14}

1.2.1 Amplificação isotérmica mediada por *loop*

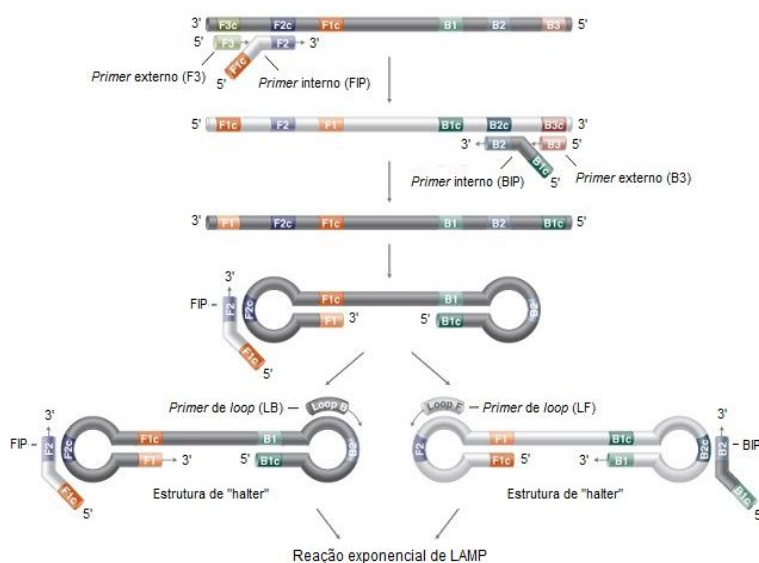
No ano 2000, Notomi *et al.*¹⁷ (2000) descreveram pela primeira vez uma técnica de amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop* (LAMP), que se destaca por apresentar sensibilidade, especificidade e acurácia bastante elevadas e por ser metodologicamente menos exigente que as técnicas de PCR. Desde então, a aplicação da LAMP vem sendo estudada em diversas frentes, inclusive na

microbiologia para a detecção de vírus, bactérias e fungos em isolados e em amostras clínicas, e até para a identificação de genes de resistência.^{14, 18 - 21}

O método baseia-se em uma reação isotérmica de amplificação do DNA mediada por *loop*, utilizando um conjunto de quatro *primers*, dois *primers* internos (FIP e BIP) e dois *primers* externos (F3 e B3) - podendo ser adicionados mais dois *primers* de *loop* (LF e LB), que melhoram o desempenho da reação. Diferente da PCR, a reação de LAMP acontece em uma única temperatura (em torno de 65 °C), sem o uso de termociclador, gerando inúmeras cópias do material genético em cerca de 60 minutos.¹⁷

A Figura 4 ilustra a reação de LAMP a partir de uma sequência-alvo de DNA. A reação inicia com o anelamento do *primer* interno e a extensão deste pela DNA polimerase isotérmica, ao mesmo tempo que ocorre o desacoplamento da dupla-fita de DNA. Em seguida, acontece o anelamento do *primer* externo e, enquanto a DNA polimerase isotérmica estende este *primer*, forma-se o produto de LAMP que se auto-hibridiza em *loop* - graças a presença de uma sequência reversamente complementar no *primer* interno -, dando origem a uma estrutura “em halter”. Esta é a estrutura-chave para a reação exponencial de LAMP, pois apresenta sequências que permitem o anelamento dos *primers* internos e dos *primers* de *loop*, e garantem as duas principais características de LAMP: formação de produtos de diferentes tamanhos e grande quantidade de DNA em curto tempo de reação (cerca de 60 minutos).^{17, 22}

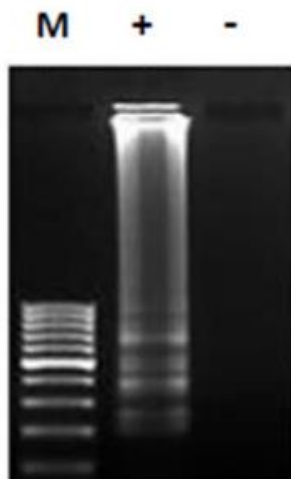
Figura 4 – Reação de LAMP.



Fonte: Adaptado de New England Biolabs®²³

Como são formados produtos diversos ao longo da reação de LAMP, percebe-se a formação de um rastro no gel de agarose - diferente da visualização das bandas clássicas da PCR (Figura 5).

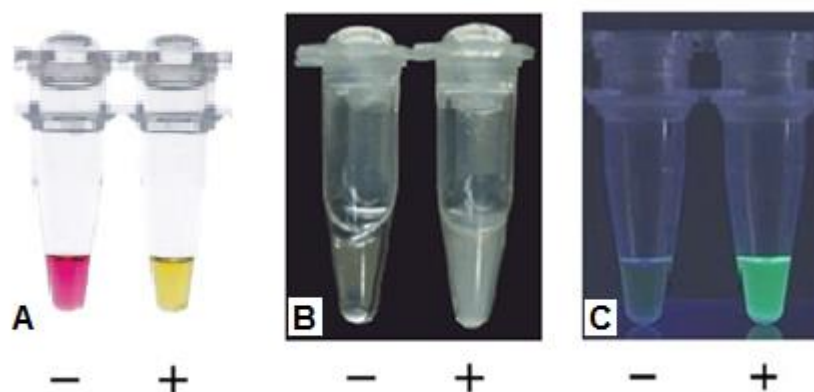
Figura 5 – Produto de reação de LAMP em gel de agarose 1,5%.



Fonte: ROSTAMI et al.²⁴ (2018)

Além da rapidez e do baixo custo pela dispensa de equipamentos sofisticados, a técnica de LAMP não exige isolamento prévio do DNA da amostra e a leitura do resultado pode ser feita pela simples inspeção visual, sem a necessidade de eletroforese posterior.²² Atualmente, existem kits comerciais disponíveis no mercado cujo método de detecção se baseia em uma reação colorimétrica, ou seja, quando ocorre a amplificação do material genético, o pH do meio é modificado e, por consequência, a sua cor. Além disso, existem outras formas simples de identificação dos produtos de LAMP, como avaliação da turbidez ou de fluorescência. No primeiro caso, já que durante a reação de amplificação acontece a formação de um sal insolúvel, o pirofosfato de magnésio, é possível que se detecte a sua precipitação através de inspeção visual a olho nu ou de um turbidímetro. Já no segundo, adiciona-se um agente fluorescente que se liga ao produto amplificado, permitindo a visualização de fluorescência através da luz ultravioleta.²² A Figura 6 ilustra as três formas de detecção de LAMP.

Figura 6 – Visualização dos produtos de LAMP. (A) Colorimetria. (B) Turbidez. (C) Fluorescência através da adição de SYBR Green.



Fonte: Adaptado de New England Biolabs®²⁵ e Eiken GENOME SITE²⁶

Na micologia médica, já em 2004, Endo *et al.*²⁷ (2004) testaram a metodologia de LAMP para a detecção de *Paracoccidioides brasiliensis*, obtendo resultados de sensibilidade e especificidade de 100%, valores semelhantes à PCR convencional. Fallahi *et al.*²⁸ (2019) avaliaram o desempenho da técnica na identificação de *C. albicans*, revelando 100% de concordância dessa com os métodos tradicionais de meio cromogênico *Candida* e teste do tubo germinativo. Ainda, outros estudos demonstram a eficácia da técnica de LAMP na detecção de leveduras de importância médica, tais como *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, complexo *C. parapsilosis*, *C. auris* e *Saccharomyces cerevisiae*.^{14, 18, 19, 29}

Desde 2020, a técnica ganhou visibilidade devido a sua aplicação no diagnóstico da Covid-19. De fato, muitos laboratórios clínicos no Brasil e no mundo reconheceram as suas vantagens e passaram a utilizar a metodologia na sua rotina, inclusive ampliando a sua aplicação para outros microrganismos.

1.3 MALDI-TOF MS

Outra técnica que vem sendo aplicada para identificar microrganismos baseia-se na espectrofotometria de massa, o *Matrix Associated Laser Desorption/Ionization Time of Flight* (MALDI-TOF MS). O método consiste na irradiação de laser sobre a amostra, vaporização e ionização de moléculas e identificação do conteúdo através de um gráfico gerado a partir do tempo de chegada dessas moléculas em um detector (*time of flight*). As principais vantagens

do MALDI-TOF MS são a possibilidade de utilização direta de amostras biológicas, a rapidez de resultado e a sensibilidade e especificidade elevadas.^{6, 30}

Utilizado pela primeira vez na microbiologia na década de 1990, o MALDI-TOF MS começou a ser usado na identificação de fungos no início dos anos 2000. Diversos estudos apontam para a superioridade da técnica na identificação de leveduras, permitindo melhor diferenciação de espécies. Por exemplo, em comparação aos métodos convencionais, o MALDI-TOF MS permite diferenciar as espécies do complexo *C. parapsilosis*, além de diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis*.^{6, 30}

Apesar das vantagens, o MALDI-TOF MS utiliza um equipamento de custo bastante elevado o que torna sua utilização possível apenas em grandes centros de referência.⁶ Além disso, as atualizações de dados acerca de novas moléculas ou microrganismos também devem ser adquiridas de tempos em tempos, diferente dos bancos de dados de acesso gratuito utilizados no desenvolvimento de *primers* nas técnicas de biologia molecular.

Tendo em vista as possíveis vantagens da utilização da técnica de LAMP para o diagnóstico de CI e o desconhecimento da técnica em nosso meio, bem como a possibilidade de utilização em laboratórios clínicos sem a necessidade de aquisição de equipamentos específicos e de alto custo, o presente trabalho teve os objetivos apresentados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade da utilização da metodologia de amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP) para identificação de *Candida* spp. e *N. glabrata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e otimizar as condições da utilização da técnica de LAMP no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA;
- Determinar a especificidade da reação de LAMP na identificação de *Candida* spp. e *N. glabrata*;
- Determinar a sensibilidade da reação de LAMP na identificação de *Candida* spp. e *N. glabrata*;
- Determinar o limite de detecção da reação de LAMP na identificação de *Candida* spp. e *N. glabrata*;
- Comparar o custo-efetividade das técnicas de LAMP *in house* e utilizando kit comercial na identificação de *Candida* spp. e *N. glabrata*;
- Analisar a viabilidade da aplicação da técnica de LAMP diretamente em matriz biológica.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em preparação para submissão ao periódico Medical Mycology (<https://academic.oup.com/mmy>)

Instruções para elaboração do artigo disponíveis em: https://academic.oup.com/mmy/pages/Manuscript_Preparation

Feasibility of the use of the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) in the identification of *Candida* spp. species and *Nakaseomyces glabrata* in resource-limited settings

Amanda Herter¹, Cecília Bittencourt Severo², Valério Aquino³, Vanessa Suñé Mattevi^{1,2}, Helena Schirmer²

¹ Graduate Program in Biosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil

² Basic Health Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil

³ Microbiology Laboratory at Hospital of Clínicas of Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Vanessa Suñé Mattevi, telephone: +55 51 33038763, e-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

Keywords: Candidiasis. Mycology. Diagnosis.

Abstract

Candida genus is the main etiological agent of invasive and serious diseases caused by opportunistic fungi. Invasive candidiasis has mortality rates of up to 70 % and laboratory diagnosis remains difficult and time-consuming, which prevents adequate treatment, especially in high-risk patients. The LAMP technique is a promising alternative to conventional diagnosis because it is fast, accurate and inexpensive. The aim of this study was to evaluate the feasibility of the use of the LAMP assay in the identification of *Candida* species and *Nakaseomyces glabrata*. Fungal isolates were boiled with Chelex-100 to enable DNA release and LAMP reaction was performed using primers targeting the ITS2 and SAP1 gene regions. The specificity of the assay was evaluated with the inclusion of other fungal genera and its lower limit detection was determined with a serial dilution of isolated DNA. The methodology was also tested in blood inoculated with the fungi in hemoculture bottles and EDTA tubes. A cost-effectiveness analysis was carried out, comparing both the commercial kit and the *in house* protocols. We found 100 % specificity for every species tested and sensibility values between 75 % and 100 %. Lower limit detection was 100 pg / μ L. The LAMP reaction of samples in EDTA tubes showed satisfactory results. Cost-effectiveness analysis showed more advantages in using the commercial kit protocol. The LAMP technique shows as a promising method for resource-limited laboratories in identifying *Candida* species due to its great sensibility and specificity together with low cost.

Introduction

Candida spp. is the major pathogen involved in opportunistic invasive fungal infections all over the world, with high mortality rates. In October 2022, the World Health Organization classified *Candida albicans* and *Candida auris* as top priority fungal agents to public health due to their ability to cause serious illness.¹ Invasive candidiasis (IC) has an incidence of up to 2.49 / 1000 hospitalizations and it mainly affects immunosuppressed patients and those hospitalized in the intensive care unit (ICU).^{2, 3} Classically, IC can be divided into candidemia (disseminated infection in the blood) and deep seated candidiasis (with or without candidemia). Clinical features of the IC are common to other invasive infections, so laboratory diagnosis plays an essential role to confirm the disease and prognosis of IC patients.³

During the Covid-19 pandemic, IC was the second most common fungal infection associated with Sars-Cov-2 and had an incidence increase of up to 10-fold in Covid-19 patients compared to non-Covid-19 patients.⁴ *Candida albicans* is still the most frequent species isolated from patients with IC worldwide. However, there has been an increase of detection of non-*albicans* species over the past years, including *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, the multidrug resistant *C. auris*, and *Nakaseomyces glabrata* (*C. glabrata*).^{5, 6} The great relevance of this increase of non-*albicans* species is their lower susceptibility against common antifungal drugs, leading to a more difficult treatment and a worse prognosis.³

Traditional diagnosis of IC involves culture isolation of *Candida* from blood samples, which is time consuming and has a low sensitivity (around 40 %), because it only detects active fungal structures.^{3, 7} In order to overcome these disadvantages, molecular methods derived from the polymerase chain reaction (PCR) have been

introduced into IC diagnosis in the last decades. These techniques have high sensitivity (around 91 %) and specificity (up to 99 %) levels.³ However, they require sophisticated equipment and are expensive to perform, so their implementation is unfeasible in many routine laboratories.^{5, 8, 9}

In the early 2000s, Notomi *et al.*¹⁰ developed a new isothermal reaction to amplify DNA, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). The reaction uses at least four primers, two inner primers (FIP and BIP) and two outer primers (F3 and B3), and two loop primers (LF and LB) can be added to the reaction, which improve LAMP's performance. Reaction occurs at a temperature around 65 °C and can be performed at a water bath with no need of using a thermocycler.¹⁰

Since the LAMP methodology was first described, it has been applied in many different areas, including detection of viruses, bacteria and fungi.^{8, 11, 12, 13, 14} Fallahi *et al.* (2019)¹⁵ evaluated the performance of the LAMP reaction in identifying *C. albicans*, revealing 100 % agreement with traditional methods of *Candida* chromogenic medium and germ tube test. Notwithstanding, other studies demonstrated the effectiveness of this technique in the detection of medically important yeasts, such as *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex, *C. auris* and *Saccharomyces cerevisiae*.^{8, 11, 12, 16}

The LAMP reaction is a simple, fast and cheap technique which has high levels of sensitivity and specificity.^{8, 17} Thus, the aim of this study was to evaluate the feasibility of using the LAMP technique for the identification of *Candida* spp. and *N. glabrata* (*C. glabrata*), taking in consideration its specificity, sensibility and laboratory costs.

Materials and Methods

Candida spp. isolates

Candida spp. and *N. glabrata* (*C. glabrata*) isolates were obtained from the Mycology Laboratory of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre and Hospital de Clínicas of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Isolates were previously identified by matrix associated laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF MS) or PCR and included 20 isolates of each *C. albicans*, *C. tropicalis* and *N. glabrata* (*C. glabrata*), 16 isolates of each *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*, and two isolates of *C. metapsilosis*.

DNA isolation

The isolates were grown in *Candida* chromogenic agar (Condalab, Spain) for 24 - 72 hours and boiled with Chelex-100 Resin (Sigma-aldrich, Missouri, USA) as follows. A 0.5 McFarland suspension of fungi was prepared in saline; one part of this suspension and one part of Chelex-100 5% (suspended in ultrapure water) were added to a microtube, vortexed for 30 s - 45 s and boiled at 90 - 95 °C for 30 minutes, with vortexing for 30 s - 45 s in the middle of this period. Afterwards, samples were centrifuged at 12,000 rpm for 2 minutes and the supernatant was transferred to a new microtube and used in the LAMP reaction.

LAMP reaction

LAMP primers targeting *internal transcribed spacer 2* (ITS2) or *secreted aspartyl proteases 1* (SAP1) gene regions for each species of *Candida* spp. were retrieved from the literature^{12, 16, 18} and are described in Table 1. LAMP reaction was

performed using the WarmStart Colorimetric LAMP Mastermix 2X (New England Biolabs, United Kingdom). Manufacturer's protocol was adapted to a final volume of 10 μ L, as follows: 5 μ L of the LAMP mix, 1 μ L of a 10-fold primer mix (final concentration of each primer: 0.2 μ M of F3 / B3, 0.4 μ M of FIP / BIP and 1.6 μ M of LF / LB), 3 μ L of ultrapure water and 1 μ L of the sample (isolated DNA). Reactions were carried out at 65 °C and time of reaction varied between 30 min and 50 min.

Furthermore, LAMP *in house* reaction was tested using the following protocol to a final volume of 10 μ L: 1 μ L of reaction buffer 10x, 0.6 μ L of MgSO₄, 1.4 μ L of dNTP (10 μ M), 0.4 μ L of *Bst* polymerase (8 U/ μ L), 0.8 μ L of betaine (5 M), 1 μ L of a 10-fold primer mix, 3.8 μ L of ultrapure water and 1 μ L of the sample (isolated DNA). Reactions were carried out at 63 °C for 60 minutes and LAMP products were visualized under the UV light after the addition of 1 μ L of SYBRGreen (Invitrogen, USA) 10-fold diluted.

Specificity of LAMP reaction

To evaluate the specificity of LAMP reaction (commercial kit protocol), isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Rodothorula* spp. were submitted to LAMP, and each primer set was tested on other species of *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. auris*) and *N. glabrata* (*C. glabrata*). In addition, each primer set sequence was hybridized *in silico* with GenBank data using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) from National Center for Biotechnology Information (NCBI), to verify possible alignments with other fungi species.

Lower limit detection of LAMP reaction

To evaluate the lower limit detection of the reaction, LAMP (commercial kit protocol) was performed in duplicate to a 10-fold dilution series (from 10 ng / μ L to 1 fg / μ L) of extracted DNA of two isolates of *C. albicans*. DNA was extracted from a 0.5 McFarland suspension of the fungi using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, California, USA) and following manufacturer's instructions.

LAMP reaction in biological specimens

We also aimed to evaluate the possibility to perform the LAMP reaction in biological specimens, such as blood culture samples and whole blood collected in EDTA tubes. So, five parts of human blood and one part of the 0.5 McFarland suspension of the fungi (four isolates of *Candida albicans*) were added to the sample bottle (BD Bactec Plus Aerobic/F Culture Vials, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA).

Three different DNA isolation protocols were tested and LAMP reactions were performed in duplicate using 1 μ L of the 10-fold primer mix and were incubated at 65 °C for 30, 40 and 50 minutes. Protocol 1 consisted of boiling the sample with Chelex-100 5 % (suspended in ultrapure water) in the same way as applied to the isolates. In protocol 2, based on Lim et al. (2022)⁸, we used a lysis buffer before boiling the sample with Chelex-100 10 % (suspended in 1-fold Tris-EDTA), as follows: 300 μ L of the sample add to 900 μ L of Tris-HCL 20 mM, vortex for 10 s and incubation at room temperature for 10 minutes followed by a centrifugation (10,000 rpm / 5 minutes). After the centrifugation, we resuspended the pellet with Chelex-100 10 % (suspended in 1-fold Tris-EDTA) and continued the boiling process: boil the sample for 30 minutes, vortexing for 15 s every 10 minutes, centrifugate (12,000 rpm / 2 minutes) and transfer supernatant to a new microtube. Finally, in protocol 3, based

on Singh et al. (2018)¹⁹, we boiled the Chelex-100 5 % (suspended in 1-fold Tris-EDTA) for 10 minutes before adding the same amount of sample in the microtube, boiling for 8 minutes, vortexing for 15 s and boiling for 7 minutes. We centrifuged the sample (12,000 rpm / 1 minute and 30 seconds), transferred the supernatant to a new microtube, added 200 µL of ammonium acetate 7.5 M and incubated on ice for 5 minutes. Then, we centrifuged the sample (12,000 rpm / 10 minutes), transferred 540 µL of the supernatant to a new microtube, added 60 µL of sodium acetate (3 M) and 200 µL of cold ethanol, vortexed for 15 s and incubated overnight at - 20 °C. After that, we centrifuged the sample (11,000 rpm / 10 minutes / 4 °C), discarded supernatant and washed the pellet (11,000 rpm / 10 minutes / 4 °C) two times with 200 µL of cold ethanol (75 %) and one time with 200 µL of cold isopropanol. After the last wash, we removed the supernatant, waited 7 - 10 minutes and resuspended the pellet with 10 µL of 1-fold Tris-EDTA or ultrapure water.

Results

Specificity of the LAMP reaction

The first primer set tested for *C. albicans* (Kasahara et al., 2014¹⁸, described in Table 1) showed amplification for both *C. albicans* and *N. glabrata* (*C. glabrata*). To be sure that the primer set was not specific for our isolates, we performed a PCR using F3 and B3 primers, which showed amplification of both species, each one with a different fragment size. Then, we performed DNA sequencing of these products which confirmed that the primer set was amplifying both *C. albicans* and *N. glabrata* (*C. glabrata*) (Figure 1). Therefore, we tested another primer set for *C. albicans* (Lin et al., 2021¹², described in Table 1) which showed 100 % specificity in our isolates.

No other primer set showed any cross-reaction and LAMP's specificity was 100 % for all of the *Candida* species tested and *N. glabrata* (*C. glabrata*), as shown in Table 2. Furthermore, BLAST results for each LAMP primers set showed no alignment with other species than the target ones.

Sensitivity of the LAMP reaction

LAMP sensitivity ranged among species and according to time of reaction, as shown in Table 3. *N. glabrata* (*C. glabrata*) and *C. metapsilosis* reactions achieved the highest sensitivity (100 %), while *C. tropicalis* had the lowest (75 %). Best reaction time for *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis* was 30 minutes, while for *C. albicans* and *C. orthopsilosis* was 40 minutes and for *C. tropicalis* and *N. glabrata* (*C. glabrata*) was 50 minutes. In addition, LAMP could not be performed in a 50 minutes reaction for *C. albicans* and *C. parapsilosis* because the time window between the color change in positive samples and negative controls is small, and after 50 minutes the negative controls frequently present color change to yellow. Based on these results, we considered 40 minutes as the best time of reaction for LAMP commercial kit protocol.

Lower detection limit of LAMP reaction

LAMP reaction (commercial kit protocol) showed a detection limit of 100 pg / μ L (Figure 2).

LAMP reaction in biological matrix

In order to evaluate the feasibility of performing LAMP directly on biological matrix, we spiked samples of whole blood and hemoculture bottles with *C. albicans* isolates.

LAMP results for samples from EDTA tubes were satisfactory, however for hemoculture bottle samples the reproducibility was low (Table 4). Considering the results for EDTA tubes, we propose protocols 2 and 3 as the best ways for DNA isolation and 50 minutes as the ideal reaction time. LAMP's sensitivity using protocol 2 was 100 %, however reproducibility was 75 %. When using protocol 3 to isolate DNA, LAMP's sensitivity and reproducibility were 100 %.

Cost-effectiveness of the LAMP commercial kit protocol and the *in house* protocol

A single LAMP reaction using the commercial kit protocol costs US\$ 1.26, while using the *in house* protocol the cost was US\$ 1.09 (2022). We considered the cost of LAMP reagents and primers in this analysis and data are shown in Table 5.

In order to calculate LAMP's time consumption, we considered a reaction time of 40 minutes for the commercial kit protocol and 60 minutes for the *in house* protocol. Also, we considered the same Chelex-100 DNA isolation protocol (described above) for both procedures. Thus, including DNA isolation, pipetting and visualization times, the whole LAMP process for a single reaction using commercial kit protocol took 85.5 minutes, while the *in house* protocol took a total time of 115 minutes (Figure 3 and Table 5).

Furthermore, we classified both protocols according to their execution complexity. Once the commercial kit protocol involves the use of a single ready-to-use reagent (kit), it was defined as a very easy protocol. The *in house* protocol requires pipetting each reagent separately (isothermal DNA polymerase, betaine and dNTPs), which could lead to pipetting errors, as well as the SYBRGreen to visualize the reaction result, so it was considered as an easy protocol.

Discussion

Invasive candidiasis (IC) affects mostly hospitalized and immunocompromised patients and it is one of the main opportunistic fungal infections. Mortality rates of IC can reach up to 70 %, depending on clinical conditions of the patient and on which species is causing the infection.^{1, 2} No wonder, in 2022, the World Health Organization (WHO) classified *C. albicans* and *C. auris* as top priority in global public health³. Early adequate antifungal treatment can reduce mortality rates, yet it depends on the rapid diagnosis of the infection.

Since clinical symptoms of IC are nonspecific and common to other infections, laboratory techniques play a very important role in the diagnosis. However, laboratory diagnosis remains difficult and time-consuming, leading to a delay in patient treatment and a worse prognosis in many cases. Traditional laboratory methods have low sensitivity and most clinical laboratories in mostly low/middle income countries do not have access to sophisticated methodologies, such as PCR and MALDI-TOF MS. The LAMP technique is a fast, simple and low cost promising method for microbiological diagnosis. Thus, this study aimed to evaluate the performance of the LAMP technique in the *Candida* spp. and *N. glabrata* (*C. glabrata*) identification.

Proposed by Notomi et al. (2000)¹⁰, LAMP reaction occurs in a single temperature and it has been described as a promising technique because of its great specificity and sensibility. Studies revealed 100 % specificity on diagnosing microorganisms from the culture, including *Candida* spp., and sensitivity values that vary from 63 % to 100 % for different fungi species.^{8, 11, 16, 20 - 23} In this study, we found a specificity of 100 % for every species of *Candida* spp. tested and *N. glabrata* (*C. glabrata*). Our

results for LAMP's sensitivity varied among species (within 75 % and 100 %) and according to time of reaction. We found 40 minutes as the best time of reaction once most species tested achieved their best sensibility results by this time. Lin et al. (2021)¹² also found 40 minutes as the best reaction time in their study using a commercial kit and the same *C. albicans* primer set. Also, Fallahi et al. (2019)¹⁵ reached a reaction time of 45 minutes for *C. albicans*, although they used the *in house* LAMP methodology and a different primer set.

The lower limit detection of LAMP reaction was 100 pg / μ L, which is a higher value than reported by other authors different fungal genera.^{9, 15, 24, 25} To the extent of our knowledge, our study is the first one to use this Chelex-100 DNA isolation protocol for *Candida* spp. Chelex-100 is a resin with the capability to chelate metal ions. When a sample is boiled with the resin, the high temperature promotes DNA release from the cells and the resin chelates the magnesium ions that may act as cofactors of deoxyribonucleases, preventing DNA degradation by these enzymes.²⁶ We did not apply any DNA purification method in our samples before performing the Chelex-100 isolation protocol or the LAMP reaction, which could explain the difference between our results and those from literature. Also, none of these authors used this specific commercial kit to perform the LAMP reaction which could either lead to different results.

We also performed the LAMP reaction in a biological specimen and achieved good results for samples in EDTA tubes. As the Chelex-100 5 % isolation protocol alone (protocol 1) did not work in these samples, we performed two other protocols for a better separation of the fungal cells from blood compounds (protocols 2 and 3). Although we only tested four isolates of *C. albicans* inoculated with human blood in EDTA tubes and hemoculture bottles, purification steps really improved LAMP

results of sensitivity and reproducibility, showing that applying the technique in clinical samples should be promising. Furthermore, other authors found promising results using Chelex-100 protocols before performing the LAMP reaction. Lim et al. (2022)⁸, developed a Chelex-100/boiling method using a lysis buffer to remove blood cells and a filter to concentrate the amount of *C. albicans* DNA and achieved better results for LAMP technique than the qPCR method. Also, Wang et al. (2022)⁹ tested the LAMP in *C. albicans* samples and found results suggesting that it could be an accurate, specific and sensitive way to detect the fungus.

Cost-effectiveness analyses of the LAMP reaction showed that although the *in house* protocol is cheaper than using the commercial kit, this last one has more advantages. The *in house* protocol is more susceptible to pipetting errors when adding every reagent to the reaction tube, while the commercial kit is a simple ready-to-use reagent that already allows the analyst to visualize the result. Also, one of the biggest problems of the LAMP reaction is the risk of contamination when opening the reaction tube after amplification, once a big amount of copies of the genetic material is formed. The *in house* protocol demands the addition of SYBR Green to visualize the results after the reaction, which can lead to problems with contamination. Finally, the commercial kit protocol is faster, and considering the use of the Chelex-100 protocol to isolate the DNA, results could be achieved in about one hour and a half.

Polymerase chain reaction and MALDI-TOF MS methodologies are widely studied and used around the world, as they show great results in the diagnosis of *Candida* species. Some PCR kits and protocols allow the identification of *Candida* species directly from whole blood, but they demand the use of expensive reagents and equipment that do not justify their use in small laboratories.⁹ MALDI-TOF MS technology enables to identify a *Candida* species in a few minutes from a colony,

which greatly reduces the time of diagnosis. Nevertheless, this method is initially expensive and requires an investment that is not possible in many laboratories, mostly in low/middle income countries.^{9, 13} Thus, LAMP technique shows a promising alternative to these laboratories because of its low cost, agility and quality results.

This study has some limitations. Although we tested a larger number of *Candida* spp. isolates than other studies, we tested only two isolates of *C. metapsilosis*. Also, to verify the possible interference of the main biological matrix collected for the diagnosis of candidemia, we inoculated a large amount of *C. albicans* cells in blood, which does not entirely mimic real situations such as small number of fungal cells in peripheral blood and presence of more than one microorganism in blood circulation. Finally, we did not test the specificity of the LAMP in the biological matrix.

The LAMP technique is a promising alternative for resource-limited laboratories in terms of microbiological diagnosis. Our results reinforce LAMP's quality and agility in identifying *Candida* species with great specificity and sensitivity. Also, the Chelex-100 isolation protocol is a cheap and fast alternative to isolating fungal DNA before the LAMP reaction, resulting in a considerably small time of identification. Although our tests in the biological matrix are preliminary, they showed satisfactory results for whole blood in EDTA which indicates the feasibility of performing LAMP reaction directly in clinical samples. As a future perspective for this study, we aim to apply LAMP in clinical samples collected from patients with invasive candidiasis.

References

1. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, et al. COVID-19-Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions?. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):211. Published 2020 Oct 8. doi:10.3390/jof6040211
3. Barantsevich N, Barantsevich E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(6):718. Published 2022 May 26. doi:10.3390/antibiotics11060718
4. Basile K, Halliday C, Kok J, Chen SC. Fungal Infections Other Than Invasive Aspergillosis in COVID-19 Patients. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(1):58. Published 2022 Jan 6. doi:10.3390/jof8010058
5. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18026. Published 2018 May 11. doi:10.1038/nrdp.2018.26
6. Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(7):877. Published 2022 Jun 30. doi:10.3390/antibiotics11070877
7. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol*. 2018;21(3):107-119. doi:10.1007/s10123-018-0014-1

8. Lim DH, Jee H, Moon KC, Lim CS, Jang WS. Development of a Simple DNA Extraction Method and *Candida* Pan Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Candidemia. *Pathogens*. 2022;11(2):111. Published 2022 Jan 18. doi:10.3390/pathogens11020111
9. Wang Y, Zhao X, Zhou Y, Lu J, Yu H, Li S. Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification coupled with nanoparticle-based lateral flow biosensor (LAMP-LFB) for visual and rapid diagnosis of *Candida albicans* in clinical samples. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:1025083. Published 2022 Nov 7. doi:10.3389/fbioe.2022.1025083
10. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
11. Yamamoto M, Alshahni MM, Tamura T, et al. Rapid Detection of *Candida auris* Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *J Clin Microbiol*. 2018;56(9):e00591-18. Published 2018 Aug 27. doi:10.1128/JCM.00591-18
12. Lin X, Jin X, Du W, et al. Quantitative and specific detection of viable pathogens on a portable microfluidic chip system by combining improved propidium monoazide (PMAxx) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Methods*. 2021;13(32):3569-3576. doi:10.1039/d1ay00953b
13. Rivoarilala LO, Victor J, Crucitti T, Collard JM. LAMP assays for the simple and rapid detection of clinically important urinary pathogens including the detection of resistance to 3rd generation cephalosporins. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1037. Published 2021 Oct 6. doi:10.1186/s12879-021-06720-5

14. Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2023;23(1):9-28. doi:10.1080/14737159.2023.2169071
15. Fallahi S, Babaei M, Rostami A, Mirahmadi H, Arab-Mazar Z, Sepahvand A. Diagnosis of *Candida albicans*: conventional diagnostic methods compared to the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Arch Microbiol.* 2020;202(2):275-282. doi:10.1007/s00203-019-01736-7
16. Trabasso P, Matsuzawa T, Fagnani R, et al. Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis sensu lato* and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. *Mycopathologia.* 2015;179(1-2):53-62. doi:10.1007/s11046-014-9830-9
17. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 2015;53(1):1-5. doi:10.1007/s12275-015-4656-9
18. Kasahara K, Ishikawa H, Sato S, Shimakawa Y, Watanabe K. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification assays to detect medically important yeasts in dairy products. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;357(2):208-216. doi:10.1111/1574-6968.12512
19. Singh UA, Kumari M, Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online.* 2018;20:12. Published 2018 Jun 1. doi:10.1186/s12575-018-0077-6

20. Zhou J, Liao Y, Li H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Trichosporon asahii* in experimental and clinical samples. *Biomed Res Int*. 2015;2015:732573. doi:10.1155/2015/732573
21. de Souza M, Matsuzawa T, Sakai K, et al. Comparison of DNA Microarray, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Real-Time PCR with DNA Sequencing for Identification of *Fusarium* spp. Obtained from Patients with Hematologic Malignancies. *Mycopathologia*. 2017;182(7-8):625-632. doi:10.1007/s11046-017-0129-5
22. Wang DD, Zheng MQ, Zhang N, An CL. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with chronic pulmonary diseases in the People's Republic of China. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:2079-2085. Published 2015 Sep 29. doi:10.2147/COPD.S89666
23. Xue T, Ma Z, Liu F, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization and its association with pulmonary diseases: a multicenter study based on a modified loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):70. Published 2020 Mar 20. doi:10.1186/s12890-020-1111-4
24. Zatti MDS, Arantes TD, Fernandes JAL, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification and nested PCR of the Internal Transcribed Spacer (ITS) for *Histoplasma capsulatum* detection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8):e0007692. Published 2019 Aug 26. doi:10.1371/journal.pntd.0007692
25. Chen M, Zhou J, Li J, et al. Evaluation of five conventional and molecular approaches for diagnosis of cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients. *Mycoses*. 2016;59(8):494-502. doi:10.1111/myc.12497

26. Turan C, Nanni IM, Brunelli A, Collina M. New rapid DNA extraction method with Chelex from *Venturia inaequalis* spores. *J Microbiol Methods*. 2015;115:139-143. doi:10.1016/j.mimet.2015.06.005

Table 1. LAMP primers used in this study.

<i>Candida species</i>	Primers	Source
<i>Candida albicans</i>	F3 TCTGGTATTCCGGAGGGC B3 AGTCCTACCTGATTTGAGGT FIP CTACCGTCTTTCAAGCAAACCCATGAGCGTCGTTTCTCCCT BIP TTGACAATGGCTTAGGTCTAACCAAAAGATATACGTGGTGGACGTTAC LB CTCAACACCAAACCCAGCGG	Kasahara et al., 2014 ¹⁸
	F3 GTTGGCAAAAATATCAATGGTAA B3 GTAAACTCAGAAGCTGGAAC FIP AGCTTGGAAGGCATCAATAATATCTATCGATGTTCTTTAGATTCTGGT BIP GACGGTCAAGGTCATACTTTCTATGAAATCTTGGCGTTGTTGTC LF TGAGCAACATCTTGTGAAGATAAGT LB TTAAGTATTGTCAAATCTCTGGAAT	Lin et al., 2021 ¹²
<i>Candida tropicalis</i>	F3 TTTGGTATTCCAAAGGGC B3 AGTCCTACCTGATTTGAGGT FIP CCTAGCGTATTGCTCAACACCAAATGCCTGTTTGAGCGTCA BIP ACGTGGAACCTATTTTAAGCGACTATAAATTGTGGTGGCCACTAG LF CCGGGGGTTTGAGGGAGAAA	Kasahara et al., 2014 ¹⁸
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	F3 TGGTAGTGAGTGATACTCGTT B3 CTTAAAGACGTCTGTCTGCC FIP GCAGATTAATAGAGAAGCTTGCCTGAGTTAACTTGAAATTGTAGGCC BIP GCGGCGGGGGTTAATACTGTCAAAAACACTCACTTATCCCT LF GGTTTTACCAACTCGGTGTTGATCT	Kasahara et al., 2014 ¹⁸
<i>Candida parapsilosis</i>	F3 TGATCTTTGTGGTACGGTAA B3 CATCACTGACAGCAAACG FIP ACCTCTCCTTGATTGCTTTAACATACATCTATCTCAATGACAAGCGA BIP CCAGAGCCAGAAGGAGAAGGCCACTTCCCATCTTTCTG LF CATAGCTCTTGAAGCTAGTGACGGG LB CCCAAGAATTACACCACAATTGTAC	Trabasso et al., 2014 ¹⁶
<i>Candida orthopsilosis</i>	F3 TTGTCGCTTCTGACAACT B3 TTGTTCCATCTTTGTACCTG FIP TGGCATTGGCAATATCACGGTAATCAGCCGTGTATTAAGGAC BIP ACGAGGATAAAGCATTGCAAAAAGCTTTATTTGCGTCTACTAAATTGAC LF ATCTTTTCAGCTATCCCA LB GAAACTGCGTATCAAAGGTC	Trabasso et al., 2014 ¹⁶
<i>Candida metapsilosis</i>	F3 CATTGAAAATCCCGCATTCA B3 CTTCCGTCAACTTTTTGCA FIP GGCTACGAATTTTCTTTACCTCCACATCCCAAACAAAGGAGCA BIP ACCTTATTGCCCGTGTATTGAAAGCCTTATCTTCATTAGCGTTG LF GAGACACCTTTGTTGTTAG LB CCGGAATAGCTGAAAAGATTCTG	Trabasso et al., 2014 ¹⁶

<i>Candida albicans</i>	---CGTTGAGCGYGTTCCTCCCTCAACCGCTGGGTTTGGTGTGAGCAATACGACTTGGG	57
<i>Candida albicans</i>	---ATTTGAGCGYGTTCCTCCCTCAACCGCTGGGTTTGGTGTGAGCAATACGACTTGGG	57
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	--CTAAGRCGTCAKTTCCTTCTCAACACGTTGTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCGTTT	58
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	CTTAAGRCGGTCAKTTCTTCTCAACACGTTGTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCGTTT	60
	* * * * * * * * * * * *	
<i>Candida albicans</i>	TT-----TGCTTGAAA-----GACGGTAGTGGTAAGGCG-----	86
<i>Candida albicans</i>	TT-----TGCTTGAAA-----GACGGTAGTGGTAAGGCG-----	86
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	TTGAGTTAACTTGAAATTGTAGGCCATATCAGTATGTGGGACACGAGCGCAAGCTTCTCT	118
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	TTGAGTTAACTTGAAATTGTAGGCCATATCAGTATGTGGGACACGAGCGCAAGCTTCTCT	120
	** * * * * * * * *	
<i>Candida albicans</i>	-----GGATCGCTTTGACAAATGGCTTAGGTCTAACC	119
<i>Candida albicans</i>	-----GGATCGCTTTGACAAATGGCTTAGGTCTAACC	119
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	ATTAATCTGCTGCTCGTTTGC	178
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	ATTAATCTGCTGCTCGTTTGC	180

<i>Candida albicans</i>	AAACATTGCTTGCGGCGGTAAACGTCCA-----CCACGTATAT	156
<i>Candida albicans</i>	AAACATTGCTTGCGGCGGTAAACGTCCA-----CCACGTATAT	156
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	CTCGGTGTTGATCTAGGGAGGGATATGTGAGTGTTTTGTGCGTGCTGGGMAGACAGACGT	238
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	CTCGGTGTTGATCTAGGRAGGRATAAGTGAGTGTTTTGTGCGTGCTGGGMAGACAGACGT	240
	* * * *	
<i>Candida albicans</i>	CTTCAAACCTTTGACCTCAAATCARAGTAGGACT	189
<i>Candida albicans</i>	CTTCAAACCTTTGACCTCAAATCAGRGTAGGACT	189
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	-CTTTAAGTTTGACCTCAAATCRGGWA-GRAC	269
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	-CTTTAAGTTTGACCTCAAATAGGKWA-GRAC	271
	* * * * * * * * *	

Figure 1. Sequence alignment.

Table 2. Specificity of the LAMP reaction in the identification of *Candida* species and *N. glabrata*.

Microorganism tested	LAMP result					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Nakaseomyces glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Candida metapsilosis</i>
<i>Candida albicans</i>	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>Candida tropicalis</i>	Negative	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	Negative
<i>Candida parapsilosis</i>	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative
<i>Candida orthopsilosis</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative
<i>Candida metapsilosis</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive
<i>Candida auris</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>Rodothorula</i> spp.	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 3. Sensitivity of LAMP in the identification of each *Candida* species and *Nakaseomyces glabrata* according to time of reaction.

<i>Candida</i> species	30 minutes	40 minutes	50 minutes
<i>Candida albicans</i>	90 % (18 / 20)	95 % (19 / 20)	NA
<i>Candida tropicalis</i>	0 % (0 / 20)	75 % (15 / 20)	85 % (17 / 20)
<i>Nakaseomyces glabrata</i>	0 % (0 / 20)	90 % (18 / 20)	100 % (20 / 20)
<i>Candida parapsilosis</i>	93,75 % (15 / 16)	93,75 % (15 / 16)	NA
<i>Candida orthopsilosis</i>	87,5 % (14 / 16)	93,75 % (15 / 16)	93,75 % (15 / 16)
<i>Candida metapsilosis</i>	100 % (2 / 2)	100 % (2 / 2)	100 % (2 / 2)

NA = not aplicable

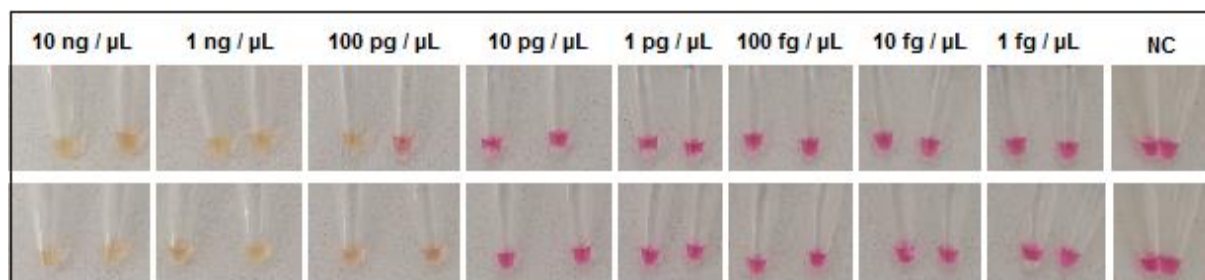


Figure 2. Lower limit detection of *Candida albicans* LAMP reaction.

Table 4. LAMP results for three different DNA isolation protocols of human blood and fungi samples inoculated in blood culture bottles and EDTA tubes.

Reaction Time (minutes) / Fungal Sample	Protocol 1						Protocol 2						Protocol 3					
	Blood Culture Bottle			EDTA Tube			Blood Culture Bottle			EDTA Tube			Blood Culture Bottle			EDTA Tube		
	30	40	50	30	40	50	30	40	50	30	40	50	30	40	50	30	40	50
1	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

+ positive LAMP reaction

- negative LAMP reaction

Table 5. Cost-effectiveness of LAMP.

	Commercial kit protocol	<i>In house protocol</i>
Number of reactions¹	1250	500
Cost (US\$)²	1,569.51	545.34
Cost (US\$) / reaction	1.26	1.09
Time (minutes) / reaction³	45.5	75
DNA isolation time (minutes)⁴	40	40
Complexity⁵	+	++

¹ Final volume of 10 uL² LAMP reagents and primers (2022)³ Total time of pipetting, reaction and visualization⁴ Chelex-100 5% boiling isolation protocol⁵ + very easy; ++ easy; +++ moderate; +++++ difficult

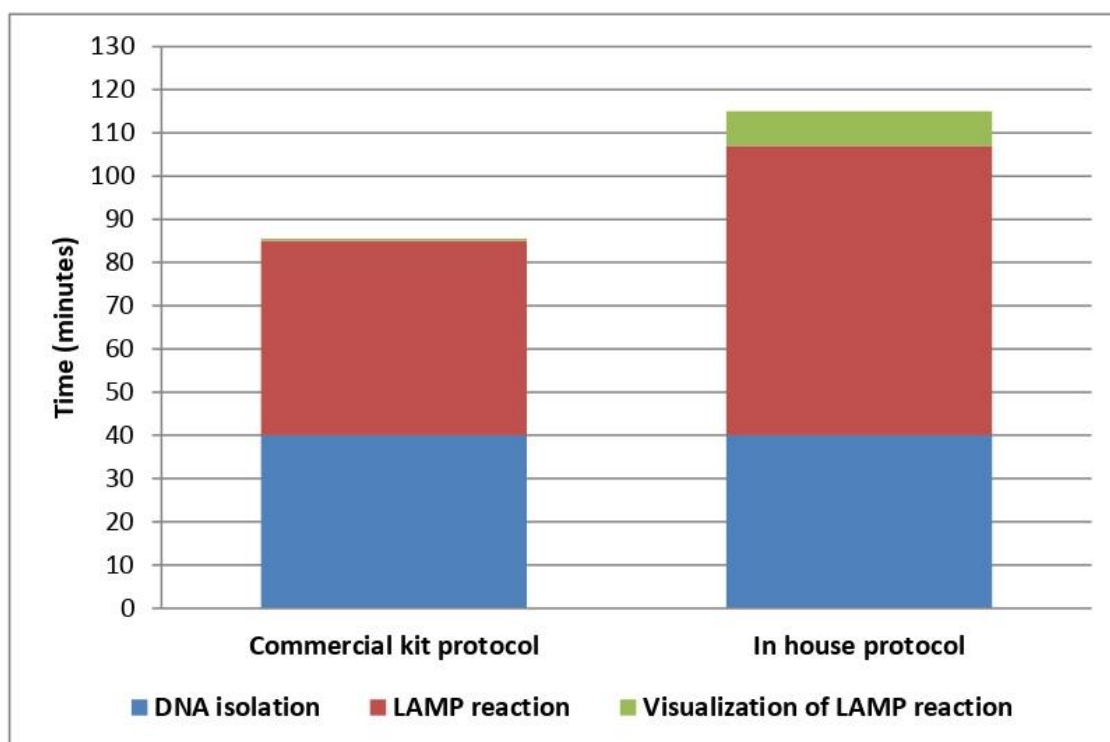


Figure 3. Time consumption of the commercial kit protocol and the *in house* protocol.

4 DISCUSSÃO

No final de 2022, a OMS³ emitiu um alerta em relação ao gênero *Candida*, classificando as espécies *C. albicans* e *C. auris* como “prioridade crítica” mundial graças à relevância das infecções provocadas por esses microrganismos. De fato, a CI representa um importante problema de saúde pública em todo o mundo. A espécie predominante nos achados laboratoriais é *C. albicans*; contudo, esse perfil tem se modificado, havendo um aumento na incidência de espécies não-*albicans*, como *C. parapsilosis*, e da *N. glabrata* (*C. glabrata*).^{7, 9} Essas espécies são menos suscetíveis e até resistentes ao tratamento convencional com fluconazol, levando a um pior prognóstico especialmente em pacientes imunocomprometidos. Dessa maneira, um resultado laboratorial rápido e preciso se torna essencial para garantir o diagnóstico precoce e a terapêutica adequada.

As metodologias tradicionais de isolamento e identificação de *Candida* spp., apesar de amplamente utilizadas, são demoradas e pouco sensíveis. Já os métodos moleculares e o MALDI-TOF MS apresentam ótimos resultados de sensibilidade e especificidade com um tempo menor de execução, porém necessitam de equipamentos de alto custo, inviabilizando sua ampla implementação. A fim de superar as limitações das metodologias disponíveis, a técnica de LAMP se mostra uma alternativa bastante promissora. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de utilização desta técnica na identificação das espécies mais prevalentes de *Candida* spp. e da *N. glabrata* (*C. glabrata*), analisando-a quanto a especificidade, sensibilidades analítica e diagnóstica e custo-efetividade.

Proposta por Notomi *et al.*¹⁷ (2000), a reação de LAMP ocorre em temperatura constante e permite obter ótimos resultados em pouco tempo com o auxílio de apenas um banho-maria convencional. A técnica vem sendo estudada e utilizada na micologia há alguns anos e se destaca pelo excelente desempenho. Estudos revelaram 100% de especificidade no diagnóstico a partir de isolados, e resultados de sensibilidade entre 63% e 100% para diversos fungos.^{14, 18, 29, 31 – 34}

Neste estudo, encontramos 100% de especificidade para as diferentes espécies de *Candida* testadas e para a *N. glabrata* (*C. glabrata*). Já os resultados

de sensibilidade diagnóstica variaram de acordo com o fungo e conforme o tempo de reação, ficando entre 75% e 100%. Uma vez que a maioria das espécies atingiu sua melhor sensibilidade em 40 minutos, determinamos este como o melhor tempo de reação. Isso corrobora resultados de Lin *et al.*¹⁹ (2021), que encontraram 40 minutos como melhor tempo de reação utilizando um kit comercial e o mesmo conjunto de primers para *C. albicans*. Além disso, Fallahi *et al.*²⁸ (2019) obtiveram o melhor tempo de reação em 45 minutos, apesar de terem utilizado uma técnica *in house* e outros primers.

A sensibilidade analítica, ou limite de detecção, da reação de LAMP foi de 100pg/μL. Esse resultado é maior ao encontrado por outros autores para diferentes gêneros de fungos.^{15, 28, 35, 36} Contudo, o nosso estudo é o primeiro a utilizar este protocolo com Chelex-100 para o isolamento do DNA e este kit comercial de LAMP. Ainda, não aplicamos nenhuma etapa de purificação da amostra prévia ao isolamento do material genético ou antes de realizar a reação de LAMP. Isso tudo pode justificar a diferença de resultados entre os estudos.

As reações de LAMP direto em matriz biológica atingiram resultados satisfatórios para as amostras de sangue em EDTA. Foram aplicados três diferentes protocolos de isolamento do DNA e concluiu-se que os protocolos em que se adicionaram etapas para melhor separação dos componentes do sangue conquistaram melhores resultados de sensibilidade e reprodutibilidade (protocolos 2 e 3). Apesar de as amostras testadas não mimetizarem completamente a situação real de uma CI, e de não ter sido avaliada a especificidade da reação nessas amostras, os resultados são bastante promissores e corroboram achados de outros autores.^{14, 15}

Através da análise de custo-efetividade percebeu-se que, apesar de a técnica *in house* ser mais barata, a reação de LAMP utilizando kit comercial possui mais vantagens. A primeira vantagem reside na facilidade de execução e no menor risco de erros, pois consiste na utilização de um único reagente que já permite a visualização do resultado final. Esta característica constitui, inclusive, outra vantagem: devido a grande quantidade de produto formado na reação, um dos problemas da técnica de LAMP é justamente a possibilidade de contaminação das amostras quando os tubos são abertos para a adição de algum reagente que

permita a visualização do resultado. A técnica *in house* testada exige esta etapa final de visualização do resultado através da adição do SYBER Green, o que pode levar aos problemas de contaminação. Finalmente, a terceira vantagem é o menor tempo de execução, pois, considerando a utilização do protocolo Chelex-100 para o isolamento de DNA, os resultados podem ser obtidos em cerca de uma hora e meia.

Para a maior parte dos isolados, os dados foram obtidos a partir de um número amostral considerado mínimo para validação de ensaios laboratoriais (20).³⁷ Dessa forma, os resultados corroboram o fato de que a técnica de LAMP é rápida, barata e eficaz para identificar espécies de *Candida* e a *N. glabrata* (*C. glabrata*) e sua implementação em laboratórios pequenos e que dispõem de poucos recursos, como muitos no Brasil, parece ser uma boa alternativa. Ainda, eles suportam a possibilidade de utilização da reação direto em amostras de sangue, o que diminui ainda mais o custo e o tempo de identificação do fungo.

5 CONCLUSÃO

A técnica de LAMP foi descrita em 2000 e sua utilização na microbiologia tem crescido nos últimos anos, principalmente desde a pandemia do Sars-Cov-2. Inclusive, laboratórios brasileiros já padronizaram seu uso para o diagnóstico da COVID-19 e de outras doenças infecciosas. Apesar disso, sua aplicação para o diagnóstico da CI ainda é pouco explorada.

As metodologias mais eficazes para a identificação das espécies de *Candida* e da *N. glabrata* (*C. glabrata*) exigem um investimento inicial com equipamentos que é alto e inalcançável para muitos laboratórios no Brasil. Dessa forma, apenas grandes laboratórios de centros especializados dispõem dessas tecnologias, atuando como apoio para outros menores. Contudo, essa logística que envolve o encaminhamento de amostras para outros locais dificulta e atrasa ainda mais o diagnóstico de uma infecção que é tão grave para muitos pacientes. A utilização da técnica de LAMP no diagnóstico da CI é bastante promissora, uma vez que o método é pouco custoso, de simples e rápida execução e apresenta ótimas sensibilidade e especificidade. Sua implementação em laboratórios menores que dispõem de poucos recursos é extremamente viável, uma vez que exige apenas um banho-maria convencional.

Além de contribuir para a área de diagnóstico, este trabalho possibilitou a implementação da técnica de LAMP no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Dessa forma, a metodologia está disponível para ser estudada em diversas áreas das biociências, em pesquisa e inovação. Finalmente, os resultados obtidos aqui indicam a possibilidade de aplicar a técnica de LAMP diretamente em amostras clínicas de sangue total. Dessa forma, pretende-se continuar o estudo a fim de padronizar uma metodologia que permita o diagnóstico da CI a partir dessas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Murray PR. Microbiologia Médica. 8ª Edição, 2017.
- 2 - Shishido AA, Mathew M, Baddley JW. Overview of COVID-19-Associated Invasive Fungal Infection. *Curr Fungal Infect Rep.* 2022;16(3):87-97. doi: 10.1007/s12281-022-00434-0. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35846240; PMCID: PMC9274633.
- 3 - WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 4 - Chen J, Hu N, Xu H, Liu Q, Yu X, Zhang Y, Huang Y, Tan J, Huang X, Zeng L. Molecular Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Virulence Evaluation of *Candida* Isolates Causing Invasive Infection in a Tertiary Care Teaching Hospital. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Sep 15;11:721439. doi: 10.3389/fcimb.2021.721439. PMID: 34604110; PMCID: PMC8479822.
- 5 - Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, Hoenigl M. COVID-19-Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions? *J Fungi (Basel).* 2020 Oct 8;6(4):211. doi: 10.3390/jof6040211. PMID: 33050019; PMCID: PMC7712987.
- 6 - Barantsevich N, Barantsevich E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. *Antibiotics (Basel).* 2022 May 26;11(6):718. doi: 10.3390/antibiotics11060718. PMID: 35740125; PMCID: PMC9219674.
- 7 - Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, Vigezzi C, Rodriguez E, Icely PA, Sotomayor CE. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics (Basel).* 2022 Jun 30;11(7):877. doi: 10.3390/antibiotics11070877. PMID: 35884131; PMCID: PMC9312041.
- 8 - Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, Clancy CJ, Wingard JR, Lockhart SR, Groll AH, Sorrell TC, Bassetti M, Akan H, Alexander BD, Andes D, Azoulay E, Bialek R, Bradsher RW, Bretagne S, Calandra T, Caliendo AM, Castagnola E, Cruciani M, Cuenca-Estrella M, Decker CF, Desai SR, Fisher B, Harrison T, Heussel CP, Jensen HE, Kibbler CC, Kontoyiannis DP, Kullberg BJ, Lagrou K, Lamothe F, Lehrnbecher T, Loeffler J, Lortholary O, Maertens J, Marchetti O, Marr KA, Masur H, Meis JF, Morrissey CO, Nucci M, Ostrosky-Zeichner L, Pagano L, Patterson TF, Perfect JR, Racil Z, Roilides E, Ruhnke M, Prokop CS, Shoham S, Slavin MA, Stevens DA, Thompson GR, Vazquez JA, Viscoli C, Walsh TJ, Warris A, Wheat LJ, White PL, Zaoutis TE, Pappas PG. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect*

Dis. 2020 Sep 12;71(6):1367-1376. doi: 10.1093/cid/ciz1008. PMID: 31802125; PMCID: PMC7486838.

9 - Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. Nat Rev Dis Primers. 2018 May 11;4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26. PMID: 29749387.

10 - Basile K, Halliday C, Kok J, Chen SC. Fungal Infections Other Than Invasive Aspergillosis in COVID-19 Patients. J Fungi (Basel). 2022 Jan 6;8(1):58. doi: 10.3390/jof8010058. PMID: 35049999; PMCID: PMC8779574.

11 - Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. 1. ed. Guanabara Koogan; 2004.

12 - Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. Int Microbiol. 2018 Sep;21(3):107-119. doi: 10.1007/s10123-018-0014-1. Epub 2018 Jul 6. PMID: 30810955.

13 - Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. J Clin Microbiol. 2018 Apr 25;56(5):e01909-17. doi: 10.1128/JCM.01909-17. PMID: 29444828; PMCID: PMC5925725.

14 - Lim DH, Jee H, Moon KC, Lim CS, Jang WS. Development of a Simple DNA Extraction Method and *Candida* Pan Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Candidemia. Pathogens. 2022 Jan 18;11(2):111. doi: 10.3390/pathogens11020111. PMID: 35215055; PMCID: PMC8878442.

15 - Wang Y, Zhao X, Zhou Y, Lu J, Yu H, Li S. Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification coupled with nanoparticle-based lateral flow biosensor (LAMP-LFB) for visual and rapid diagnosis of *Candida albicans* in clinical samples. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Nov 7;10:1025083. doi: 10.3389/fbioe.2022.1025083. PMID: 36420441; PMCID: PMC9676452.

16 - Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):665-70. doi: 10.1128/JCM.01602-10. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21106797; PMCID: PMC3043518.

17 - Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63. PMID: 10871386; PMCID: PMC102748.

18 - Yamamoto M, Alshahni MM, Tamura T, Satoh K, Iguchi S, Kikuchi K, Mimaki M, Makimura K. Rapid Detection of *Candida auris* Based on Loop-Mediated

Isothermal Amplification (LAMP). *J Clin Microbiol*. 2018 Aug 27;56(9):e00591-18. doi: 10.1128/JCM.00591-18. PMID: 29950329; PMCID: PMC6113467.

19 - Lin X, Jin X, Du W, Shan X, Huang Q, Fu R, Lv W, Yang H, Su Y, Huang G. Quantitative and specific detection of viable pathogens on a portable microfluidic chip system by combining improved propidium monoazide (PMAxx) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Methods*. 2021 Aug 28;13(32):3569-3576. doi: 10.1039/d1ay00953b. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34286728.

20 - Rivoarilala LO, Victor J, Crucitti T, Collard JM. LAMP assays for the simple and rapid detection of clinically important urinary pathogens including the detection of resistance to 3rd generation cephalosporins. *BMC Infect Dis*. 2021 Oct 6;21(1):1037. doi: 10.1186/s12879-021-06720-5. PMID: 34615472; PMCID: PMC8495977.

21 - Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2023 Jan;23(1):9-28. doi: 10.1080/14737159.2023.2169071. Epub 2023 Mar 1. PMID: 36695788.

22 - Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 2015 Jan;53(1):1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9. Epub 2015 Jan 4. PMID: 25557475.

23 - Loop-mediated Isothermal Amplification. New England Biolabs [Internet]. Disponível em: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp>

24 - Rostami A, Karanis P, Fallahi S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection*. 2018 Jun;46(3):303-315. doi: 10.1007/s15010-017-1111-3. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29330674.

25 - WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA). New England Biolabs [Internet]. Disponível em: <https://international.neb.com/products/m1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-rna#Product%20Information>

26 – Detection methods. Eiken GENOME SITE [Internet]. Disponível em: <https://loopamp.eiken.co.jp/en/lamp/0208.html>

27 - Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Ohori A, Kamei K, Franco M, Miyaji M, Nishimura K. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 May 1;234(1):93-7. doi: 10.1016/j.femsle.2004.03.015. PMID: 15109725.

28 - Fallahi S, Babaei M, Rostami A, Mirahmadi H, Arab-Mazar Z, Sepahvand A. Diagnosis of *Candida albicans*: conventional diagnostic methods compared to the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Arch Microbiol*. 2020

Mar;202(2):275-282. doi: 10.1007/s00203-019-01736-7. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31641798.

29 - Trabasso P, Matsuzawa T, Fagnani R, Muraosa Y, Tominaga K, Resende MR, Kamei K, Mikami Y, Schreiber AZ, Moretti ML. Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. *Mycopathologia*. 2015 Feb;179(1-2):53-62. doi: 10.1007/s11046-014-9830-9. Epub 2014 Dec 7. PMID: 25481844.

30 - Maldonado I, Cataldi S, Garbasz C, Relloso S, Striebeck P, Guelfand L, López Moral L; Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (RMCABA), Argentina; Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires:. Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS [Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS]. *Rev Iberoam Micol*. 2018 Jul-Sep;35(3):151-154. Spanish. doi: 10.1016/j.riam.2018.02.002. Epub 2018 Aug 3. PMID: 30078526.

31 - Zhou J, Liao Y, Li H, Lu X, Han X, Tian Y, Chen S, Yang R. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Trichosporon asahii* in experimental and clinical samples. *Biomed Res Int*. 2015;2015:732573. doi: 10.1155/2015/732573. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25692144; PMCID: PMC4322298.

32 - de Souza M, Matsuzawa T, Sakai K, Muraosa Y, Lyra L, Busso-Lopes AF, Levin ASS, Schreiber AZ, Mikami Y, Gonoï T, Kamei K, Moretti ML, Trabasso P. Comparison of DNA Microarray, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Real-Time PCR with DNA Sequencing for Identification of *Fusarium* spp. Obtained from Patients with Hematologic Malignancies. *Mycopathologia*. 2017 Aug;182(7-8):625-632. doi: 10.1007/s11046-017-0129-5. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28324245.

33 - Wang DD, Zheng MQ, Zhang N, An CL. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with chronic pulmonary diseases in the People's Republic of China. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Sep 29;10:2079-85. doi: 10.2147/COPD.S89666. PMID: 26491278; PMCID: PMC4598221.

34 - Xue T, Ma Z, Liu F, Du W, He L, Wang J, An C. *Pneumocystis jirovecii* colonization and its association with pulmonary diseases: a multicenter study based on a modified loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Pulm Med*. 2020 Mar 20;20(1):70. doi: 10.1186/s12890-020-1111-4. PMID: 32197601; PMCID: PMC7085144.

35 - Zatti, M. D. S., Arantes, T. D., Fernandes, J. A. L., Bay, M. B., Milan, E. P., Naliato, G. F. S., & Theodoro, R. C. (2019). Loop-mediated Isothermal Amplification and nested PCR of the Internal Transcribed Spacer (ITS) for

Histoplasma capsulatum detection. PLoS neglected tropical diseases, 13(8), e0007692. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007692>

36 - Chen M, Zhou J, Li J, Li M, Sun J, Fang WJ, Al-Hatmi AM, Xu J, Boekhout T, Liao WQ, Pan WH. Evaluation of five conventional and molecular approaches for diagnosis of cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients. *Mycoses*. 2016 Aug;59(8):494-502. doi: 10.1111/myc.12497. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27061343.

37 - Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Brasília. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria e Defesa Agropecuária; 2011. 227 p.

ANEXO A – Registro do Projeto de Pesquisa



Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Pesquisa

ATESTADO DE REGISTRO DE PROJETO DE PESQUISA

Atestamos que o projeto de pesquisa intitulado 'Validação da técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por LOOP (LAMP) em isolados de *Candida* spp.' foi registrado na Comissão de Pesquisa da UFCSPA com o número 030/2021, sob responsabilidade de Vanessa Suñé Mattevi, na forma como foi documentado neste processo 23103.204170/2021-41 até a emissão deste atestado.

O início deste projeto foi marcado em 01 de abril de 2021 e o seu término está previsto para 30 de março de 2023.

Salientamos que este registro não autoriza o pesquisador a coletar ou analisar dados oriundos de sujeitos de pesquisa. Salientamos também que este registro não garante a concessão de recursos financeiros por parte da UFCSPA a este projeto de pesquisa.

Comissão de Pesquisa (ComPesq)
UFCSPA



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Meyrer da Silveira, Assistente em Administração**, em 13/05/2021, às 12:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufcspa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1176380** e o código CRC **269C450E**.

ANEXO B – Currículo Lattes

26/06/2023 13:25

Currículo Lattes

Imprimir
currículo**Amanda Herter**Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/1902947232930124>

Última atualização do currículo em 26/06/2023

Resumo informado pelo autor

Biomedica pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), experiência em Patologia Clínica, Micologia Médica e Imunologia Celular. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biociências na UFCSPA.
(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Amanda Herter

Dados pessoais

Nascimento 19/05/1995 - Feliz/RS - Brasil

CPF 024.767.600-48

Formação acadêmica/titulação

- 2021** Mestrado em BIOCIÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Validação da Técnica de Amplificação Isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em isolados de Candida spp.
Orientador: Vanessa Suñé Mattevi
Co-orientador: Helena Schirmer
- 2020** Especialização em Análises Clínicas.
UNYLEYA EDITORA E CURSOS S/A, Unyleya, Brasília, Brasil
- 2016 - 2019** Graduação em Biomedicina.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Análise do Perfil de Suscetibilidade de Isolados Clínicos de Candida spp. ao Fluconazol em Amostras Vaginais de Pacientes de Moçambique
Orientador: Helena Schirmer
- 2010 - 2014** Ensino Médio (2o grau) .
Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, SALZANO, Novo Hamburgo, Brasil, Ano de obtenção: 2014

Formação complementar

- 2022 - 2022** Curso de curta duração em Micologia, (Carga horária: 60h).
Núcleo de Aprimoramento Científico, NACIENTIFICO, Brasil
- 2022 - 2022** Workshop PCR em Tempo Real Sem Segredo, (Carga horária: 4h).
Universo da Biologia Molecular, UBIOMOL, Brasil
- 2021 - 2021** Curso de curta duração em ENCONTRO BRCAST - SUBCOMITÊ ANTIFÚNGICOS. (Carga horária: 4h).
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, SBPC/ML, Rio De Janeiro, Brasil
- 2021 - 2021** Workshop Divulgatório de Comunicação e Divulgação Científica... (Carga horária: 6h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2017 - 2017** Extensão universitária em Curso de Imunohematologia - Teórico-Prático - Módulo Básico. (Carga horária: 12h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2017 - 2017** Extensão universitária em Talks in Clinical Lab. (Carga horária: 4h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em 1º Hands On de Circulação Extracorpórea do Hospital São Francisco. (Carga horária: 6h).
Irmãdade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ISCMPA, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo
institucional

- 2018 - 2019** Vínculo: Liga de Infectologia e MT, Enquadramento funcional: Ligante/Diretora científica, Regime: Parcial
- 2018 - 2018** Vínculo: Monitora, Enquadramento funcional: Monitora de Patologia, Carga horária: 10, Regime: Parcial
- 2018 - 2018** Vínculo: Monitora, Enquadramento funcional: Monitora de Bioquímica I, Carga horária: 10, Regime: Parcial

26/06/2023 13:25

Currículo Lattes

2017 - 2018 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica Voluntária, Regime: Parcial
Outras informações:
Participação no projeto "Avaliação imunobiológica de nanopartículas poliméricas contendo epítipo SIEFARL do Herpes Simplex Virus", executando atividades de produção de nanopartículas, cultivo celular e ensaio imunoenzimático para a quantificação de citocinas.

2017 - 2017 Vínculo: Monitora , Enquadramento funcional: Monitora de Citologia , Carga horária: 10, Regime: Parcial
2. Policlínica Militar de Porto Alegre - PMPA

Vínculo
institucional

2019 - 2019 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio Curricular em Patologia Clínica , Carga horária: 30, Regime: Parcial

3. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Vínculo
institucional

2022 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Laboratório de Imunologia de Transplantes

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 26/06/2023 às 13:19:11.