

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**



Izadora Clezar da Silva Vasconcellos

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS EM PACIENTE COM
MICOSE INVASIVA**

UFCSPA
**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2021**

Izadora Clezar da Silva Vasconcellos

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PACIENTES COM MICOSE INVASIVA

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

Orientador: Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto
Co-orientadora: Dra. Odelta dos Santos Allende

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Vasconcellos , Izadora Clezar da Silva
Identificação de fungos filamentosos em paciente com
micose invasiva / Izadora Clezar da Silva Vasconcellos .
-- 2021.
34 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Patologia, 2021.

Orientador(a): Prof. Dr. Alessandro Pasqualotto ;
coorientador(a): Prof. Dra. Odelta Allende.

1. Fungos Filamentosos . 2. Biologia Molecular . 3.
Sequenciamento. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Ao meu orientador, Alessandro Comarú Pasqualotto pela oportunidade de participar no grupo de pesquisa, confiança e apoio na elaboração deste trabalho.

À equipe técnica do Laboratório de Micologia da ISCMPA, gostaria de agradecer profundamente por me acolherem de última hora para a busca das amostras; vocês foram essenciais para a construção desse trabalho.

À equipe técnica do Laboratório de Biologia Molecular da ISCMPA, Odelta dos Santos Allende, Tatiane Jacobsen da Rocha, Maikel Reck Kortmann que nunca mediram esforços para me auxiliar e aconselhar durante a execução do projeto.

As minhas colegas e amigas, Cássia Ferreira Braz Caurio e Daiane Flores Dalla Lana, companheiras de pós-graduação, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Ao meu amigo, Juliano de Oliveira Silveira, pelo apoio e auxílio na análise dos resultados, obrigada pela oportunidade de trabalhar contigo.

A minha grande amiga, colega de longa data, Débora Buzatto de Souza por tudo que construímos ao longo dessa jornada.

Aos meus familiares e meu namorado, pelo amor, incentivo, força e apoio incondicional.

Resumo da Dissertação

Introdução: Nas últimas décadas, as doenças fúngicas cresceram em importância na prática clínica, principalmente em pacientes imunocomprometidos. O principal desafio é a identificação laboratorial, que em geral é baseada apenas em metodologias clássicas que, apesar de permitirem caracterização bioquímica e morfológica, não possibilitam a diferenciação acurada entre as espécies. Tal limitação dificulta o conhecimento da patogenia e da epidemiologia das micoses. Nos últimos anos as metodologias de diagnóstico molecular auxiliam o método convencional e desempenham um trabalho significativo na identificação de espécies, o que é importante para o conhecimento da epidemiologia destas doenças. **Objetivos:** Identificar fungos do gênero *Aspergillus* em nível de espécie através do sequenciamento de DNA. **Material e Métodos:** Amostras provenientes do Laboratório de Micologia da Santa Casa de Porto Alegre, previamente identificadas por métodos clássicos como positivas para *Aspergillus* spp. foram submetidas à extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento. O resultado do sequenciamento foi alinhado e comparado com o banco de sequências BlastN. **Resultados:** Dezesesseis amostras foram analisadas no período de seis meses, as quais foram identificadas corretamente quando comparadas com a identificação do laboratório de micologia, mas nenhuma espécie críptica foi identificada, provavelmente pelo baixo número de amostras incluídas no estudo. **Conclusão:** Apesar de nenhuma espécie críptica ter sido encontrada, é importante reforçar a relevância da identificação a nível de espécie para conhecimento epidemiológico e melhor manejo do paciente.

Palavras-chave: *Aspergillus*; Espécies Crípticas; Biologia Molecular; Sequenciamento de DNA

Abstract

Introduction: In recent decades, fungal diseases have grown in importance in clinical practice, especially in immunocompromised patients. The main challenge in laboratory identification is that most techniques are based only on classical methodologies which, despite providing biochemical and morphological analyses, these do not allow for the identification of fungi at the species level. Such limitation compromises the knowledge about the pathogeny and epidemiology of mycoses. In recent years, molecular diagnostic support the conventional method and play a significant role in species identification, which is important for the knowledge of local epidemiology. **Aim of study:** To identify fungi belonging to the *Aspergillus* genus at the species level through fungal DNA sequencing. **Material and Methods:** Samples from the Mycology Laboratory of Santa Casa de Porto Alegre, previously identified by classical methods as positive for *Aspergillus*, were submitted to DNA extraction, amplification, purification and sequencing. The sequencing result was aligned and compared with the BlastN sequence database. **Results:** Sixteen samples were analysed within a period of six months, all of which were correctly identified when compared to the identification of the mycology laboratory, but no cryptic species was likely identified by the low number of samples included in the study. **Conclusion:** Although no cryptic *Aspergillus* species was found, it is important to reinforce the relevance of fungal identification at the species level for epidemiological knowledge and better patient management.

Keywords: *Aspergillus*; Cryptic Species; Molecular biology; DNA sequencing

Lista de abreviaturas

AI: Aspergilose Invasiva

BenA: β -tubulina

CaM: Calmodulina

DNA: ácido desoxirribonucleico

FILPOP: estudo de base populacional para avaliar resistência de fungos filamentosos na Espanha

ITS: Região espaçadora transcrita interna

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RPB2: Segunda maior subunidade da polimerase II

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1. Aspergilose Invasiva.....	9
1.2 Espécies Crípticas.....	11
1.3 Diagnóstico	11
1.4 Diagnóstico Molecular.....	12
1.5 Tratamento	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	13
3. OBJETIVOS.....	18
4. METODOLOGIA.	18
5. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	21
6. CONCLUSÕES.....	26
7. ANEXOS	27
7.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA.....	27
7.2 Parecer do Comitê de Ética da ISCMPA	30
7.3 Artigo científico	35

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Aspergilose Invasiva

A Aspergilose Invasiva (AI) é o agente mais frequente de infecção por fungos filamentosos em pacientes imunocomprometidos. A principal fonte de aquisição da infecção é a via aérea, por meio da inalação dos conídios que, ao invadirem os pulmões, conseguem resistir aos mecanismos de defesa, bem como à fagocitose pelas células polimorfonucleares. A AI é causada por fungos do gênero *Aspergillus*¹, fungos descritos pela primeira vez em 1729 por P. A. Micheli; o gênero pertence à família *Trichocomaceae* e foi estabelecido para acomodar um fungo predominantemente assexuado que produz uma cadeia de conídios no centro da sua estrutura². As espécies de *Aspergillus* são encontradas no solo e no ar. Os conídios de *Aspergillus* são inalados diariamente por humanos, mas, no sistema imune de indivíduos saudáveis, eles são eliminados sem causar qualquer dano³.

A. fumigatus é uma das espécies mais presentes no ambiente hospitalar e responsável por 90% das aspergiloses em humanos¹. Além dele, existem outros patógenos deste gênero, como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans*^{2,4,5}. Comumente associado com paciente em tratamento para leucemia, transplante de medula óssea ou transplantados de órgãos sólidos, mortalidade da AI é muito elevada (40-50%) e está relacionada a situação imunológica do paciente e com as limitações diagnósticas ou terapêuticas existentes^{6,7}.

AI afeta mais comumente pacientes com malignidades hematológicas, especialmente durante períodos prolongados de neutropenia, transplantes de medula óssea, transplantes de órgãos sólidos (especialmente pulmão), terapia com corticosteróides, doença pulmonar obstrutiva crônica, cirrose e câncer em órgãos sólidos^{8,9}. Alguns estudos já descrevem um aumento de AI em pacientes não-neutropênicos, indivíduos admitidos em unidades de tratamentos intensivos (UTI), os quais não apresentam quadros clássicos de imunossupressão.

A AI costuma começar com o comprometimento do trato respiratório inferior, mas pode atingir também outros locais como seios paranasais e pele, e

o agravamento da doença está normalmente associado ao estado imunológico do paciente ¹⁰⁻¹². Outras espécies além de *Aspergillus fumigatus* também podem causar doenças graves. *A. flavus* é um dos principais patógenos associados a aspergilose brônquica alérgica humana, sendo também um importante produtor de micotoxinas. *A. niger* é uma espécie considerada de baixa virulência, como um invasor secundário em casos de otite externa bacteriana e que depende de hospedeiro com a imunidade extremamente comprometida para causar uma doença mais grave. *A. terreus* é associado com AI, podendo também causar infecções como a bola fúngica; e o *A. nidulans* é associado aos casos de doenças granulomatosas crônicas ¹⁰.

Considerando as diversas espécies de *Aspergillus* que causam doenças em humanos, e o fato de que a identificação em nível de espécie requer uso de métodos moleculares / microscopia eletrônica, o gênero foi dividido em seções, visando agrupar as espécies clinicamente mais relevantes e que apresentem similaridade morfológica; as principais seções de *Aspergillus* são Fumigati, Flavi, Terrei e Nigri ^{10,13}.

Considerando as identificações tradicionais, dentro da seção Flavi, existem seis espécies clinicamente mais relevantes, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamaritii*. Apesar de serem semelhantes na sua morfologia, elas são divididas em dois grupos baseados no impacto nos alimentos e na saúde humana pela produção de aflotoxinas ¹⁴. A morfologia do *A. flavus* é conhecida como um aveludado que varia das cores amarelo, verde e marrom ¹⁵.

Aspergillus terreus é um saprófito que pertence à seção Terrei, uma espécie economicamente significativa por ter um metabolito secundário que pode ser usado como droga antihipocolesterolêmica e clinicamente importante pois pode causar infecções tanto superficiais como invasivas ¹⁶. Membros dessa seção aparecem, na sua grande maioria com colônias, em tons de laranja e marrom, que é a característica predominante para a diferenciação, mas microscopicamente os conidióforos são longos, colunares e hialinos ^{16,17}.

Os *Aspergillus* pretos têm ampla distribuição na natureza, tanto como contaminantes de alimentos, mas também utilizados para fins industriais, como para a produção de enzimas ^{18,19}. Dentre as espécies do *Aspergillus* seção nigri, está o *A. niger*, o agente mais frequente na otomicose, que é considerada

umas das principais causas de doenças pulmonares. *Aspergillus* pretos são o grupo mais difícil de identificação, por isso a identificação molecular a nível de espécie tem se tornado o padrão ouro. A morfologia do *Aspergillus* seção *nigri* é caracterizada por colônia negras, ornamentadas por conídios com 6 mm de diâmetro¹⁸⁻²⁰.

1.2 Espécies Crípticas

Historicamente, o *Aspergillus* costuma ser identificado em laboratório por métodos convencionais, como morfologia de colônia e características microscópicas. No entanto, há um consenso de que as características morfológicas podem não ser confiáveis para distinguir entre as espécies de *Aspergillus*²¹. Atualmente existem mais de 300 espécies de *Aspergillus* descritas; muitas delas consideradas crípticas, ou seja, não são reveladas de modo óbvio por métodos fenotípicos de identificação de espécie. O gênero *Aspergillus* é dividido em oito subgêneros que, por sua vez, são subdivididos em várias seções que incluem uma grande variedade de espécies intimamente relacionadas^{22,23}. As seções clinicamente mais relevantes são *Fumigati*, *Flavi*, *Terrei*, *Usti*, *Nigri* e *Nidulantes*. Estudos moleculares revelaram numerosas espécies crípticas dentro das diferentes seções do gênero *Aspergillus*¹³. As espécies crípticas representam aproximadamente 15% do total das espécies de *Aspergillus*, das quais 40% são resistentes a pelo menos uma classe de agentes antifúngicos²⁴. Na ausência de métodos moleculares, podemos apenas identificar estes fungos em nível de seção, podendo haver considerável erro na tentativa de identificar as espécies somente por métodos clássicos. Desta maneira, a identificação a nível de espécie e o teste de susceptibilidade se torna muito importante para o adequado manejo do paciente²⁴. A identificação através de métodos moleculares tornou-se padrão-ouro para definir a identidade dos *Aspergillus*, tendo sido observado em dois estudos que pelo menos uma amostra críptica foi identificada erroneamente através dos métodos clássicos, quando utilizados de modo isolados^{24,25}.

1.3 Diagnóstico

A identificação de *Aspergillus* em nível de espécie é essencial para a avaliação e para a condução das infecções fúngicas. A identificação dos fungos

é realizada, em grande parte, dos laboratórios clínicos, considerando-se apenas aspectos macroscópios e microscópios ²⁶. Trata-se de uma abordagem subjetiva na qual, na maioria das vezes, a identificação das espécies não é alcançada pois eles são morfologicamente muito semelhantes, se não indistinguíveis, o que dificulta a identificação acurada ².

A identificação pelo exame microscópico direto é importante por ser rápido em identificar se existe algum fungo ou outro microrganismo presente, e pode servir de guia para utilizar outro teste de identificação caso esse não seja suficiente ^{27,28}. A cultura se torna mais relevante pela possibilidade de identificar as espécies e permitir a realização do teste de susceptibilidade. O meio mais básico utilizado em laboratório de micologia é o ágar Sabouraud dextrose, que tem antibiótico junto ao meio, o que evita a contaminação de bactérias, auxiliando no crescimento do fungo isolado, melhorando a precisão da identificação das colônias. Essa identificação avalia cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo ².

Testes que têm a sensibilidade para detectar componentes circulantes do *Aspergillus* também podem ser um método de diagnóstico. Alguns exemplos são a detecção do antígeno da Galactomanana, o teste da β -D-Glucana e teste de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que é capaz de detectar o DNA do *Aspergillus* através de uma replicação *in vitro*. Por não dependerem de cultivo fúngico, não é necessário esperar a colônia crescer, acrescentando sensibilidade ao diagnóstico ^{29,30}.

1.4 Diagnóstico Molecular

Os avanços nas ferramentas genômicas e moleculares proporcionaram melhores condições para a classificação de todos os microrganismos, incluindo as espécies de fungos. Após a aplicação de novas ferramentas moleculares em estudos taxonômicos do gênero *Aspergillus*, muitas novas espécies foram descritas nas últimas décadas¹³. O uso do diagnóstico molecular para realizar a identificação de fungos em nível de espécie possibilita realizar o diagnóstico logo que o fungo cresce na cultura, ou até de amostras clínicas ². A PCR, apesar da alta sensibilidade, tem a desvantagem poder haver reação cruzada com outras espécies de semelhança genética, como *Penicillium spp* ³¹. Para

realizar a PCR são utilizados *primers* que amplificam regiões conservadas, sendo o complexo ribossomal de DNA o mais comum ^{8,32}. A PCR requer muitos cuidados técnicos e deve ser validada com muito cuidado, evitando contaminações e inibidores ¹.

O sequenciamento de DNA é outra metodologia de diagnóstico fúngico que consegue realizar a identificação a nível de espécie. A região genômica sequenciada mais utilizada para triagem é a ITS (região espaçadora transcrita interna), pois não é tão específica e consegue diferenciar os fungos apenas em seções^{33,34}. Existem outros três marcadores que podem ser utilizados para então diferenciar os fungos em nível de espécie; Calmodulina (CaM), β -tubulina(BenA) ou a segunda maior subunidade da polimerase II (RPB2), porém esta última não é tão fácil de amplificar, ficando normalmente como última opção ^{5,33,34}

1.5 Tratamento

O maior desafio para o tratamento da AI reside nos pacientes imunocomprometidos, por isso é necessário um tratamento eficaz com a introdução de potentes antifúngicos como voriconazol que é o mais indicados nos *guidelines*, juntamente do acompanhamento sorológico ^{35,36}. A Anfotericina B também se demonstra eficaz e parece ter uma atividade comparável com a dos triazóis ³, mas é medicamento alternativo, devido à sua alta taxa de toxicidade ³⁷. A resistência antifúngica também é um desafio para determinar o tratamento do paciente. No estudo FILPOP foi visto que a resistência é incomum entre espécies mais frequentes, mas a resistência a azólicos semostra presente nas amostras crípticas de *Aspergillus*²⁴. Antes de decidir o tratamento do paciente é necessário avaliá-los com cautela, considerando o grau de imunossupressão e as doenças de base. A identificação correta e o teste de susceptibilidade são de extrema importância, considerando que as espécies crípticas representam 40% da resistência antifúngica ²⁴.

Referências Bibliográficas

1. Lass-Flörl C. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2019;57:S155-S160. doi:10.1093/mmy/myy103

2. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(2):1-17. doi:10.1101/cshperspect.a019786
3. Lestrade PPA, Meis JF, Melchers WJG, Verweij PE. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):799-806. doi:10.1016/j.cmi.2018.11.027
4. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310-350. doi:10.1128/cmr.12.2.310
5. Rudramurthy SM, Paul RA, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. Invasive aspergillosis by *aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. *J Fungi*. 2019;5(3):1-23. doi:10.3390/jof5030055
6. Ruiz-Camps I, Jarque I. Enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos en pacientes hematológicos. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(4):249-254. doi:10.1016/j.riam.2014.06.002
7. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(4):213-218. doi:10.1016/j.riam.2014.07.003
8. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(10):609-622. doi:10.1016/S1473-3099(05)70238-3
9. Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: Complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:i39-i47. doi:10.1093/jac/dkx032
10. Pasqualotto AC. *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*.; 2010. doi:10.1007/978-90-481-2408-4
11. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, et al. ¿Qué hace que *Aspergillus fumigatus* sea un patógeno de éxito? Genes y moléculas involucrados en la aspergilosis invasora. *Rev Iberoam Micol*.

- 2010;27(4):155-182. doi:10.1016/j.riam.2010.10.003
12. Ader F, Nseir S, Le Berre R, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in chronic obstructive pulmonary disease: An emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(6):427-429. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01143.x
 13. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: Recommendations for routine daily practice. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1273(1):18-24. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06822.x
 14. Godet M, Munaut F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi: RESEARCH LETTER. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;304(2):157-168. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x
 15. Cary JW, Gilbert MK, Lebar MD, Majumdar R, Calvo AM. *Aspergillus flavus* Secondary Metabolites: More than Just Aflatoxins. *Food Saf.* 2018;6(1):7-32. doi:10.14252/foodsafetyfscj.2017024
 16. Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. *Med Mycol.* 2009;47(SUPPL. 1):42-46. doi:10.1080/13693780802562092
 17. Risslegger B, Zoran T, Lackner M, et al. A prospective international *Aspergillus terreus* survey: an EFISG, ISHAM and ECMM joint study. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(10):776.e1-776.e5. doi:10.1016/j.cmi.2017.04.012
 18. Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, et al. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud Mycol.* 2011;69:1-17. doi:10.3114/sim.2011.69.01
 19. D'hooge E, Becker P, Stubbe D, Normand AC, Piarroux R, Hendrickx M. Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy? *Med Mycol.* 2019;57(6):773-780. doi:10.1093/mmy/myy124
 20. Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabañes F. Taxonomy and significance of black aspergilli. [Taxonomía y significado de los aspergillus negros]. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2004;86(1):33-49. <https://bit.ly/2BIG3GM>

21. Samson RA, Varga J, Witiak SM, Geiser DM. The species concept in *Aspergillus*: Recommendations of an international panel. *Stud Mycol.* 2007;59:71-73. doi:10.3114/sim.2007.59.09
22. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4514-4517. doi:10.1128/AAC.00585-09
23. Balajee SA, Marr KA. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. *Future Microbiol.* 2006;1:435-445. doi:10.2217/17460913.1.4.435
24. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3380-3387. doi:10.1128/AAC.00383-13
25. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3138-3141. doi:10.1128/JCM.01070-09
26. Rokas A. *Aspergillus*. *Curr Biol.* 2013;23(5):R187-R188. doi:10.1016/j.cub.2013.01.021
27. Arendrup MC, Bille J, Dannaoui E, Ruhnke M, Heussel CP, Kibbler C. ECIL-3 classical diagnostic procedures for the diagnosis of invasive fungal diseases in patients with leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(8):1030-1045. doi:10.1038/bmt.2011.246
28. Chen XM, Hu TW, Lin Z. The rise and decline of the Cooperative Medical System in rural China. *Int J Heal Serv.* 1993;23(4):731-742. doi:10.2190/F8PB-HGJH-FHA8-6KH9
29. Gavronski S, Karini T, Botelho R, Mauricio C, Cordova M De. Diagnóstico laboratorial de aspergilose invasiva: avaliação de métodos moleculares e detecção de antígenos Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: review of molecular methods and. *Rev Bras Análises Clínicas.*

- 2016;48(2):96-109.
30. García J, Pemán J. Microbiological diagnosis of invasive mycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(4):179-185. doi:10.1016/j.riam.2018.05.003
 31. Moura S, Cerqueira L, Almeida A. Invasive pulmonary aspergillosis: current diagnostic methodologies and a new molecular approach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(8):1393-1403. doi:10.1007/s10096-018-3251-5
 32. Negri CE, Gonçalves SS, Xafranski H, et al. Cryptic and Rare *Aspergillus* species in Brazil: Prevalence in clinical samples and in Vitro susceptibility to Triazoles. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3633-3640. doi:10.1128/JCM.01582-14
 33. Kocsubé S, Varga J. Targeting conserved genes in *Aspergillus* species. *Methods Mol Biol.* 2017;1542:131-140. doi:10.1007/978-1-4939-6707-0_7
 34. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78(1):141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
 35. Solano C, Vázquez L. Invasive aspergillosis in the patient with oncohematologic disease. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(4):198-205. doi:10.1016/j.riam.2018.10.001
 36. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:e1-e38. doi:10.1016/j.cmi.2018.01.002
 37. Olson JA, Schwartz JA, Hahka D, et al. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. *Med Mycol.* 2015;53(2):107-118. doi:10.1093/mmy/myu070

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar fungos do gênero *Aspergillus* em nível de espécie através do sequenciamento de DNA, com amostras provenientes do Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

3.2 Objetivos Específicos – Metas

- a) Empregar a metodologia de extração e amplificação de DNA com maior qualidade e rendimento para os diferentes materiais clínicos ou biológicos.
- b) Aplicar a técnica de sequenciamento de DNA para diferenciar os fungos filamentosos em espécies.
- c) Implantar a técnica de sequenciamento de DNA na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre como ferramenta principal para o diagnóstico laboratorial de fungos filamentosos.

4. METODOLOGIA

4.1 Amostras

As amostras foram obtidas de pacientes que realizaram examemicológico e apresentaram resultado positivo para fungo filamentoso na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre de junho a dezembro de 2019. Parte da cultura do fungo foi retirada e colocada em Eppendorf de 1,5 ml de *Nuclease Free Water* e congelada em freezer a -80°C até a extração do ácido nucleico.

4.2 Exame micológico

O exame micológico foi realizado no Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, seguindo os protocolos já padronizados. Todos os materiais foram inoculados em tubos e incubados por até 16 dias, para materiais estéreis (biópsias, fragmentos, líquidos de sítios estéreis, licor, etc.) em meio Sabouraud a 25°C e BHI a 35°C. Para os não estéreis (incluindo lavado brônquico, lavado broncoalveolar, escarro e amostras de pele), foi inoculado em Sabouraud com Cloranfenicol a 25°C e 35°C. Na suspeita de *Aspergillus*, foi feito inoculado extra em Sabouraud com cloranfenicol a 40°C.

4.3 Extração de DNA

Amostras de fungos foram extraídas com Maxwell® 16 Blood Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. O volume de fungos utilizados para extração foi de 300 µL e o volume de eluição foi de 200 µL.

4.4 PCR

Os primers de amplificação de DNA β -tubulina foram adquiridos da Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Brasil) e as regiões foram delimitadas pelas sequências dos primers β -tubulina *forward* (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e *reverse* (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC), conforme descrito por Glass e Donaldson em 1953. A Mix de PCR foi otimizada para concentração 1X de tampão, 2 µM de MgCl₂, 0,5 µM de dNTPs, 0,5 µM de iniciadores, 0,25 µM de Taq polimerase suplementando com água livre de nuclease para um volume final de 20 µL para a adição de 5 µL de DNA.

Amplificação por PCR foi realizada em um PCR System Thermocycler (Applied Biosystems) e as condições de termociclagem para a PCR convencional foram: 1 ciclo de 5 min a 94°C; seguido por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 55°C e 2 min a 72°C; e um ciclo final de 5 min a 72°C.

O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 1,5% e fotografado em sistema de documentação de gel e o tamanho do produto da PCR foi visualizado com auxílio do marcador de peso molecular (Ladder). Todos os amplicons que tiveram amplificação no tamanho de ~500 pares de base foram purificados usando ExoSAP-IT (Applied Biosystems) e enviados para sequenciamento de metodologia Sanger, em uma empresa terceirizada.

4.5 Análise

O resultado do sequenciamento foi alinhado pelo ClustalW no software MegaX, e os contigs foram usados para pesquisar no BlastN a sequência mais semelhante e as espécies crípticas.

5. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

“A search for cryptic *Aspergillus* species in the South of Brazil”

Izadora Clezar da Silva Vasconcellos, Juliano de Oliveira Silveira, Cecília B.
Severo, Odelta dos Santos Allende, Alessandro C. Pasqualotto

Aceito para publicação na Revista “Revista Iberoamericana de Micología”

A search for cryptic *Aspergillus* species in the South of Brazil**Búsqueda de especies crípticas de *Aspergillus* en el Sur de Brasil****Abstract**

Background: The frequency and relevance of cryptic *Aspergillus* species have been increasingly recognised, and the identification of such species require the use of fungal DNA sequencing. Objectives: Identify species of *Aspergillus* by sequencing the β -tubulin gene in search of cryptic *Aspergillus* species. Methodology: Clinical culture isolates of *Aspergillus* were characterized at the species level, in an attempt to identify cryptic species. Conclusion: Even though no cryptic species were found, here we reinforce the importance of using molecular methods to better understand the epidemiology of fungal infections in tertiary hospitals.

Key words: *Aspergillus*; cryptic species; molecular biology; DNA sequencing.

Resumen

Background: La frecuencia y relevancia de las especies crípticas de *Aspergillus* se han reconocido cada vez más, y la identificación de tales especies requiere el uso de secuenciación de DNA fúngico. Objetivos: Identificar especies de *Aspergillus* secuenciando el gen de la β -tubulin para identificar especies crípticas de *Aspergillus*. Metodología: Se caracterizaron aislamientos de cultivo clínico de *Aspergillus* a nivel de especie, en un intento por identificar especies crípticas. Conclusión: Aunque no se encontraron especies crípticas, aquí se refuerza la importancia de utilizar métodos moleculares para comprender mejor la epidemiología de las infecciones fúngicas en los hospitales terciarios.

Palabras clave: *Aspergillus*; especies crípticas; Biología Molecular; secuenciación.

Cryptic *Aspergillus* species have become more relevant in clinical practice, with many demonstrating increased resistance to first-line antifungal agents [1]. Mycologists used to rely on morphological characteristics to identify fungi at the species level, but in the last decade proper identification of moulds has required molecular analysis of fungal DNA [8]. Such methodologies are not yet widely used in developing countries such as Brazil. Therefore, the aim of the study was to identify species of *Aspergillus* by sequencing the β -tubulin gene to identify cryptic *Aspergillus* species among clinical *Aspergillus* isolates.

Aspergillus isolates were obtained from cultures of clinical samples of patients attending Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre for any medical reason between Jun-Dec 2019. Fungal DNA was extracted from pure cultures using Maxwell® 16 Blood Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Brazil), β -tubulin gene was amplified using the following primers, purchased from Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Brazil): 5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3' (forward) and 5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3' (reverse), as previously described [2]. The amplification products were analyzed on 1.5% agarose gels. Amplicons were purified using ExoSAP-IT (Applied Biosystems) and sent for DNA Sanger sequencing. Sequencing results were aligned by ClustalW in the MegaX software, and the contigs were used for BlastN with NCBI database in search of the most similar sequence using parameters of percentage of identity >99% and E. Value 0.0.

Throughout six months, twenty samples of *Aspergillus* have been included in the study, some isolates had to be excluded: four revealed many unresolved bases that impaired proper assemble of the contigs, and three samples produced very short readings (2-15 nucleotides). Of the 13 samples identified, *A. fumigatus* represented 69.2% of the cases (GenBank accession number: MW478809, MW478810, MW478811, MW478813, MW478814, MW478815, MW478818, MW478819) and *A. niger* 30.7% (GenBank accession number: MW464654, MW478816, MW478817, MW478820)

Molecular identification has become the cornerstone for the accurate characterization of moulds at the species level. Despite that, such technologies are frequently not accessible for the routine clinical mycology laboratory. Only

two studies have evaluated the frequency of cryptic species in hospital settings in Brazil, one evaluating large culture collections have found that cryptic species represented 19% (25/133) of the samples, and 90% of this cryptic species showed susceptibility to the 3 triazoles tested [4]. A study evaluating the epidemiology of *Aspergillus* in patients with Cystic Fibrosis found 96% (51/53) of *A. fumigatus sensu stricto*, but no cryptic species were identified [6]. Multinational studies show that the prevalence of *Aspergillus* are around 10- 15% [5]. Studies describing cryptic species of *Aspergillus* used a large collection time or involved multiple centres, which resulted in a large number of samples [9,5]. Some studies recommend the use of more targets for the identification of cryptic species of *Aspergillus*, such as ITS, considered a universal target for filamentous fungi, and Calmodulin (CaM), which is a more specific marker β -tubulin, and the combination of at least two of these markers demonstrate better performance in the identification of cryptic species [7,3]. This is the first study to evaluate *Aspergillus* cultures from South of Brazil using fungal DNA sequencing. Cryptic *Aspergillus* species were not found, which is probably related to the small sample size.

In conclusion, characterization of fungal genes such as β -tubulin can allow for the proper identification of the *Aspergillus* at the species level. Hospitals should test their own culture collection to determine the frequency of cryptic species in the *Aspergillus* genus, as well as in other medically important fungi, particularly in the presence of antifungal resistance.

References

1. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*. 2015; 179: 3-4:
2. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61:1323-30.
3. Imbert, S., Normand, A. C., Gabriel, F., Cassaing, S., Bonnal, C., Costa, D. et al. (2019). Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF. *Medical Mycology*. doi:10.1093/mmy/myz004

4. Negri CE, Gonçalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PT et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 3633-40.
5. Risslegger B, Zoran T, Lackner M, Aigner M, Sánchez-Reus F, Rezusta A et al. A prospective international *Aspergillus terreus* survey: an EFISG, ISHAM and ECMM joint study. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23: 776.e1-776.e5.
6. Sabino R, Ferreira JA, Moss RB, Valente J, Veríssimo C, Carolino E et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2015; 14: 474-81.
7. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2014; 78: 141–173
8. Won EJ, Shin JH, Kim SH, Choi MJ, Byun SA, Kim MN et al. Antifungal susceptibilities to amphotericin B, triazoles and echinocandins of 77 clinical isolates of cryptic *Aspergillus* species in multicenter surveillance in Korea. *Med Mycol*. 2018; 56: 501-505.
9. Zoran T, Sartori B, Sappl L, Aigner M, Sánchez-Reus F, Rezusta A et al. Azole-Resistance in *Aspergillus terreus* and Related Species: An Emerging Problem or a Rare Phenomenon? *Front Microbiol*. 2018;9: 1-9.

6. CONCLUSÕES

As infecções fúngicas invasivas são importantes causas de morbidade e mortalidade, afetando primordialmente pacientes imunossuprimidos. A identificação desses fungos em nível de espécie é fundamental para conduzir a terapia antifúngica apropriada, considerando que espécies crípticas normalmente são resistentes. Métodos micológicos clássicos, todavia, não são ferramentas capazes de caracterizar em nível de espécie a maioria dos fungos filamentosos. O sequenciamento de DNA tem se mostrado muito eficaz tanto na rotina laboratorial com na pesquisa, pois através da análise de regiões conservadoras é possível realizar a identificação dos fungos a nível de espécie.

Apesar de não ter encontrado nenhuma espécie críptica no nosso estudo, que provavelmente foi consequência do pequeno número de amostras, foi possível realizar a identificação dos fungos corretamente, o que nos traz uma alternativa para quando se tem uma esporulação lenta, ou, sobreposição de colônias. Além disso, o aprimoramento do diagnóstico de fungos filamentosos pode trazer uma melhor compreensão das espécies crípticas. É importante que os laboratórios estudem os seus bancos de amostras, para conhecimento da epidemiologia e para auxiliar a traçar um diagnóstico correto para o paciente, como também dos fatores prognósticos, o que contribuirá para uma melhor sobrevida do paciente.

7. Anexos

7.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE 												
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP												
Elaborado pela Instituição Coparticipante												
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Identificação de fungos filamentosos em pacientes com micoses invasivas. Pesquisador: ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO Área Temática: Versão: 3 CAAE: 04687318.5.3002.5345 Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 3.334.919 Apresentação do Projeto: Trata-se da carta resposta ao parecer 3.196.557. Objetivo da Pesquisa: "Identificar as espécies de fungos (do tipo filamentosos) em pacientes com micoses invasivas e comparar os aspectos laboratoriais e clínicos da doença com as espécies identificadas." Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não se aplica. Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Não se aplica. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foi apresentado o novo TCLE com as adequações solicitadas. Recomendações: Recomenda-se ajuste no cronograma na Plataforma Brasil. Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há. Considerações Finais a critério do CEP: De acordo com o parecer do Relator.												
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 40%;">Endereço: Rua Sarmiento Leite 245</td> <td style="width: 20%;"></td> <td style="width: 40%;">CEP: 90.050-170</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Sarmiento</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: RS</td> <td>Município: PORTO ALEGRE</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (51)3303-8804</td> <td></td> <td>E-mail: cep@ufcspa.edu.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Sarmiento Leite 245		CEP: 90.050-170	Bairro: Sarmiento			UF: RS	Município: PORTO ALEGRE		Telefone: (51)3303-8804		E-mail: cep@ufcspa.edu.br
Endereço: Rua Sarmiento Leite 245		CEP: 90.050-170										
Bairro: Sarmiento												
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE											
Telefone: (51)3303-8804		E-mail: cep@ufcspa.edu.br										

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 3.334.919

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1283600.pdf	02/05/2019 14:42:46		Acelto
Outros	pendenciaufcspa.pdf	02/05/2019 14:41:45	Odeita dos Santos Allende	Acelto
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclee.pdf	02/05/2019 14:41:09	Odeita dos Santos Allende	Acelto
Outros	chefiafungos.pdf	17/12/2018 09:13:58	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoizadora.pdf	16/12/2018 11:48:59	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclehcpa.pdf	16/12/2018 11:44:39	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	anuencia.pdf	21/11/2018 11:05:30	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	relatorio.pdf	21/11/2018 11:02:48	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	CADASTRO.pdf	21/11/2018 10:47:14	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	ONUS.pdf	21/11/2018 10:46:51	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	BIOLOGICO.pdf	21/11/2018 10:46:26	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	PUBLICACAO.pdf	21/11/2018 10:44:59	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	CONFIDENCIALIDADE.pdf	21/11/2018 10:44:27	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	INSCRICAO.pdf	21/11/2018 10:43:44	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245
 Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3303-6804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.334.919

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 20 de Maio de 2019

Assinado por:

Luciane Dalozanale Moussalle
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51) 3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

7.2 Parecer do Comitê de Ética da ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA 																
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP																
DADOS DA EMENDA Título da Pesquisa: Identificação de fungos filamentosos em pacientes com micoses invasivas. Pesquisador: ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO Área Temática: Versão: 2 CAAE: 04687318.5.0000.5335 Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 3.625.590 Apresentação do Projeto: Nas últimas décadas, as doenças fúngicas cresceram em importância na prática clínica, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Durante décadas, a <i>Candida albicans</i> foi a principal causa de mortalidade através da micose invasiva, sendo esta a candidíase invasiva. Nos dias de hoje, os principais agentes etiológicos da MI são <i>Aspergillus</i>, <i>Mucorales</i>, <i>Fusarium</i>, entre outros. Foram observados em pacientes com doenças hematológicas malignas que desenvolveram MI, as espécies mais prevalentes são <i>Aspergillus</i>, seguido de <i>Fusarium</i> sp, <i>Zigomicetos</i>, <i>Curcularia</i> e <i>Trichoderma</i> sendo sua taxa de mortalidade de 41,9%. O principal desafio nesse estudo foi a identificação laboratorial, que foi baseada apenas em metodologias clássicas, não sendo possível a diferenciação entre as espécies. Essa diferenciação é de extrema importância pois alguns estudos genômicos mostram que isolados com a genética distinta, mas características morfológicas parecidas, podem apresentar graus de virulência diferentes. O diagnóstico laboratorial dessas micoses é baseado em metodologias clássicas, sendo visto características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas, o que dificulta o conhecimento da patogenia e epidemiologia. Nos últimos anos as metodologias de diagnóstico molecular auxiliam o método convencional e desempenham um trabalho significativo na identificação de espécies. Entre as metodologias, o sequenciamento de nova geração tem uma enorme qualidade de dados de sequenciamento de DNA e uma aplicabilidade na identificação de fungos. No Brasil, o sequenciamento de DNA para identificação fúngica não é rotina em laboratórios, pela falta de																
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="4">Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Bairro: 6º andar - Centro</td> <td colspan="2">CEP: 90.020-090</td> </tr> <tr> <td>UF: RS</td> <td>Município: PORTO ALEGRE</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (51)3214-6871</td> <td>Fax: (51)3214-6871</td> <td colspan="2">E-mail: cep@santacasa.lchs.br</td> </tr> </table>	Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer				Bairro: 6º andar - Centro		CEP: 90.020-090		UF: RS	Município: PORTO ALEGRE			Telefone: (51)3214-6871	Fax: (51)3214-6871	E-mail: cep@santacasa.lchs.br	
Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer																
Bairro: 6º andar - Centro		CEP: 90.020-090														
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE															
Telefone: (51)3214-6871	Fax: (51)3214-6871	E-mail: cep@santacasa.lchs.br														

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Formulário 3.026.000

profissionais para realização dos testes e também por questões financeiras. Nosso projeto tem como objetivo desenvolver uma técnica de identificação de fungos filamentosos causadores de micose invasiva.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver uma técnica de identificação de fungos filamentosos causadores de micose invasiva em uma coorte prospectiva, através do sequenciamento de DNA, com amostras de fungos provenientes do Laboratório de Micologia da ISCMPA.

Objetivo Secundário:

- a) Otimizar a extração de ácidos nucleicos: estabelecer a metodologia de extração de DNA com maior qualidade e rendimento para os diferentes materiais clínicos ou biológicos;
- b) Otimizar a técnica de sequenciamento de DNA para diferenciar os fungos filamentosos em espécies.
- c) Capacitar os funcionários da ISCMPA e alunos de iniciação científica e pós-graduação da UFCSPA para identificação de fungos filamentosos por sequenciamento de DNA;
- d) Implantar a técnica de sequenciamento de DNA na ISCMPA como ferramenta principal para o diagnóstico laboratorial de fungos filamentosos;
- e) Disponibilizar o diagnóstico molecular desses fungos para a comunidade atendida pelos hospitais do estudo, incluindo pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde; f) Fortalecer a aproximação entre a UFCSPA e o Laboratório de Biologia Molecular da ISCMPA, empresa que presta importantes serviços ao SUS;
- g) Redigir relatório de pesquisa e avaliar o estudo para reestabelecer novas metas e as perspectivas do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para pesquisa são mínimos sendo relacionados as coletas de exames solicitadas pelos médicos do paciente.

Benefícios: A presente proposta trata de um projeto de pesquisa a ser realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Porto Alegre (ISCMPA) e o Laboratório de Micologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). O principal objetivo da proposta é a identificação das espécies de fungos filamentosos que são os principais causadores de micose invasiva em um grande hospital, utilizando ferramentas de biologia molecular. As infecções

Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-0571 Fax: (51)3214-0571 E-mail: cep@santacasa.iscma.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 3.625.590

fúngicas invasivas são importantes causas de morbidade e mortalidade, afetando primordialmente pacientes imunossuprimidos. A identificação desses fungos em nível de espécie é fundamental para conduzir a terapia antifúngica apropriada. Métodos micológicos clássicos, todavia, não são ferramentas capazes de caracterizar em nível de espécie a maioria dos fungos filamentosos. Além disso, atualmente, a patogenia e a Epidemiologia dessas micoses emergentes são pouco conhecidas. Será realizada, portanto, um estudo de coorte prospectivo envolvendo amostra. O diagnóstico laboratorial desses fungos será realizado por sequenciamento de DNA. O desenvolvimento do projeto contribuirá para a consolidação dessas técnicas para identificar fungos filamentosos na ISCMPA. Trata-se de uma instituição modelo em saúde no estado do Rio Grande do Sul, mas que, até o presente momento, não conta com tal metodologia para identificar fungos filamentosos. Assim, além do seu caráter científico intrínseco, a proposta apresenta relevância para a saúde pública ao disponibilizar um diagnóstico laboratorial mais preciso para doenças fúngicas graves.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se justifica na medida em que pretende a identificação de fungos em nível de espécie, o que é fundamental para conduzir a terapia antifúngica apropriada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

A pesquisa encontra-se de acordo com a Norma vigente Resolução 466/12 para pesquisa em seres humanos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação das alterações efetuadas no estudo acima descrito, o presente Comitê não encontrou óbices quanto à implementação das mesmas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_143694_3_E1.pdf	01/10/2019 10:47:13		Aceito
Outros	CARTA.pdf	01/10/2019	Odeita dos Santos	Aceito

Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@isntacasa.ischa.br

**IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA**



Continuação do Parecer: 3.625.590

Outros	CARTA.pdf	10:40:33	Alende	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JUSTIFICATIVA_TCLE.pdf	01/10/2019 10:39:12	Odella dos Santos Alende	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	PROJETO.pdf	01/10/2019 10:32:47	Odella dos Santos Alende	Acelto
Outros	chefiafungos.pdf	17/12/2018 09:13:58	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	anuencia.pdf	21/11/2018 11:05:30	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	relatorio.pdf	21/11/2018 11:02:48	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	CADASTRO.pdf	21/11/2018 10:47:14	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	ONUS.pdf	21/11/2018 10:46:51	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	PUBLICACAO.pdf	21/11/2018 10:44:59	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	CONFIDENCIALIDADE.pdf	21/11/2018 10:44:27	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Outros	INSCRICAO.pdf	21/11/2018 10:43:44	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Orçamento	orcamento.pdf	21/11/2018 10:40:18	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto
Folha de Rosto	20181121.pdf	21/11/2018 10:27:06	ALESSANDRO COMARU PASQUALOTTO	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@isntacasa.iscma.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Processo: 3.025.590

PORTO ALEGRE, 07 de Outubro de 2019

Assinado por:
Carlos Eugênio Santiago Escobar
(Coordenador(a))

Endereço: R. Profª Anna Dias, 295 Hosp Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@iscmpa.ischa.br

7.3 Artigo científico

G Model
RIAM-608; No. of Pages 2

ARTICLE IN PRESS

Rev Iberoam Micol. xxx (xxxx) xxx–xxx





Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol

Letter to the Editor

A search for cryptic *Aspergillus* species in South Brazil

Búsqueda de especies crípticas de *Aspergillus* en el sur de Brasil

Dear Editor,

Cryptic *Aspergillus* species have become more relevant in clinical practice due to their increased resistance to first-line antifungal agents.¹ Mycologists used to rely on morphological characteristics to identify fungi at the species level, but in the last decade molecular analyses of DNA have been used for achieving a correct identification.² Such methodologies are not yet widely used in developing countries such as Brazil. Therefore, several clinical isolates belonging to *Aspergillus* genus were identified by sequencing the β -tubulin gene in order to find cryptic *Aspergillus* species.

Aspergillus isolates were obtained from cultures of clinical samples of patients attending Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre for any medical reason between June and December 2019. Fungal DNA was extracted from pure cultures using Maxwell® 16 Blood Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Brazil), and β -tubulin gene was amplified using, as previously described,² the following primers, purchased from Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Brazil): GGTAACCAATCGGTGCTGCTTC (forward) and ACCCTCAGTGTAGTGACCTTGCC (reverse). The amplification products were analyzed in 1.5% agarose gels. Amplicons were purified using ExoSAP-IT (Applied Biosystems) and sent for DNA Sanger sequencing. Sequencing results were aligned by ClustalW in the MegaX software, and the contigs were used for BlastN with NCBI database in search of the most similar sequence using parameters of percentage of identity >99% and E-value of 0.0.

Throughout six months, twenty isolates of *Aspergillus* were included in the study, but some had to be excluded due to the molecular results: four had many unresolved bases that impaired the proper assembly of the contigs, and very short readings (2–15 nucleotides) were obtained from the other three. Of the 13 isolates identified, *Aspergillus fumigatus* represented 69.2% of

cryptic isolates showing susceptibility to the three triazoles tested.⁴ A study evaluating the epidemiology of *Aspergillus* in patients with cystic fibrosis found that 96% (51/53) of the isolates recovered were *A. fumigatus sensu stricto*, but no cryptic species were identified.⁵ Multinational studies show that the prevalence of *Aspergillus* is around 10–15%.³ Studies describing cryptic species of *Aspergillus* spent a long time for collecting the isolates or recruiting multiple centres, which resulted in a large number of strains.^{3,6} Some studies recommend the use of more targets to identify cryptic species of *Aspergillus*, such as ITS, considered a universal target for filamentous fungi, and calmodulin (CaM), which is a more specific marker, as β -tubulin, and the combination of at least two of these markers shows better performance in the identification of cryptic species.^{3,7} This is the first study to evaluate *Aspergillus* cultures from South Brazil using fungal DNA sequencing. Cryptic *Aspergillus* species were not found, which is probably related to the small sample size.

In conclusion, the characterization of fungal genes, such as β -tubulin, allow the proper identification of the *Aspergillus* at the species level. Hospitals should check their own culture collection to determine the frequency of cryptic species in the *Aspergillus* genus, as well as within other medically important fungal species complexes, particularly if antifungal resistance is already described.

Funding

None to declare.

References

- Alastruoy-Inquiere A, Alcazar-Fuoli L, Cuernca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*. 2015;179:3–4.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:1323–30.
- Inbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaing S, Bonnal C, Costa D, et al. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2018;56:1–10.
- Alastruoy-Inquiere A, Alcazar-Fuoli L, Cuernca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*. 2015;179:3–4.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:1323–30.
- Inbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaing S, Bonnal C, Costa D, et al. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2018;56:1–10.