



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE MICOSES
SISTÊMICAS UTILIZANDO HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE
(FISH).**

ROBERTO MOREIRA DA SILVA JUNIOR



**MANAUS
2015**

ROBERTO MOREIRA DA SILVA JUNIOR

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE MICOSES
SISTÊMICAS UTILIZANDO HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do título de *Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador: **Dr. João Vicente Braga de Souza**

**MANAUS
2015**

Ficha Catalográfica

S586d Silva Junior, Roberto Moreira da.
Detecção e identificação de fungos causadores de micoses sistêmicas utilizando hibridização in situ fluorescente (FISH)./Roberto Moreira da Silva Junior. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical, 2015.
ix, 71f. : il.

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas – UEA/FMT, 2015.

Orientador:Dr. João Vicente Braga de Souza

1.Candida2. *Cryptococcus*3. Histoplasma4. FISHI. Título.

CDU: 579.8(043)

FOLHA DE JULGAMENTO

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE MICOSES SISTÊMICAS UTILIZANDO HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

ROBERTO MOREIRA DA SILVA JUNIOR

“Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infeciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira

Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra

Prof^ª. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Prof^ª. Dra. Ani Beatriz Jackisch-Matsuura

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza, pela orientação e demonstração de confiança em nossa capacidade de concluir este trabalho.

Ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia (INPA), especialmente João Ricardo, Ana Claudia, Daiana, Joyce Matsuda, Luciana, Débora Raysa e Ralyvan Araujo.

Ao Laboratório de Micologia da Fundação de Medicina Tropical, em particular Dra. Kátia Cruz, Dra. Carla Silvana, Telma Maria e Maria Antenieta.

Às instituições sem as quais não seria possível a realização do curso de doutorado: UEA, FMT-HVD, FAPEAM, CAPES e CNPq.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) tem demonstrado ser uma ferramenta adequada para a detecção e identificação de patógenos. O objetivo da presente tese foi desenvolver e avaliar a FISH para detecção e identificação de fungos causadores de micoses sistêmicas. Especificamente objetivou-se: a) desenvolver sondas de hibridização para detecção de *Histoplasma capsulatum* por FISH e b) avaliar a FISH na detecção de fungos em hemocultura e fluido cefalorraquidiano de pacientes com suspeitas de micoses invasivas. Para tanto, foi realizado um estudo prospectivo e transversal de desenvolvimento e avaliação de ferramenta de diagnóstico (FISH). Como resultados, quanto ao desenvolvimento e validação da sonda de FISH para detecção de *H. capsulatum* foi observado que todas as três cepas de referência de *H. capsulatum* analisadas e isolados clínicos mostraram sinais positivos com as recém-concebidas sondas de oligonucleotídeos específicos, enquanto que, foram observadas reações negativas para todas as três espécies de leveduras não alvas e as duas bactérias não alvas. O ensaio também foi aplicado com sucesso para detecções de células *H. capsulatum* em amostras de hemocultura pré-incubadas de pacientes com suspeita clínica de histoplasmose (n = 33). Quanto a avaliação a FISH na detecção de fungos em hemocultura e fluido cefalorraquidiano de pacientes com suspeitas de micoses invasivas, observou-se que sensibilidade de FISH para infecções fúngicas em CSF provou ser ligeiramente melhor do que o de microscopia convencional (nanquim), nas condições experimentais, detectando 48 (em vez de 46) infecções em 112 amostras. Os poderes discriminatórios de microbiologia tradicional, PCR-RFLP e FISH para micoses invasivas na corrente sanguínea foram equivalentes, no entanto, os tempos médios para o diagnóstico após a detecção do crescimento microbiano por sistemas automatizados de hemocultura foram de 5 horas, 20 horas e 6 dias para FISH, PCR-RFLP e microbiologia tradicional, respectivamente.

Palavras Chaves: *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, FISH, fungemia.

ABSTRACT

Fluorescent in situ hybridization (FISH) has been shown to be an adequate tool for the detection and identification of pathogens. The aim of this thesis was to develop and evaluate the FISH for detection and identification of fungi causing systemic mycoses. Specifically aimed to: a) develop hybridization probes for the detection of *Histoplasma*. b) evaluate the detection of fungi in blood cultures and cerebrospinal fluid of patients with suspected invasive mycoses. Therefore, we performed a prospective cross-sectional study of development and evaluation of diagnostic tool (FISH). As a result, the development and validation of FISH probe for detection of *H. capsulatum* was observed that all three reference strains of *H. capsulatum* and clinical isolates examined showed positive signals with newly designed probes specific primers, while negative responses for all three species of yeast and non-target both non-target bacteria were observed. The test was also successfully applied to cells detections *H. capsulatum* in pre-incubated blood culture samples from patients with clinical suspicion of histoplasmosis (n = 33). As the evaluation FISH detection of fungi in blood cultures and cerebrospinal fluid of patients with suspected invasive mycoses, it was observed that FISH sensitivity for fungal infections in CSF proved to be slightly better than the conventional light microscopy (ink) in the experimental conditions, detecting (48 instead of 46) in 112 samples infections. The discriminatory power of traditional microbiology, FISH and PCR-RFLP for fungal invasive mycoses in the blood were similar, however, the average time for diagnosis after the detection of microbial growth by automated blood culture systems were 5 hours, 20 hours and 6 days for FISH, PCR-RFLP and traditional microbiology, respectively.

Keywords: *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, FISH, fungemia.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

- 1- FISH- Hibridização in situ fluorescente
- 2- CSF- Fluido Cérebro Espinhal
- 3- PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
- 4- AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- 5- HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
- 6- CO₂- Dióxido de Carbono
- 7- RFLP- Análise de polimorfismo de fragmento de restrição
- 8- RNA- Ribonucleotídeo
- 9- DNA- Desoxirribonucleotídeo
- 10- RNA_r- Ribonucleotídeo Ribossômico
- 11- FMT-HVD- Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Douado
- 12- DNA_r- Desoxirribonucleotídeo Ribossômico
- 13- INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- 14- ATCC- American Type Culture Collection
- 15- CNS- Conselho Nacional de Saúde
- 16- TRIS HCL - tris(hidroximetil)aminometano ácido clorídrico
- 17- pH- Potencial Hidrogeniônico
- 18- KCl- Cloreto de Potássio
- 19- MgCl- Cloreto de Magnésio
- 20- mM- Milimolar
- 21- μM- Micromolar
- 22- nM- Nanomolar
- 23- dNTP- Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
- 24- U- Unidade
- 25- Cy3- Fluorocromo Vermelho
- 26- HCA1- Sonda *Histoplasma capsulatum* 1
- 27- HCA2- Sonda *Histoplasma capsulatum* 2
- 28- DAPI- 4',6-diamidino-2-fenilindol
- 29- PBS- Tampão Fosfato Salino
- 30- NaCl- Cloreto de Sódio
- 31- SDS- Dodecilo Sulfato de Sódio
- 32- EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	01
2.1 Micoses sistêmicas.....	02
2.2 Criptococose.....	02
2.3 Histoplasmose.....	05
2.4 Candidoses.....	07
2.5 Diagnóstico das micoses sistêmicas.....	08
2.5.1. Diagnóstico convencional.....	08
2.5.2. Diagnóstico molecular.....	10
2.5.2.1. PCR.....	10
2.5.2.2. FISH	11
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Modelo de estudo.....	15
4.2 Universo de estudo.....	15
4.3 Procedimentos.....	19
4.4 Desenvolvimento de sondas de hibridização para detecção de <i>H. capsulatum</i> por FISH em hemoculturas pré-incubadas para o diagnóstico rápido de histoplasmose.....	16
4.5 Avaliação da hibridização in situ fluorescente (FISH) para a detecção de fungos a partir de hemocultura e fluido cefalorraquidiano de pacientes com suspeitas de micoses invasivas.....	19
5 RESULTADOS.....	23
5.1 ARTIGO 1.....	24
ARTIGO 2: Aceito para publicação na revista <i>Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials</i> em 18.01.2014.....	34
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8 APENDICE.....	54
9 ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Em pacientes imunocomprometidos ou submetidos a procedimentos invasivos diagnósticos ou terapêuticos, o desenvolvimento de infecções fúngicas sistêmicas é comum, tornando-se causa de altas taxas de morbidade e mortalidade. Neste quadro, a rápida identificação de patógenos ainda na fase inicial da infecção torna-se fundamental, uma vez que os tratamentos adequados poderão ser ministrados o quanto antes, o que evita a aplicação de um tratamento desnecessário, e amplia grandemente o prognóstico de pacientes (Lakner et al., 2012).

Atualmente os métodos utilizados rotineiramente para identificação de patógenos são morosos e de custo relativamente elevado. A identificação a partir de culturas de sangue pelos métodos tradicionais requer o desenvolvimento de subculturas e análises bioquímicas, o que resulta em um intervalo de pelo menos 24h após a primeira indicação de crescimento, e os métodos para identificação da espécie fúngica podem demorar de três dias, no caso de *Candidas* spp. até 25 dias, no caso de *Histoplasma capsulatum* (Kauffman, 2007)

Estudos vêm demonstrando que os métodos moleculares possuem potencial para o diagnóstico, apresentando sucesso na identificação de patógenos em amostras biológicas, sem a necessidade de cultivo ou tratamentos prévios da amostra. Entre estes métodos, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), oferecem uma detecção e identificação de patógenos causadores de micoses sistêmicas extremamente viável e célere (Silva et al., 2011; Freire et al., 2012; Lakner et al., 2012; Sampaio et al., 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micoses sistêmicas

Nos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas invasivas tem aumentado. Essas se tornaram uma importante causa de morbidade e mortalidade para pacientes imunodeprimidos, como: os receptores de transplante de medula óssea, os que fazem usos de quimioterápicos, os presentes em unidades de terapia intensiva, os que apresentam Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS (Colombo *et al.*, 2006; Pfaller & Diekema., 2007) e os submetidos a procedimentos invasivos diagnósticos ou terapêuticos, como cateter venoso central, sondas vesicais, ventilação mecânica, nutrição parenteral, antibioticoterapias prolongadas ou diálise, entre outros (Álvarez-Lerma *et al.*, 2003; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2011).

A elevada morbi-mortalidade e os custos correntes associados a tais infecções demonstram que estas enfermidades devem ser consideradas importante problema de saúde pública, sendo necessário que se possa intervir profilática e preventivamente com base na identificação precoce dos fatores de risco, bem como no diagnóstico laboratorial realizado em estágios iniciais da infecção (Zaragora & Pemán, 2006; Zaragoza & Pemán, 2007).

Micoses sistêmicas são caracterizadas pelo isolamento de fungos viáveis na corrente sanguínea. A presença de microorganismos viáveis na corrente sanguínea sugere uma infecção ativa nos tecidos, e desta forma, a recuperação do paciente pode depender de uma detecção e isolamento do agente etiológico para identificação precoce. O diagnóstico e tratamento precoce destas infecções são fundamentais diante da grave ameaça aos pacientes acometidos e possível disseminação por via hematogênica para outros órgãos, quadro que se torna muitas vezes fatal (Zaragora *et al.*, 2006; Couto *et al.*, 2011). Entre as micoses disseminadas em pacientes imunodeprimidos são frequentes a criptococose, a histoplasmose e a candidose (Eggimann *et al.*, 2003).

2.2 Criptococose

As leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam ampla distribuição na natureza, e podem ser isoladas de diversas fontes, como ar, solo, excretas de aves, água, superfície de mucosa de animais, flores, folhas e madeira em decomposição, e nas mais diversas regiões geográficas, como Caribe, Himalaia e Antártica (Khawcharoenporn *et al.*, 2007). A maioria é de vida livre e apenas poucas espécies apresentam importância em micologia médica. As duas espécies

mais frequentes que provocam patologias em humanos são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. (Levitz & Boekhout, 2006; Jarvis & Harrison 2007).

C. neoformans e *C. gattii* são basidiomicetos em sua fase assexuada apresentam células arredondadas, ocasionalmente ovoides, isoladas ou com brotamento, envolvidas por cápsula mucopolissacarídica. *C. neoformans* é a fase anamórfica de *Filobasidiella neoformans* e *C. gattii* é a fase anamórfica de *F. basillispora*. Estas duas espécies formavam duas variedades de *C. neoformans*, var. *neoformans*, sorotipos A e D, e var. *gattii*, sorotipos B e C (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Franzot et al. (1999) propuseram a inclusão do sorotipo A em uma nova variedade, var. *grubii*, baseados em estudos que envolveram a análise das diferenças genóticas entre os sorotipos A e D. A partir de 2002, avanços na compreensão da estrutura genética de *C. neoformans* permitiram a inclusão dos sorotipos B e C em uma nova espécie, *C. gattii* (Kwon-Chung & Varma, 2006).

A criptococose é uma infecção oportunista que acomete indivíduos sadios e imunossuprimidos. A história natural da criptococose em geral está diretamente relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro, pois é esta que geralmente determina a gravidade da infecção. As infecções sistêmicas ocorrem pela inalação de propágulos do microrganismo, que se depositam no alvéolo pulmonar. A disseminação pode ocorrer em outros sítios, provavelmente por via hematogênica, principalmente em pessoas com comprometimento da imunidade celular, resultante de doenças imunossupressoras, como AIDS e patologias linfoproliferativas (Segal & Baum, 1994).

De modo geral, o primeiro aspecto importante para a patogenicidade de *Cryptococcus* spp. parece ser a sua aderência à superfície do hospedeiro, seguida pela colonização do tecido. *C. neoformans* é um patógeno intracelular facultativo, portanto, capaz de sobreviver em macrófagos e permanecer na vesícula ácida fagossômica, mantendo sua capacidade de multiplicação. Essa permanência intracelular provavelmente é um elemento importante na persistência da infecção, disseminação por via hematogênica e estabelecimento no sistema nervoso central. O mecanismo pelo qual *C. neoformans* evita a morte depois da ingestão por fagócitos permanece pouco compreendido, mas há evidência de que a sobrevivência intracelular pode ser dada pela produção de pigmentos melanóides (Casadevall, 2000; Santangelo et al., 2004).

A disseminação para o sistema nervoso central e subsequente desenvolvimento de meningite e encefalite, é a principal causa de mortalidade durante as infecções por *C. neoformans* e *C. gattii*. Os fatores de virulência do fungo parecem ter grande importância na invasão tecidual, manutenção, multiplicação e disseminação do microrganismo, e também na

gravidade da doença (Casadevall, 2000; Santangelo et al., 2004). A entrada da levedura no sistema nervoso central pode ocorrer através do cruzamento direto dos pequenos capilares da barreira hematoencefálica, e esse cruzamento pode ocorrer também por extravasamento direto, transcitose endotelial, ou o microrganismo pode cruzar essas barreiras no interior de fagócitos mononucleares, o que alguns pesquisadores têm chamado de “cavalo de Tróia”. É possível que diferentes rotas levem a levedura ao sistema nervoso central, e em cada caso, diferentes fatores de virulência do microrganismo estejam envolvidos (Casadevall, 2000; Olszewski et al., 2004).

A principal e mais grave manifestação clínica da criptococose é a meningoencefalite, que geralmente ocorre em indivíduos imunocomprometidos, porém manifestações em outros sítios, como pulmões, ossos e articulações, vasos sanguíneos, próstata, fígado e tecido cutâneo, também ocorrem em menor frequência (Pappalardo & Melhem, 2003).

As infecções por *C. gattii* ocorrem principalmente em regiões de clima temperado e tropical, especialmente em indivíduos imunocompetentes, sendo considerado um patógeno primário. As manifestações clínicas ocorrem no pulmão, região cutânea e principalmente no sistema nervoso central (Mitchell & Perfect, 1995; Pappalardo & Melhem, 2003).

C. neoformans infecta primariamente indivíduos imunocomprometidos, e causa mais de 90% dos casos de criptococose, sendo que mais de 99% destes casos são em pacientes com AIDS. *C. gattii* também infecta pacientes imunocomprometidos, todavia em uma frequência menor, e são considerados menos virulentos (Mitchell & Perfect, 1995). O sorotipo AD foi isolado do ambiente e em pacientes na América do Norte e Europa, com manifestações clínicas similares às descritas previamente (Lengeler et al., 2001).

A infecção por HIV é reconhecida como o maior fator de risco para criptococose, e estima-se que 6-8% dos pacientes com AIDS desenvolvem em algum momento infecção criptocócica (Martinez et al., 2001). A incidência de criptococose em pacientes com AIDS no mundo varia em torno de 5 a 30%, e as maiores incidências ocorrem no sudeste dos EUA e África Equatorial (Mitchell & Perfect, 1995). Os pacientes com AIDS acometidos por criptococose, em sua maioria, apresentam a forma disseminada (Bovers et al., 2008; Huston & Mody, 2009; Sidrim et al., 2010). Antes da implantação da terapia antiretroviral, cerca de 10 a 25% de pacientes morriam no início da terapia, e 30 a 60%, dentro de 12 meses, tendo algumas regiões atingindo 100% de mortalidade (Mwaba et al., 2001). Após a introdução da terapia antiretroviral foi verificada uma queda de 46% na incidência de criptococose (Dromer et al., 2004).

2.3 Histoplasmose

A histoplasmose é causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. De modo geral, o microrganismo cresce como um fungo filamentosso no meio ambiente (forma infectante), e então, conídios, fragmentos de hifas e/ou outros elementos infecciosos do fungo são inalados por humanos ou outros animais. No hospedeiro, são fagocitados pelos macrófagos pulmonares e depois se convertem, intracelularmente, como leveduras parasitas capazes de replicar em macrófagos onde exista uma diminuição da capacidade microbicida ocasionada, como por exemplo, alterações imunes do hospedeiro do sistema, vindo esta a ser a trajetória da infecção (Woods, 2002).

A histoplasmose humana, em geral, manifesta-se primariamente e predominantemente (cerca de 90% dos casos) nos pulmões, causando o quadro pneumonite aguda, muitas vezes assintomático e de regressão espontânea. Aproximadamente 95% dos casos são inaparentes, subclínicos ou completamente benignos, apresentando quadro assintomático que se resolve de forma espontânea (Rippon, 1988). A inalação de conídios causa uma infecção nos pulmões. Antes do desenvolvimento da imunidade celular, ocorre crescimento dos organismos nos sítios de implantação no parênquima pulmonar e infecção metastática através de disseminação linfática e hematogênica. O histoplasmoma é um pequeno foco necrótico envolto por uma cápsula fibrosa que se desenvolve ao redor de um foco primário de infecção pulmonar cicatrizado. O seu crescimento é lento, podendo atingir três a quatro centímetros em 10 a 20 anos (Goodwin & Snell, 1973).

Em pacientes imunocompetentes, ocorre desenvolvimento de imunidade celular específica, os macrófagos adquirem atividade fungicida e controlam a infecção restando apenas calcificações residuais nos pulmões, no fígado e algumas vezes no baço, sendo os granulomas calcificados frequentemente observados durante a necropsia de pacientes de áreas endêmicas (Goodwin, 1981). Este padrão é similar ao que ocorre na infecção primária na tuberculose. Em 5 a 10% dos casos, podem estar associados a lesões cutâneas tipo eritema nodoso, artrite, derrame pleural ou derrame pericárdico (Wheat, 2001).

Em algumas situações, principalmente em pacientes imunodeprimidos, mas também em imunocompetentes, como consequência da disseminação, o fungo pode se localizar em vários outros sítios, como a região ocular, cavidade bucal, laringe, pele, sistema nervoso, trato gastrointestinal, glândulas adrenais, no interior dos nervos cutâneos, em abscesso na tíbia, assim como nos demais ossos, mesmo em pacientes sem nenhuma evidência de envolvimento

pulmonar por histoplasmose, muitas vezes sendo confundido com carcinoma (Wheat, 2001; Woods, 2002).

A histoplasmose pulmonar crônica, isolada e cavitária do adulto, é observada em pacientes masculinos, idosos e com doença pulmonar obstrutiva crônica de base. Manifesta-se com tosse produtiva, dor torácica, dispneia progressiva, febre e ainda inapetência e adinamia. O quadro radiográfico sugere tuberculose e mesmo após o tratamento, as condições ventilatórias permanecem limitadas (Drutz, 1989; Rippon, 1989; Bava et al., 1996; Wheat, 2001).

A histoplasmose aguda ocorre quando há exposição com inalação maciça de conídios de *H. capsulatum*. As circunstâncias que favorecem a exposição são um local com a presença do fungo em abundância e condições que favoreçam o crescimento do fungo (Goodwin, Des Prez, 1978).

Dependendo da exposição durante o contágio, da variedade do agente e/ou das características imunológicas do hospedeiro, a patogênese pode manifestar-se com clínica pulmonar aguda de variável gravidade podendo ser caracterizada por uma doença progressiva e potencialmente fatal quando as defesas do hospedeiro estão prejudicadas (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Borges et al., 1997). Organismos viáveis podem persistir no hospedeiro após a resolução da histoplasmose não complicada, e virem a ser a origem da doença disseminada em casos de imunodeficiência em pacientes que não possuam uma história de exposição recente (Drutz, 1988; Drutz, 1989).

A histoplasmose disseminada oportunista, uma forma grave da histoplasmose, é descrita com grande incidência em adultos com neoplasias hematológicas, em uso ou que realizaram tratamento citotóxico contra carcinomas ou terapia com imunodepressores como esteroides (principalmente corticoterapia crônica); associada à AIDS em pacientes com níveis de células CD4+, em média, de $33/\text{mm}^3$, isto é, imunodeficiência severa (Wheat et al., 1990; Ramdial et al., 2002), ou a outro fator de imunossupressão grave. Em casos raros, também tem sido descrita em idosos, crianças e em pacientes com deficiência de células da imunidade secundária (Wheat, 2001).

Tal forma de histoplasmose apresenta aspectos muito semelhantes àquela que ocorre na infância. Pode decorrer tanto da reativação de foco quiescente, devido à infecção pelo vírus HIV-1 que pode deflagrar reativação do *H. capsulatum* latente em pacientes previamente expostos à histoplasmose, quanto da progressão de infecção recente. Caracteriza-se por evolução aguda e subaguda com febre e emagrecimento, frequência de lesões bubocutâneas, adinamia, anorexia, adenomegalia, anemia, comprometimento da medula óssea e

manifestações pulmonares em 40% dos casos, hepatomegalia em 25% e doença septicêmica em 10% dos casos (Ramdial et al., 2002).

A forma clínica mais grave da histoplasmose é a disseminada progressiva (PDH), comum entre os pacientes com AIDS. O acometimento em pacientes hígidos ocorre especialmente nos Estados Unidos e América Latina (Ferreira & Borges, 2009). No Panamá, a PDH ocorreu em 8% dos pacientes hospitalizados entre 1997 e 2003, apresentando uma mortalidade de 12%. No estado do Amazonas, um estudo realizado com material de pacientes falecidos com AIDS revelou que a histoplasmose e criptococose estão entre os cinco principais agentes infecciosos associados a morte nestes pacientes (Souza et al., 2008).

2.4 Candidoses

As candidoses são causadas por leveduras do gênero *Candida*, que colonizam e infectam o hospedeiro humano com imunocomprometimento. Este gênero corresponde a 80% das infecções fúngicas documentadas, e estudos demonstram que chegam a ser o quarto agente mais comum em septicemias, correspondendo a cerca de 8% dos casos. A mortalidade geral de fungemias por *Candida* spp é da ordem de 40 a 60%, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (Trick et al., 2002; Pappas et al., 2003; Nucci & Marr, 2005; Pfaller & Diekema, 2007).

As candidoses podem ser adquiridas por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, local ricamente colonizado por *Candida*. Um desequilíbrio na microbiota residente, ou lesões da mucosa intestinal causada por procedimentos cirúrgicos ou desnutrição grave, favorecem a translocação da levedura aos capilares mesentéricos, permitindo o acesso à corrente sanguínea. Por via exógena, as infecções podem ocorrer por intermédio das mãos contaminadas dos profissionais de saúde, e pela utilização de cateteres e soluções parenterais contaminadas (Colombo & Guimarães, 2003; Tortorano et al., 2006).

Aproximadamente 10,4% de infecções em uma Unidade de Cuidado Intensivo são relacionadas a espécies de *Candida*, sendo a maioria nosocomial (Alberti et al., 2002). Entretanto, esta taxa pode estar subestimada, uma vez que 4% dos pacientes que morrem em uma unidade de cuidado intensivo apresentam infecção fúngica inespecífica durante exames *post-mortem* (Dimopoulos et al., 2004).

Candida albicans permanece sendo a espécie mais frequente isolada de candidemias, variando de 40% dos casos na América Latina, até 70% em alguns países nórdicos (Pfaller &

Diekema, 2007). Sua capacidade de aderência a mucosas e epitélios pela produção de proteinases e fosfolipases, bem como a produção de estruturas filamentosas que auxiliam na invasão dos tecidos, facilitam o processo patogênico desta levedura. Esta espécie é a que está associada a índices de mortalidade mais elevados (Colombo & Guimarães, 2003; Tortorano *et al.*, 2006).

A ocorrência de candidoses atribuídas a espécies não *albicans* vem sendo documentada com maior frequência, e já respondem por 50 a 60% do total dos episódios, particularmente em países da Ásia e da América Latina. A identificação da espécie isolada se faz necessária, não apenas no âmbito de estudos epidemiológicos, mas principalmente pelo fato das diversas espécies diferirem com relação ao prognóstico e à susceptibilidade aos agentes antifúngicos (Colombo e Guimarães, 2003).

Candida parapsilosis é uma levedura exógena que coloniza a pele humana, sendo frequentemente isolada das mãos dos profissionais de saúde e de soluções de nutrição parenteral contaminadas. Tem grande capacidade de formar biofilmes em superfícies de cateter. É responsável por 7 a 15% dos episódios de candidemia nos EUA, e em países da América Latina ocupa o segundo lugar entre as espécies com maior frequência de isolamento (Colombo *et al.*, 2006; Pfaller & Diekema, 2007).

Em pacientes neutropênicos e portadores de enfermidades malignas hematológicas, *Candida tropicalis* surge como importante causa de candidemias. De 60 a 80% desses pacientes, quando colonizados com a levedura, podem desenvolver infecção sistêmica. Nos EUA, a frequência de isolamento vem decrescendo com o uso de fluconazol profilático, sendo a quarta espécie mais isolada. No entanto, em países da América Latina e no Brasil, ocupa o segundo lugar juntamente com *C. parapsilosis* (Nucci e Colombo, 2007; Pfaller & Diekema, 2007).

2.5 Diagnóstico das micoses sistêmicas

2.5.1. Diagnóstico convencional

As técnicas convencionalmente utilizadas para diagnóstico das micoses sistêmicas em micologia são o exame direto, cultura e imunoensaios. As técnicas de exame microscópico direto em material biológico são amplamente utilizadas para detecção rápida de fungos, fornecendo avaliação e informações imediatas sobre os microrganismos. No entanto, essas técnicas apresentam problemas devido aos baixos limites de detecção (necessidade de um

número superior a 1×10^4 células/ml), dificuldade de interpretação, sensibilidade baixa e o diagnóstico é variável. (Borekçi et al., 2008).

O exame micológico envolvendo o cultivo é um recurso de amplificação biológica. Isola-se o agente biológico e obtêm-se culturas puras, as quais são caracterizadas, identificando-se o agente, o que confere certeza ao diagnóstico. As hemoculturas têm notoriamente pouca sensibilidade no fornecimento de evidências de infecção disseminada (73% de positividade nos sistemas mais eficientes). Quando chegam a ser evidentes em hemoculturas, os resultados são igualmente indicativos de alta morbidade e mortalidade para os pacientes. São, na verdade, achados que muitas vezes antecedem, quase que imediatamente, a morte do paciente (Mielle & Remualdo, 2007).

Os sistemas automatizados de hemocultura, que são a forma mais comum de detecção laboratorial de agentes causadores de fungemias, fazem leitura contínua da produção de CO_2 com o objetivo de detectar o crescimento de microorganismos nos frascos contendo o sangue e o meio de cultivo. Quando um frasco é identificado como positivo, análises de microscopia e uma subcultura são realizadas para identificação dos organismos por meio de ensaios bioquímicos e imunológicos. Estes ensaios são, de forma geral, lentos e apresentam limitações de sensibilidade e especificidade (Brasil *et. al.*, 2003; Atkins, 2004; Bharathi *et. al.*, 2006; Mielle & Remualdo, 2007). Quando a infecção é causada por mais de um organismo, as interpretações dos resultados se tornam impossíveis ou confusas de maneira geral com o uso desses ensaios (Kempf et al., 2005). Devido à morosidade inerente à técnica, a identificação de espécies de fungos presentes nas hemoculturas demora aproximadamente entre 3 a 10 dias, tempo este que prejudica o tratamento e o prognóstico dos pacientes. Desta forma, há uma necessidade clínica em identificar os patógenos da cultura em tempo real e diferenciar de outras espécies de fungos que às vezes são mais resistentes aos antifúngicos (Trnovsky, 2008).

Quanto aos métodos imunológicos, os principais problemas são a baixa sensibilidade e a especificidade de muitos deles. A detecção de anticorpos anti *Candida albicans*, por exemplo, não é muito eficaz, tendo em vista a baixa sensibilidade e especificidade, talvez por ser *Candida* um membro da microbiota normal. Os antígenos desse microrganismo não se mostram especialmente imunogênicos. Além disso, a produção de anticorpos nos pacientes imunossuprimidos, aqueles mais susceptíveis a tais infecções, está comprometida, o que diminui a possibilidade de detecção de aumento de título de anticorpos específicos. Quanto às metodologias baseadas na busca de antígenos, essas possuem sensibilidade, especificidade e

velocidade adequadas para os casos de micoses profundas e oportunistas, no entanto, ainda não são difundidas e são muito caras (Heil et al., 2012; Börekçi et al. 2010).

2.5.2. Diagnóstico molecular

Pelo apresentado, entende-se que os métodos convencionais possuem problemas e necessitam ser substituídos por metodologias mais específicas e velozes. A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos teve ampla aplicação no diagnóstico de infecções. Atualmente, as técnicas moleculares vêm apresentando eficiência, confiabilidade e rapidez no diagnóstico. A presença de um agente infeccioso pode ser detectada por seus componentes antigênicos ou de segmentos específicos de nucleotídeos (Luo & Mitchell, 2002; Hsu et al., 2003).

As metodologias moleculares como a FISH, Flow-FISH e PCR-RFLP são uma opção para a detecção e identificação de agentes de micoses profundas e oportunistas, reduzindo espaço de tempo entre a internação do paciente e o início do tratamento não empírico (Heil et al., 2012).

2.5.2.1. PCR

A PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da polimerase) está sendo cada vez aplicada para detecção de genes humanos e microorganismos patogênicos. Modernas técnicas, baseadas na PCR, como a PCR-multiplex e a PCR em tempo real, têm sido pesquisadas para detecção e identificação de fungos patogênicos. No entanto, mesmo a PCR simples ainda não é amplamente utilizada na rotina dos Centros de Referência em Infectologia do Brasil, isso devido a problemas operacionais diversos e, entre estes, deve-se destacar a necessidade de padronização, validação e elaboração de protocolos robustos (Santos et al., 2010; Freire et al., 2012).

A técnica de análise de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Análise de tamanho de fragmentos de restrição) consiste na digestão enzimática de produtos de PCR o que resulta, após eletroforese, nos perfis de RFLP. Esses perfis podem ser utilizados para identificação de microrganismos. A PCR/RFLP, em estudos anteriores, foi avaliada para a identificação de espécies de *Candida*. Entretanto, poucos estudos foram realizados com o objetivo de investigar a identificação simultânea dos vários agentes de fungemias. Neste sentido, nosso grupo/núcleo trabalhou, no período de 2006-2009, um projeto denominado

“Aspectos referentes à implantação na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-HVD) de um diagnóstico molecular (PCR/RFLP) para identificação de agentes causadores de fungemias em pacientes com Aids”. O principal resultado foi o desenvolvimento de uma metodologia que utiliza a região de amplificação ITS1/NL4 do DNAr e a enzima de restrição *Ddel* para discriminar sete dos principais agentes de fungemia.

.Börekçi et al. 2010, comparando o tempo de processamento das amostras entre FISH, PCR-RFLP e métodos convencionais para *Candida ssp*, encontraram o tempo de 2,5 h, 6 a 8 h e um a três dias, respectivamente. Com relação ao custo por amostra, os valores para FISH foram de 9,1 dólares, de PCR-RFLP, 33,8 dólares, e os métodos convencionais, 16,9 dólares. Comparando-se estas três técnicas, FISH foi a que apresentou melhores condições para detecção de infecções multi-espécies.

2.5.2.2. FISH

A FISH (hibridização *in situ* com sondas fluorescentes) consiste em utilizar sondas de ácidos nucleicos marcadas com corantes fluorescentes com especificidade para hibridizar com o RNAr dos microrganismos alvo. Algumas publicações demonstram a eficiência desta metodologia para a detecção de fungos diretamente das hemoculturas e do sangue (Kempf et al., 2000; Oliveira et al., 2002). Foi demonstrada a aplicação de sondas FISH para a identificação de seis espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, encontrando sensibilidade e especificidade superiores a 99%. A correta identificação das espécies resistentes aos tratamentos mais comuns possibilita a escolha de terapias mais precisas (Frickmann et al., 2012). No entanto, ainda não foram desenvolvidas sondas para o gênero *Histoplasma*, e tampouco foram realizados estudos de utilização desta técnica na rotina laboratorial por longos períodos (Moter & Gobel, 2000; Wilson et al., 2005).

A técnica de hibridização *in situ* foi desenvolvida por dois grupos de pesquisa independentes (Pardue & Gall, 1969; Jonh et al., 1969), em cujos trabalhos, DNAs e RNA 28S foram hibridizados com sondas marcadas com radiatividade e analisadas em preparações citológicas por meio de microautoradiografias. Esta técnica permitiu a análise de seqüências de ácido nucleico sem qualquer alteração morfológica das células ou qualquer interferência na sua integridade e localização em seus tecidos. Desde então, a hibridização tem revolucionado estudos de evolução de cromossomos, análises de tumores, leucemias e estudos citológicos de muitas espécies.

A hibridização *in situ* foi introduzida na microbiologia por Giovannoni et al. (1988), quando foram então usadas pela primeira vez, sondas de DNA marcadas com radiatividade para a detecção de bactérias. Em 1984 foram desenvolvidas sondas marcadas com compostos fluorescentes (Landergernt et al., 1984), e com este avanço, as sondas passaram a ser bastante utilizadas por diversas áreas de pesquisa. Esta ampliação nas aplicações foi devido a apresentarem maior segurança, melhor resolução e também pela simplificação do método, que suprimia várias etapas quando comparado ao uso de radioatividade. Com isso, nas últimas décadas, a rapidez da técnica associada à alta sensibilidade e especificidade tornou FISH uma ferramenta poderosa nos estudos filogenéticos, ecológicos, ambientais, microbiológicos e de diagnóstico (Amann et al, 1990).

Em microbiologia, o alvo mais comum usado para FISH é o RNA ribossomal 16S, devido à estabilidade genética, à presença de regiões com estrutura conservada e também regiões variáveis, além de possuir um grande número de cópias (Woese, 1987). Devido a essas características, é possível desenhar sondas para cada nível taxonômico, como por exemplo, gênero específico e espécie específica (Amann et al., 1995). As sondas devem ter entre 20 e 30 pares de bases, pois com esse comprimento é possível obter sensibilidade e especificidade com fácil penetração nas células. FISH detecta seqüências de ácido nucleico complementares às sondas marcadas com fluorocromos dentro de células intactas. O processo inclui várias etapas que geralmente são de fixação do material biológico, preparação das amostras que podem incluir ou não pré-tratamento para aumentar a permeabilidade, como por exemplo, hibridização com as respectivas sondas para detecção de determinados alvos em solução de hibridização, lavagem da amostra e montagem, e então a visualização.

Os crescentes estudos e publicações de seqüências da região 16S rRNA oferecem informações que tornam a identificação e a detecção de organismos por meio de FISH extremamente simples e com grande eficiência. Devido ao alto número de cópias da região 16S rRNA em cada replicação, uma célula ativa metabolicamente apresenta número suficiente de alvos para serem visualizados mesmo que em uma única célula de um microrganismo, utilizando para tanto uma sonda de seqüência única. Com o uso de sondas marcadas com fluorocromos, submetidas a diferentes excitações, é possível a detecção simultânea de dois ou mais organismos em uma única amostra. Para a visualização simultânea em microscopia podem ser usados diversos filtros.

A FISH vem sendo investigada como ferramenta de diagnóstico molecular de micoses disseminadas em laboratórios de patologia (Hartmann et al., Trnovsky et al., 2008). Nesses estudos diversos organismos patogênicos têm sido detectados com alta sensibilidade,

especificidade e rapidez por meio desta técnica. A sensibilidade e a especificidade têm alcançado valores em torno de 100%, mostrando que o método é bastante confiável (Oliveira et al., 2002; Rigby et al., 2002; Kempf et al., 2005; Hall et al., 2012; Lakner et al., 2012).

Lakner et al., 2012 testaram sondas FISH novas e também previamente descritas em 99 cepas de fungos contendo 31 espécies, encontrando entre 69% a 100% de especificidade e 100% de sensibilidade. Após avaliação em cepas, FISH foi testada em isolados clínicos, comparando-se com o método convencional de detecção. Enquanto a metodologia convencional demorou 48h para ser realizada e não diferenciou *C. dubliniensis* de *C. albicans*, FISH permitiu a identificação de *C. albicans* em isolados clínicos em apenas 3h, com uma sensibilidade e especificidade de 100%.

Outro estudo testou FISH em pacientes hospitalizados com candidose, analisando o tempo de identificação, tempo de tratamento com o antifúngico específico, tempo de permanência do paciente no hospital, mortalidade e custo por cada paciente, incluindo diagnóstico e tratamento. Com a implementação de FISH, foi observado que o tempo de identificação levou 4 horas, enquanto que o método convencional necessitou de 4 dias, e houve economia por paciente de 415 dólares (Heil et al., 2012).

Estudos de avaliação da utilização de metodologias moleculares (PCR-RFLP e FISH) para identificação de fungos patogênicos em amostras de pacientes com suspeita de fungemia precisam ser realizados e otimizados com a finalidade de oferecer uma alternativa mais eficaz aos lentos, e inespecíficos ensaios fenotípicos que vêm sendo utilizados. O diagnóstico precoce e o tratamento dessas fungemias são fundamentais para possibilitar uma melhoria do tratamento e prognóstico dos pacientes, evitando a possibilidade de dispersão hematológica para órgãos mais profundos ou mesmo a mortalidade provocada por estas infecções (Bracca *et al.*, 2003; Azevedo et al., 2011; Frickmann et al., 2012; Heil et al., 2012).

Este trabalho buscou investigar a utilização da FISH para detecção e identificação de fungos causadores de micoses sistêmicas, como resposta à necessidade de detecção rápida, sensível e específica dos agentes patogênicos. As metodologias avaliadas e desenvolvidas visam substituir os sistemas complexos e morosos que utilizam uma combinação de múltiplas técnicas para a identificação de espécies de fungos. Uma identificação rápida e eficaz permite um diagnóstico correto, e conseqüentemente, a adoção de tratamentos precisos e adequados em pacientes acometidos por graves infecções que progridem rapidamente, podendo tornar-se fatais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a FISH para detecção e identificação de fungos causadores de micoses sistêmicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver sondas de hibridização para detecção de *H. capsulatum* por FISH;
2. Avaliar a FISH na detecção de fungos em Hemoculturas e fluido cefalorraquidiano de pacientes com suspeitas de micoses profundas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de estudo

Foi realizado um estudo prospectivo, transversal e descritivo, de avaliação de ferramentas de diagnóstico FISH para identificação de fungos causadores de micoses sistêmicas.

4.2 Universo de estudo

Local de estudo: Este estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e no Laboratório de Micologia e Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Culturas de cepas de referência: Os microorganismos foram adquiridos no American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virgínia.) e no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) da coleção microbiana e foram utilizados para avaliação da especificidade de sondas de oligonucleotídeos: *Candida albicans* ATCC 3623, *Cryptococcus neoformans* (anteriormente *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) FMT1420, *Cryptococcus gattii* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*) FMT1170, *Histoplasma capsulatum* (FMT 1400, FMT 2279, FMT 2283), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

População do Estudo: Foi constituída de pacientes atendidos na internação da FMT-HVD no período de outubro de 2013 a fevereiro de 2014.

Amostragem: O número de amostras de líquido cefalorraquidiano e sangue com suspeita de presença de agentes causadores micoses sistêmicas é 300 por semestre aproximadamente (número aproximado informado pela gerência de Bacteriologia da FMT-HVD), b) que a frequência de isolamento de agentes fúngicos é de 10% e c) um nível de confiança de 95% e uma precisão de 5%, conclui-se, de acordo com cálculo amostral, que deveriam ser analisadas no mínimo 95 amostras entre amostras positivas e negativas no isolamento por métodos convencionais. Neste trabalho foram analisadas um total de 145 amostras entre fluido cerebrospinal e hemoculturas.

Critério de Inclusão dos Pacientes:

Os pacientes incluídos no estudo foram:

a) Os que tiveram solicitação para realização de exames para micoses profundas (Amostras de Sangue e líquido cefalorraquidiano submetidas à gerência de Bacteriologia e Micologia da FMT-HVD).

b) Pacientes que aceitaram participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo D).

Critério de Exclusão dos Pacientes:

a) Pacientes com amostras identificadas inadequadamente para o estudo ou amostra de outra tipografia que não seja sangue, hemocultura, aspirado medular ou líquido. Exemplo: soro, plasma, etc.

b) Pacientes que apresentaram amostras com volume insuficiente para a realização de todos os procedimentos de rotina e do ensaio molecular experimental.

Aspectos Éticos:

Para poder realizar a pesquisa e em consonância com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que trata sobre as recomendações Éticas e Legais com pesquisas envolvendo seres humanos, o plano de pesquisa foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (CAE 23715813800000005)

4.3 Procedimentos

Os procedimentos desta tese foram divididos em duas etapas distintas:

- Desenvolvimento de sondas de hibridização para detecção de *H. capsulatum* por FISH em hemoculturas pré-incubadas para o diagnóstico rápido de histoplasmose;
- Avaliação da hibridização in situ fluorescente (FISH) para a detecção de fungos a partir de hemocultura e fluido cefalorraquidiano de pacientes com suspeitas de micoses profundas.

4.4 Desenvolvimento de sondas de hibridização para detecção de *H. capsulatum* por FISH em hemoculturas pré-incubadas para o diagnóstico rápido de histoplasmose

Hemoculturas: Um total de 33 hemoculturas de pacientes HIV-positivos com diagnóstico clínico de micoses profundas foi investigado. Além disso, amostras de sangue de doadores saudáveis foram inoculadas com três cepas de *H. capsulatum* (FMT 1400, FMT 2279, FMT 2283), outras infecções fúngicas clinicamente relevantes e espécies bacterianas, para serem usados como controles positivos e negativos, respectivamente.

Cepas utilizadas como microrganismos padrão: Os microrganismos foram adquiridos no American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virgínia.) e na coleção microbiana do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e foram utilizados para avaliação da

especificidade de sondas de oligonucleotídeos: *Candida albicans* ATCC 3623, *Cryptococcus neoformans* (anteriormente *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) FMT1420, *Cryptococcus gattii* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*) FMT1170, *Histoplasma capsulatum* (FMT 1400, FMT 2279, FMT 2283), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Manipulação das amostras: Foram utilizadas garrafas de hemocultura aeróbia inoculadas com 10 ml de sangue, e incubou-se em um sistema BACTEC 9120 de hemocultura automatizada (Becton-Dickinson, Sparks EUA). A incubação foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, na temperatura de 35 °C. Alíquotas das suspensões de cultura de sangue foram retiradas assepticamente (agulha de seringa) a partir das garrafas consideradas positivas pelo sistema automatizado. Uma alíquota foi utilizada para pesquisa convencional, uma alíquota para a PCR e outra alíquota para FISH.

Para métodos convencionais, foram transferidas 200 µl de hemocultura para tubos com ágar de Sabouraud (Becton-Dickinson, Sparks EUA). Colônias que cresceram em meio de Ágar Sabouraud foram identificadas por métodos laboratoriais padrão, incluindo testes de micro-morfológicos e fisiológicos (produção de tubos germinativos, crescimento em ágar Níger e CHROMagar™ *Candida* (Becton-Dickinson, Faísca, Usa), incubação a 42 ° C, o teste para carboidratos e assimilação de nitrogênio, bem como a fermentação de carboidratos) (Frias et al.,2012).

PCR: A Geração de produtos de PCR foi realizada como descrita por (Sampaio et al., 2012). O DNA foi extraído de amostras (200 µL da cultura de sangue) utilizando o QIAamp Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado por absorbância a 260 nm utilizando espectrofotômetro GeneQuant (Eppendorf, Hamburgo, Germany). Vinte nanogramas do DNA extraído serviram como molde para a amplificação por PCR. As reações de PCR foram realizadas num volume total de 25 µl contendo tampão de PCR (concentração final: 1x, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 200 nM de iniciadores HcIII (5-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3) e HcIV (5-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3) (ambos os iniciadores foram descritos por Bialek et al.¹⁸), 50 µM de dNTP e 1 U de Taq DNA ampli-polimerase. A PCR foi efetuada utilizando um termociclador (Supercycle-Seul de Kyratec, Sul da Coreia) com as seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min a 94 ° C, 40 ciclos de 30 s a 94 ° C (desnaturação), 30 segundos a 70 ° C (anelamento), 90 segundos a 72 ° C (extensão), e uma extensão final de 10 min a 72 ° C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a

2% e corado com SYBR® Green (SYBR safe DNA Gel stain, Invitrogen, Carlsbad, USA). Um DNA Ladder Mix (SM0331, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) serviu como marcador de tamanho do produto da PCR.

FISH: Foram desenvolvidas duas sondas de FISH específicas para *Histoplasma capsulatum*, marcadas na extremidade 5' com o corante vermelho sulfoindocyanine Cy3 tendo como alvo a subunidade ribossomal 18S Hca1 (5' AGTCGAGGCTTTCAGCATGT-3') e Hca2 (5'CTGACGACCATTAAGCCAGC-3'). As sondas foram desenhadas usando o software Primer 3 (www.primer3.com) com dados extraídos do NCBI nucleotídeos. A avaliação *in silico* foi realizada com o software probeCheck (www.microbial-ecology.net/probecheck/) usando a coleção de sequências SILVA (Loy et al., 2008).

As reações da FISH foram realizadas utilizando separadamente as sondas Hca1 e Hca2. Algumas experiências foram feitas usando duas sondas, ao mesmo tempo, a fim de investigar a influência da interação no sinal fluorescente. Além das sondas, todas as amostras foram contra-coradas com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole-di-hidroclorato).

Para a investigação das hemoculturas pré-incubadas, 0,5 ml de ácido acético (100%) foi adicionado a 5 ml de meio de cultura de sangue para lisar os eritrócitos. A suspensão foi centrifugada 10000 g durante 5 min, o pellet contendo as células foi lavado com 500 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (130 mM de cloreto de sódio, tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.2) e fixado durante 4 h com 4% w / v de paraformaldeído em PBS a 4 ° C. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e suspendeu-se em um volume de PBS e um volume de etanol absoluto frio e armazenadas a -20 ° C até sua utilização.

O ensaio FISH foi realizado como descrito por Amann et al., 1990. As células fixadas foram transferidas para lâminas de microscópio previamente limpas e secas a 37 ° C durante 20 min, resultando no esfregaço. O último foi coberto com o tampão de hibridação (NaCl 0,9 M, 0,01% w / v de SDS, 20 mM Tris-HCl pH 7,2, 30% de formamida e 1µM de sonda) e incubou-se a 46 ° C durante 2 h. Após este período, as lâminas foram lavadas utilizando tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,01% w / v de SDS, 5 mM de EDTA e 150 mM de NaCl durante 30 minutos a 46 ° C). As lâminas microscópicas foram secas a 37 ° C durante 20 min, em seguida, foram montadas com solução Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA) e examinadas com um microscópio Zeiss Axioskop 40 (Zeiss, Jena, Germany).

4.5 Avaliação da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para a detecção de fungos a partir de hemocultura e fluido cerebrospinal de pacientes com suspeitas de micoses invasivas

Amostras biológicas: Um total de 145 amostras biológicas foram investigadas, incluindo 112 fluidos cerebrospinais (CSF) de pacientes com suspeita de criptococose e 30 hemoculturas que apresentaram resultado positivo no sistema de cultura de sangue (9120 BACTEC Becton-Dickinson, Sparks EUA). Estas amostras de hemocultura foram negativas para bactérias de acordo com a análise da coloração de Gram. Informações dos pacientes (sexo, idade, local de residência, amostras clínicas investigadas, e resultados da sorologia de HIV, carga viral do HIV e CD4 + células / mm³) foram obtidas a partir do sistema informatizado "iDoctor hospital" usado na FMT-HVD.

Deteção e identificação de fungos patogênicos por meio de métodos convencionais: Foi realizado utilizando métodos de identificação bioquímicos e micro-morfológicos tradicionais, exatamente como descrito anteriormente (Hall et al.,2012). Inicialmente, as amostras de CFS foram centrifugadas (5000 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante (90% do volume inicial) foi cuidadosamente removido. As lâminas foram para exame direto de microscopia, sendo preparadas com (20-50 µL) de CFS (obtida por centrifugação) e hemocultura (sem tratamento prévio) usando as colorações de Nanquim para visualização de cápsulas de *Cryptococcus spp* e azul lactofenol e KOH a 10% para a visualização de células fúngicas em geral. As culturas de amostras de 100-200 µL (CFS e hemocultura) foram realizados por meio de ágar Sabouraud (BD Difco, Faísca, EUA) e agar Mycosel (BD Difco, Sparks,USA). As culturas de fungos desenvolvidas foram inoculados em meio seletivo ágar Níger e CHROMagar™ Candida (BD Difco, Sparks, EUA). Quando os meios seletivos não foram suficientes para a definição das espécies de patógenos isolados, foram posteriormente submetidos a análises micro-morfológicas e fisiológicas dos fungos API20 kit de identificação (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Missouri).

Deteção e identificação de fungos patogênicos por PCR: A geração de produtos de PCR e digestão por enzima endonuclease para subsequente análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), foram realizadas como descrito por Santos et al., 2012. O DNA foi extraído de amostras de 200 ul (amostras biológicas), utilizando o QIAamp Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado por absorvância a 260 nm utilizando espectrofotômetro GeneQuant (Eppendorf, Hamburgo, Germany). Vinte nanogramas do DNA extraído serviram

como molde para a amplificação pela PCR. As reações de PCR foram realizadas num volume total de 25 µl contendo tampão de PCR (concentração final: 1x, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 200 nM de iniciadores ITS5 (5'-3-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (ambos os iniciadores foram descrito por Irobi et al., 1999, 50 µM de dNTP e 1 U de Taq DNA polimerase. PCR foi efetuada utilizando um termociclador (de Kyratec Supercycle-Seul, Sul da Korea) com as seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min a 94 ° C, 40 ciclos de 30 s a 94 ° C (desnaturação), 30 segundos a 50 ° C (anelamento), 90 segundos a 72 ° C (extensão), e uma extensão final de 10 min a 72 ° C os produtos. PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com SYBR® Green (SYBR safe do gel do DNA stain, Invitrogen, Carlsbad, USA). Um DNA Ladder mix (SM0331, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) serviu como marcador de tamanho do produto da PCR. A identificação dos produtos positivos da PCR foi realizada por RFLP. os produtos de amplificação foram digeridos com 10 U da enzima de restrição Ddel (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituânia) durante 3 horas a 37 ° C e sujeito a eletroforese como descrito acima. Os tamanhos dos produtos da PCR e os fragmentos de restrição gerados dos isolados foram comparadas com as sequências de nucleótidos correspondentes previamente descritos (Irobi et al., 1999).

Detecção e identificação de patógenos fúngicos por FISH: Inicialmente, FISH foi feita usando a sonda pan-fungal, e quando positivas foram usadas sondas específicas para cada espécie. Detalhes de cada uma das sondas usadas no presente estudo estão na Tabela 1. Todas as amostras foram contra-coradas com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole-dicloridrato).

Tabela 1: As informações sobre as sondas utilizadas no presente trabalho.

Microrganismo alvo	Sonda	Seqüência (5'-3')	Concentração de formamida no tampão de hibridização (% v/v)	Concentração de NaCl no tampão de lavagem (M)	Autor
<i>C. albicans</i>	Caal	GCCAAGGCTTATACTCGCT	30	0.112	Kempf[8]
<i>C. glabrata</i>	Cagl	CCG CCA AGC CAC AAG GAC T	30	0.112	Kempf[8]
<i>C. parapsilosis</i>	Capa	CCTGGTTCGCCAAAAGGC	20	0.225	Kempf[8]
<i>Aspergillus fumigatus.</i>	Afum	TGATACATTCCGAG	25	0.159	Wang[26]
<i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i>	Cne 205	CCAGCCCTTATCCACCGA	20	0.225	Martins[12]
<i>H. capsulatum</i>	Hca1	AGTCGAGGCTTTCAGCATGT	30	1.112	Silva Jr[27]
<i>Fungi</i>	Pan Fungal	CTCTGGCTTCACCCTATTC	30	0.112	Amann[23]

As amostras de CFS foram centrifugadas a 10000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente. O pellet contendo células foi lavado com 500 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (130 mM de cloreto de sódio, tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.2) e fixado durante 4 h com 4% w / v de paraformaldeído em PBS a 4 °C. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspendeu-se em um volume de PBS e um volume de etanol absoluto frio e foram armazenadas a -20 ° C até a sua utilização. Para a investigação das hemoculturas pré-incubados, 0,5 ml de ácido acético (100%) foi adicionado a 5 mL de hemocultura para lisar os eritrócitos. A suspensão foi centrifugada a 10000 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi rejeitado e as células do pellet formado foram tratadas seguindo o mesmo procedimento descrito para o tratamento do sedimento obtido com amostras de CFS.

O ensaio de FISH foi realizado como descrito (Amann et al.,1990). As células fixadas foram transferidas para lâminas de microscópio previamente limpas e secas a 37 ° C durante 20 min, resultando no esfregão. O último foi coberto com um tampão de hibridação (NaCl 0,9 M, 0,01% w / v de SDS, 20 mM Tris-HCl pH 7,2, formamida e 1 μ M de sonda) e incubou-se a 46 ° C durante 2 horas. Após este período, as lâminas foram lavadas com um tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,01% w / v de SDS, EDTA 5 mM e NaCl durante 30 minutos a 46 ° C). A concentração de formamida no tampão de hibridação e de NaCl no tampão de lavagem, respectivamente, variou de acordo com a sonda (Tabela 1). As lâminas microscópicas foram secas a 37 ° C durante 20 min, em seguida, foram montadas com solução Vectashield (Vector, Burlingame, CA, EUA) e examinadas com um microscópio Zeiss Axioskop 40 (Zeiss, Jena, Alemanha).

5 RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão apresentados na forma de artigos originais.

O primeiro artigo intitulado “**Fluorescent *in situ* hybridisation of pre-incubated blood culture material for the rapid diagnosis of histoplasmosis**” estudou o desenvolvimento das duas sondas específicas marcadas com fluorescência para detecção de *Histoplasma capsulatum* por meio de FISH. Este artigo foi publicado na revista *Medical Mycology* em 23.12.2014 (Anexo I).

O segundo artigo, intitulado “**Evaluation of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses**”, investigou a identificação dos agentes fúngicos importantes para pacientes com HIV / AIDS; *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *H. capsulatum* por meio de FISH. Este artigo foi submetido para a revista *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* em 06.10.2014 e aceito para publicação em 18.01.2015 (Anexo II).

5.1 ARTIGO 1

Publicado na Revista *Medical Mycology (Oxford Journals)* primeiramente publicado online em 23 de dezembro de 2014

Fluorescent *in situ* hybridisation of pre-incubated blood culture material for the rapid diagnosis of histoplasmosis

Roberto Moreira da Silva Jr¹, João Ricardo da Silva Neto², Carla Silvana Santos², Kátia Santana Cruz², Hagen Frickmann³, Sven Poppert⁴, Daniela Koshikene⁵, João Vicente Braga de Souza⁵.

¹Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil

²Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil

³Department of Tropical Medicine at the Bernhard Nocht Institute, German Armed Forces Hospital of Hamburg, Hamburg, Germany

⁴Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany.

⁵Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil

Short Title: Diagnosis of histoplasmosis by FISH

Keywords: histoplasmosis; FISH; molecular probes; development

Contact: João Vicente Braga de Souza

Biotecnólogo/Tecnologista Pleno III

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde

Laboratório de Micologia

3643-3055 ou 3643-3056

Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus - AM

joao.souza@inpa.gov.br

Abstract

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) has been shown to be useful for the detection of *Candida* and *Cryptococcus* species in blood culture materials. FISH procedures for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* have not been reported so far. This study describes the development and evaluation of fluorescently labelled rRNA-targeting FISH probes to detect and identify *H. capsulatum* in blood cultures. All three analysed *H. capsulatum* reference strains and clinical isolates showed positive signals with the newly designed specific oligonucleotide probes for *H. capsulatum*, whereas negative reactions were observed for all three non-target yeast species and the two non-target bacteria. The assay was also successfully applied for detections of *H. capsulatum* cells in pre-incubated blood culture samples of patients with clinical suspicion of histoplasmosis (n=33). The described FISH-based assay was shown to be easy to apply, sensitive and specific (compared to PCR) for the detection and identification of *H. capsulatum* in this proof-of-principle analysis. Larger multi-centric assessments are recommended for a thorough diagnostic evaluation of the procedure.

Keywords: histoplasmosis; FISH; molecular probes; development

Introduction

Histoplasmosis is a widespread systemic infection that is frequently associated with respiratory symptoms and is caused by the fungus *Histoplasma capsulatum*. *H. capsulatum* can produce disseminated infections associated with high morbidity and mortality in HIV/AIDS patients. Traditional microbiological diagnosis is based on microscopic assessment of fluids and tissues, serological techniques, and microbial cultures including blood cultures¹⁻³.

Blood culture diagnosis is typically performed by continuously reading, automated computed systems that detect microorganism growth. If the microcomputer flags samples as positive, gram stain examination is performed followed by subculture on selective and non-selective agars^{4,5}. This traditional assessment (sub-cultures) is slow in disseminated fungal infections. After the detection of microbial growth by the continuously monitoring blood culture systems, species identification can typically be achieved in 1-3 days for *Candida* spp., 3-5 days for *Cryptococcus* spp., and 10-25 days for *H. capsulatum*. More rapid procedures for the detection of *H. capsulatum* in positive blood culture materials are desirable for an early initiation of an appropriate therapy.

Molecular techniques, typically based on PCR, have been developed to detect fungal species in a short period of time; these techniques include nested PCR, multiplex PCR, real-time

PCR, and microarrays. These methodologies have shown reliable and fast results^{1,3,6-9}. Another alternative molecular diagnostic approach is fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). Targeting the fungal ribosomal RNA of target cells, FISH is a rapid technique that is easy to apply, requiring no more than standard laboratory equipment including an incubator and a fluorescence microscope¹⁰.

FISH from blood culture materials has been shown to provide reliable results for the detection of *Candida* and *Cryptococcus* spp.¹¹⁻¹⁴. However, no FISH procedure for the detection of *H. capsulatum* has been evaluated so far. The aim of this study was the design of a FISH probe targeting *H. capsulatum* and its evaluation with pre-incubated blood culture materials of histoplasmosis patients.

Materials and methods

Blood samples. A total of 33 blood samples from HIV-positive patients with clinical diagnosis of invasive mycosis were investigated. Additionally, blood samples of healthy donors were inoculated with three *H. capsulatum* strains (FMT 1400, FMT 2279, FMT 2283) and other clinically relevant fungal and bacterial species (see Table 1 in the Results and Discussion section) to be used as positive and negative controls, respectively.

Microbial reference strains. The following microorganisms were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) or from the National Institute for Amazon Research (INPA) microbial collection and were used for the evaluation of the specificity of oligonucleotide probes: *Candida albicans* ATCC 3623, *Cryptococcus neoformans* (formerly *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) FMT1420, *Cryptococcus gattii* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*) FMT1170, *Histoplasma capsulatum* (FMT 1400, FMT 2279, FMT 2283), *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Blood culture assessment. Aerobic blood culture bottles were inoculated with 10 ml blood and incubated in an automated BACTEC 9120 blood culture system (Becton-Dickinson, New Jersey, USA). Incubation was performed according to the manufacturer's recommendations at 35°C. Aliquots of the blood culture suspensions were taken aseptically (needle syringe) from the bottles considered positive by the automated system. One aliquot was used for conventional investigation, one aliquot for PCR and one aliquot for FISH staining.

Conventional methods: Two hundred microliters of the blood culture was transferred to the surface of Sabouraud agar (Becton-Dickinson, Sparks, USA). Colonies growing on Sabouraud agar were identified by standard laboratory methods, including micro-morphological and physiological tests (germ tube production, growth on Agar Niger and CHROMagar™ *Candida* (Becton-Dickinson, Sparks, USA), incubation at 42°C, and testing for carbohydrate and nitrogen assimilation and carbohydrate fermentation) ¹⁷.

PCR. The generation of PCR products was performed as described by Sampaio¹⁶. DNA was extracted from samples (200 µL blood culture) using the QIAamp Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommendations. Twenty nanograms of the extracted DNA served as template for PCR amplification. PCR was performed in a total volume of 25 µL containing PCR buffer (final concentration: 1x, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 nM of primers HcIII (5-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3) and HcIV (5-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3) (both primers were described by Bialek et al.¹⁸), 50 µM dNTPs, and 1 U AmpliTaq DNA polymerase. PCR was performed using a thermocycler (Kyratec SuperCycler, Seoul, South Korea) with the following conditions: initial denaturation for 5 min at 94° C, 40 cycles for 30 s at 94°C (denaturation), 30 s at 70°C (annealing), 90 s at 72°C (extension), and a final extension for 10 min at 72°C. PCR products were visualised by electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with SYBR® Green (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Carlsbad, USA). A DNA Ladder Mix (SM0331, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) served as the size marker.

FISH. We developed two *Histoplasma capsulatum* specific FISH probes, 5'-labelled with the red sulfoindocyanine dye Cy3, targeting the ribosomal 18S subunit Hca1 (5'-AGTCGAGGCTTTCAGCATGT-3') and Hca2 (5'-CTGACGACCATTAAGCCAGC-3'). The probes were designed using the Primer 3 software (www.primer3.com) with data extracted from NCBI nucleotide. *In silico* evaluation was performed with the software probeCheck (www.microbial-ecology.net/probecheck/) using the sequence collection program SILVA ²⁰.

The FISH reactions were carried out by using the probes Hca1 and Hca2 separately. Some experiments were carried out by using both probes simultaneously in order to investigate the influence of the interaction on the fluorescent signal. In addition to the probes, all the samples were counter-stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride).

For the investigation of pre-incubated blood cultures, 0.5 ml acetic acid (100%) was added to 5 ml blood culture medium to lyse the erythrocytes. The suspension was centrifuged at 10,000 g for 5 min; the pellet containing cells was washed with 500 µL of phosphate-buffered saline (PBS) (130 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2) and fixed for 4 h with 4% w/v paraformaldehyde in PBS at 4°C. After fixation, cells were washed twice with PBS and suspended in one volume of PBS and one volume of cold absolute ethanol and stored at -20°C until use.

The FISH assay was carried out as described by Amann ²¹. The whole fixed cells were transferred to pre-cleaned microscope slides dried at 37°C for 20 min, resulting in smears. The slides were then covered with the hybridisation buffer (0.9 M NaCl, 0.01% w/v SDS, 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 30% formamide and 1 µM probe) and incubated at 46°C for 2 h. After this period, the slides were washed using the wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.01% w/v SDS, 5 mM EDTA and 150 mM NaCl for 30 min at 46°C). The microscope slides were dried at 37°C for 20 min and were then mounted with Vectashield solution (Vector, Burlingame, CA, USA) and examined with a Zeiss Axioskop 40 microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Ethical considerations: Ethical clearance for the study was obtained from the Ethical Committee at the Fundação de Medicina Tropical Heito Viera Dourado, in accordance with Brazilian laws relating to research with human subjects.

Results and Discussion

Artificially inoculated blood culture materials and blood cultures from suspected histoplasmosis patients were examined by culture, PCR and FISH (Table 1).

Table 1: Blood cultures analyzed by conventional diagnostic methods, PCR and by FISH with the probe Hca1 and FISH/185.

Blood Culture	Different methodologies applied for <i>H. capsulatum</i> detection (Time)*		
	Sabouraud Culture†	PCR	FISH/Hca1 and Hca2
Inoculated with <i>H. cap</i> FMT 1400	Positive (10 days*)	Positive (**)	+++ (***)
Inoculated with <i>H. cap</i> FMT 2279	Positive (7 days*)	Positive (**)	++ (***)
Inoculated with <i>H. cap</i> FMT 2283	Positive (12 days*)	Positive (**)	++ (***)
Inoculated with <i>C. alb</i> ATCC 3623	Negative	Negative	Negative
Inoculated with <i>C. neo</i> FMT1420	Negative	Negative	Negative
Inoculated with <i>C. gat</i> FMT1170	Negative	Negative	Negative
Inoculated with <i>S. aur</i> ATCC 25923	Negative	Negative	Negative
Inoculated with <i>E. col</i> ATCC 25922	Negative	Negative	Negative
Inoculated with <i>H. cap</i> + <i>C. alb</i> + <i>C. neo</i>	Negative	Positive (**)	++ (***)
Patient 14/102	Positive (11 days*)	Positive (**)	++ (***)
Patient 14/504	Positive (11 days*)	Positive (**)	++ (***)
Patient 14/647	Positive (12 days*)	Positive (**)	+ (***)
Others (n=30)	Negative	Negative	Negative

H. cap: *Histoplasma capsulatum* (FMT 1400, FMT 2279 and FMT 2283); *C. alb*: *Candida albicans* ATCC 3623; *C. neo*: *Cryptococcus neoformans* FMT1420; *C. gat*: *Cryptococcus gattii* FMT1170; *S. aur*: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *E. col*: *Escherichia coli* ATCC 25922

† Colonies investigated by a microscopist especially trained for the identification of *H. capsulatum*

* Time necessary for diagnosis after detection of microbial growth by the continuous-monitoring blood culture system.

** Time consumed between 8-12h.

*** Time consumed between 3-5h.

+ bright and intense fluorescence signals of labeled cells;

nd: not determined.

The Hca1 and Hca2 probes allowed the identification of *H. capsulatum* in blood cultures. Both probes presented similar fluorescence signals (Table 1). When probes designed to detect the same microorganism present different signals, the complementary target of one of the probes may be located in a low-accessibility region of the respective rRNA region¹³. The utilisation of both probes simultaneously increased the fluorescence signal; however, their signal when used separately was sufficient for pathogen detection.

The probes allowed the identification of *H. capsulatum* cells in both pure and mixed samples containing *H. capsulatum* and other fungal species and showed negative reactions with the assessed non-target microorganisms (Table 1). The detection limit of our Hca1 and Hca2 probe-based FISH assay was estimated to be 10^3 cells/ml by using serially diluted artificially inoculated blood culture samples.

HCa1 and HCa2 were evaluated for the detection of *H. capsulatum* in blood cultures in comparison with culture-based approaches and PCR (Table 1, Figure 1).

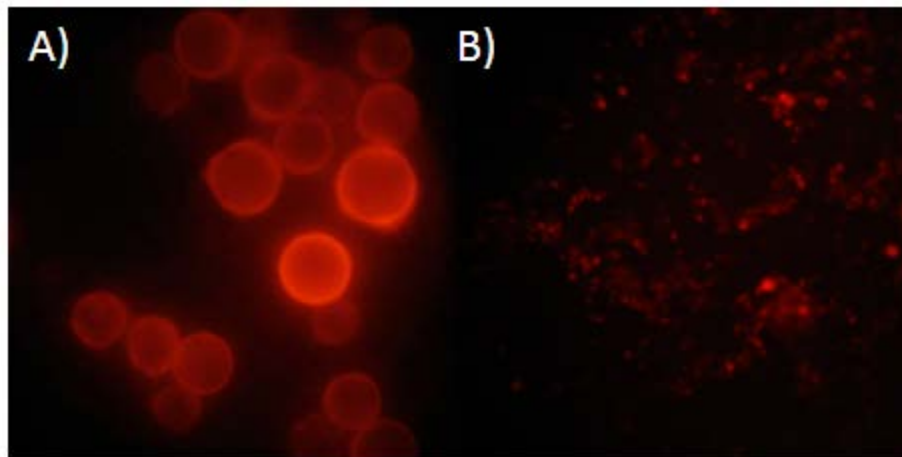


Figure 1: FISH-staining of *H. capsulatum* in a human blood culture sample. Macro conidia (a) and filamentous growth (b) were visualized with the specific HCa1 probe 5'-labeled with Cy3 (red signal).

Traditional morphological and biochemical identification, PCR targeting a 100 kDa protein and FISH showed identical results in our evaluation (three positive detections between the 33 blood cultures that were investigated). However, the time to diagnosis after the detection of microbial growth by the automated blood culture system was, on average, 4 hours, 10 hours and 12 days for the detection by FISH, PCR and culture-based approaches, respectively. In addition, FISH identification of *H. capsulatum* does not require sub-cultures, which is a significant advantage for histoplasmosis diagnosis because *H. capsulatum* cultures must be manipulated under high biosafety containment level facilities.

Our results suggest that FISH might be a useful technology for the correct and timely diagnosis of histoplasmosis infections, which is urgently needed ⁹. FISH procedures combine the speed, sensitivity and specificity of molecular diagnostic methods with the direct observation of the morphologic features of *H. capsulatum* in blood culture materials. This combined approach makes FISH particularly valuable for *H. capsulatum* detection from blood culture materials.

Recent publications have demonstrated the reliability of FISH for the diagnosis of *Candida* spp, *C. neoformans* and *C. gattii* ¹¹⁻¹⁴ from blood culture materials. The data from our proof-of-principle assessment suggest that a FISH probe for *H. capsulatum* should be used, at least in endemic areas.

Several limitations reduce the significance of our analyses, requiring further studies. One limitation is the low number of *H. capsulatum*-positive clinical samples. Large multicentric studies for the diagnostic assessment of the Hca1 and Hca2 probes might overcome this problem. Another limitation is the fact that no blood samples were assessed for the detection of *H. capsulatum*. Thus, conclusions regarding the specificity of Hca1 and Hca2 in blood samples cannot be drawn in this way. Accordingly, future studies should include blood samples, other biological samples and even other detection techniques, including flow cytometry (Flow-FISH). Again, a multi-centric approach would be useful to obtain relevant numbers of respective samples.

In conclusion, the present work described how Hca1 and Hca2 probes might contribute to the identification of *H. capsulatum* in blood culture samples, reducing the risk of missing the diagnosis. Due to the lack of information on the specificity of the probe with clinical materials of patients with invasive fungal infections other than histoplasmosis, the results should be interpreted with care. Future multi-centric studies might help to close this information gap.

Reference

We thank CNPQ, CAPES and FAPEAM for funding this research.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Reference

1. Koepsell S a, Hinrichs SH, Iwen PC. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3395-7. doi:10.1128/JCM.01705-12.
2. Theel ES, Jespersen DJ, Harring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3555-9. doi:10.1128/JCM.01868-13.
3. Buitrago MJ, Canteros CE, Frías De León G, et al. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30(4):256-60. doi:10.1016/j.riam.2013.03.004.
4. Frickmann H, Lakner A, Essig A, Poppert S. Rapid identification of yeast by fluorescence in situ hybridisation from broth and blood cultures. *Mycoses.* 2012;55(6):521-31. doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02214.x.
5. Hall L, Le Febre KM, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH probes for identification of *Candida* species from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1446-8. doi:10.1128/JCM.06148-11.
6. Scheel CM, Zhou Y, Theodoro RC, Abrams B, Balajee SA, Litvintseva AP. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):483-8. doi:10.1128/JCM.02739-13.
7. Gago S, Esteban C, Valero C, Zaragoza O, Puig de la Bellacasa J, Buitrago MJ. A Multiplex Real-Time PCR Assay for Identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* in Samples from AIDS Patients with Opportunistic Pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1168-76. doi:10.1128/JCM.02895-13.
8. Sampaio IDL, Freire AKL, Ogusko MM, Salem JI, De Souza JVB. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(1):34-9. doi:10.1016/j.riam.2011.03.008.
9. Ecker DJ, Sampath R, Li H, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(4):399-415. doi:10.1586/erm.10.24.
10. Rickerts V, Khot PD, Myerson D, Ko DL, Lambrecht E, Fredricks DN. Comparison of quantitative real time PCR with Sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1):202. doi:10.1186/1471-2334-11-202.
11. Shepard JR, Addison RM, Alexander BD, et al. Multicenter evaluation of the *Candida albicans*/*Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):50-5. doi:10.1128/JCM.01385-07.
12. Farina C, Perin S, Andreoni S, et al. Evaluation of the peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation technology for yeast identification directly from positive blood cultures: an Italian experience. *Mycoses.* 2012;55(5):388-92. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02166.x.

13. Martins ML, Ferreira a S, Sampaio a, Vieira R, Inácio J. Direct and specific identification of *Cryptococcus neoformans* in biological samples using fluorescently labelled DNA probes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(5):571-6. doi:10.1007/s10096-010-0897-z.
14. Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, Merz WG. Use of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3802-3. doi:10.1128/JCM.01127-07.
15. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, et al. Evaluation of Two Nested PCR Assays for Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human Tissue Evaluation of Two Nested PCR Assays for Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human Tissue. 2002. doi:10.1128/JCM.40.5.1644.
16. Sampaio IDL, Freire AKL, Ogusko MM, Salem JI, De Souza JVB. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Iberoam Micol*. 2012;29(1):34-9. doi:10.1016/j.riam.2011.03.008.
17. Frías De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes MDR. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):673-9. doi:10.1128/JCM.05271-11.
18. White, T.J., T. Bruns, S. Lee and JWT. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J WTJ, ed. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. New York: Academic in Press; 1990:315-322.
19. Irobi J, Schoofs a, Goossens H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. *Mol Cell Probes*. 1999;13(6):401-6. doi:10.1006/mcpr.1999.0266.
20. Loy A, Arnold R, Tischler P, Rattei T, Wagner M, Horn M. probeCheck--a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environ Microbiol*. 2008;10(10):2894-8. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01706.x.
21. Amann RI, Krumholz L, Stahl D a. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*. 1990;172(2):762-70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=208504&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ARTIGO 2: Aceito para publicação na revista *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* em 18.01.2014.

Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses

Roberto Moreira Da Silva Jr¹
Email: robertomsjr@hotmail.com

João Ricardo Da Silva Neto²
Email: netto.23@hotmail.com

Carla Silvana Santos²
Email: carlasilvana@oi.com.br

Hagen Frickmann³
Email: frickmann@bni-hamburg.de

Sven Poppert⁴
Email: svenpoppert@gmx.de

Kátia Santana Cruz²
Email: katia.cruz@fmt.am.gov.br

Daniela Koshikene⁵
Email: danielakoshikene@policiacivil.am.gov.br

João Vicente Braga De Souza^{6,7,*}
Email: joao.souza@inpa.gov.br

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil

² Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil

³ Department of Tropical Medicine at the Bernhard Nocht Institute, German Armed Forces Hospital of Hamburg, Hamburg, Germany

⁴ Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

⁵ Instituto de Criminalística, Manaus, Brazil

⁶ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil

⁷ Biotecnólogo/Tecnologista Pleno III, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, Laboratório de Micologia, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, AM CEP 69060-001, Brazil

* Corresponding author. Biotecnólogo/Tecnologista Pleno III, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, Laboratório de Micologia, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, AM CEP 69060-001, Brazil

Abstract

The aim of this study was to evaluate the diagnostic performance of in-house FISH (fluorescence in situ hybridisation) procedures for the direct identification of invasive fungal infections in blood cultures and cerebrospinal fluid (CSF) samples and to compare these FISH results with those obtained using traditional microbiological techniques and PCR targeting of the ITS1 region of the rRNA gene. In total, 112 CSF samples and 30 positive blood cultures were investigated by microscopic examination, culture, PCR-RFLP and FISH. The sensitivity of FISH for fungal infections in CSF proved to be slightly better than that of conventional microscopy (India ink) under the experimental conditions, detecting 48 (instead of 46) infections in 112 samples. The discriminatory powers of traditional microbiology, PCR-RFLP and FISH for fungal bloodstream infections were equivalent, with the detection of 14 fungal infections in 30 samples. However, the mean times to diagnosis after the detection of microbial growth by automated blood culture systems were 5 hours, 20 hours and 6 days for FISH, PCR-RFLP and traditional microbiology, respectively. The results demonstrate that FISH is a valuable tool for the identification of invasive mycoses that can be implemented in the diagnostic routine of hospital laboratories.

Keywords

FISH, Invasive mycoses, CSF, Blood culture, rRNA, Hybridisation

Introduction

The number of invasive fungal infections has increased over the last few decades. This phenomenon is the result of the growing number of pathological or iatrogenic immunocompromising conditions, premature births, neoplasms, abdominal surgeries, medical device insertion procedures and antibiotic therapies [1,2].

In northern Brazil, specifically in the state of Amazonas, histoplasmosis and cryptococcosis are some of the most frequent causes of death in AIDS patients [3], and candidemia is a problem in neonatal intensive care units [4]. In northern Brazil, the current diagnostic procedures at the hospital laboratories for the detection and identification of invasive fungal infections include culture (blood cultures, clinical specimens cultured on selective fungal media), biochemical methods, microscopic morphological determination and immunological assays. However, these traditional methods are time consuming, and their sensitivity for early detection is low [5]. To overcome these limitations, molecular approaches can be used for the detection and identification of pathogenic fungi [6].

Molecular techniques, particularly PCR-based approaches, have been developed to detect fungi in a short period of time; these approaches include nested PCR, multiplex PCR, real-time PCR and microarray techniques [7]. Although they have shown convincing results, the assays remain expensive, and definitive results are guaranteed only after several hours of hands-on time by highly experienced microbiologists [7-9].

Fluorescence in situ hybridisation (FISH) has already been successfully implemented in clinical microbiology for the identification of various pathogens, including fungi [10-15]. The hybridisation of fixed fungi with fluorescently labelled oligonucleotide probes that are complementary to unique target sites on the ribosomal RNA allows direct microscopic visualisation without prior amplification steps, even from blood culture smears. As an alternative to DNA-based FISH probes, peptide nucleic acid (PNA) probes with a neutral backbone may be used, although these probes are considerably more expensive [10,12].

The literature contains several studies that have evaluated FISH for the detection and identification of *Candida* spp.[12,16,17] and for the detection of pathogenic *Cryptococcus* spp.[14]. This study is the first demonstration of the application of FISH for the routine

identification of the primary causative agents of invasive fungal infections in a diagnostic laboratory in South America. The aim of this study was to evaluate FISH for the identification of fungi directly from positive blood cultures and cerebrospinal fluid samples of patients with suspected invasive mycosis.

Materials and methods

Biological samples

Samples were collected from patients who had been referred to the Mycology Laboratory of the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil (FMT-HVD) between November 2013 and April 2014. In total, 142 biological samples were investigated, including 112 cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with a clinical diagnosis of cryptococcosis and 30 blood cultures that had presented positive results (CO₂ production) in a blood culture system BACTEC 9120 (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA); however, these blood samples were negative for bacteria according to Gram stain analysis. Anonymised patient information (sex, age, place of residence, clinical specimen investigated, HIV serology results, HIV viral load and CD4⁺ cell count) was obtained from the computerised system “iDoctor Hospital”, which is used at FMT-HVD.

Detection and identification of pathogenic fungi by conventional methods

The detection and identification of pathogenic fungi were performed using traditional biochemical and micro-morphological identification methods as previously described [18]. Initially, the CSF samples were centrifuged (5000 × g per 15 min), and the supernatant (90% of the initial volume) was carefully removed. Slides for direct microscopic examination were prepared with samples (20–50 µL) of CSF following centrifugation (5000 × g, 5 min) and of blood cultures (without any previous treatment). India ink was used for the visualisation of *Cryptococcus* spp. capsules, and lactophenol cotton blue and 10% potassium hydroxide (KOH) were used for the visualisation of general fungal cells. Cultures from 100–200 µL samples (CSF and blood culture) were grown using Sabouraud agar (BD Difco, Sparks, USA) and Mycosel agar (BD Difco, Sparks, USA). The fungal cultures were inoculated on Niger seed agar and CHROMagar™ *Candida* selective media (BD Difco, Sparks, USA). When the selective media were insufficient for the determination of the pathogens' species, the isolates were subsequently subjected to micro-morphological and physiological tests using the fungal identification kit API20 (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA).

Detection and identification of pathogenic fungi by PCR-RFLP

PCR product generation and subsequent digestion for RFLP analysis was performed as described by Santos [19]. DNA was extracted from 200 µL biological samples using a QIAamp Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA was quantified by absorbance at 260 nm using a GeneQuant spectrophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Twenty nanograms of the extracted DNA served as template for PCR amplification. PCR reactions were performed in a total volume of 25 µL containing PCR buffer (final concentration: 1x; 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 nM of the primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (both primers were described previously by Irobi et al.[20]), 50 µM dNTPs, and 1 U ampli-Taq DNA polymerase. PCR was performed using a thermocycler (Kyratec SuperCycler, Seoul, South Korea) with the following conditions: initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 40 cycles for 30 s at 94°C (denaturation), 30 s at 50°C (annealing), and 90 s at 72°C (extension), with a final extension for 10 min at 72°C. The PCR products were

visualised by electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with SYBR® Green (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A DNA Ladder Mix (SM0331, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) served as the size marker. The positive PCR products were identified using RFLP. The amplicons were digested with 10 U of the restriction enzyme DdeI (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) for 3 h at 37°C and subjected to electrophoresis as described above. The sizes of the PCR products and restriction fragments generated from the isolates were compared with the corresponding previously described nucleotide sequences [20].

Detection and identification of pathogenic fungi by FISH

The initial FISH reaction was performed using the pan-fungal probe, and then specific probes for each fungal species were used when fungal structures were found. These probes were chosen because of their high specificity and because of the absence of cross-reactions with other fungal species. The details of each probe used in the present study are presented in Table 1. In addition to the probes, the samples were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride).

Table 1: **Information regarding the probes used in the present study**

Target microorganisms	Probes	Sequences (5'-3')	Formamide content in hybridisation buffer (% v/v)	NaCl content in wash buffer (M)	Authors
<i>C. albicans</i>	Caal*	GCCAAGGCTTATACTCGCT	30	0.112	Kempf [10]
<i>C. glabrata</i>	Cagl*	CCG CCA AGC CAC AAG GAC T	30	0.112	Kempf [10]
<i>C. parapsilosis</i>	Capa*	CCTGGTTCGCCAAAAAGGC	20	0.225	Kempf [10]
<i>Aspergillus spp.</i>	Asp*	TGATACATTCCGAG	25	0.159	Wang [21]
<i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i>	Cne205*	CCAGCCCTTATCCACCGA	20	0.225	Martins [14]
<i>H. capsulatum</i>	Hca1*	AGTCGAGGCTTTCAGCATGT	30	1.112	Silva Jr [22]
Fungi	Pan fungal**	CTCTGGCTTCACCCTATTC	30	0.112	Amann [23]

* Oligonucleotide probe synthesised and directly 5'-labelled with the hydrophilic sulphoindocyanine fluorescent dye Cy3 (Thermo Hybaid, Ulm, Germany).

** Oligonucleotide probe synthesised and directly 5'-labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Thermo Hybaid, Ulm, Germany).

The CSF samples were centrifuged at $10000 \times g$ for 5 min at room temperature. The pellet containing cells was washed with 500 μL of phosphate-buffered saline (PBS; 130 mM sodium chloride and 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)) and fixed for 4 h with 4% w/v paraformaldehyde in PBS at 4°C. After fixation, the cells were washed twice with PBS, suspended in one volume of PBS and one volume of cold absolute ethanol and stored at -20°C until use.

For the investigation of pre-incubated blood cultures, 0.5 ml acetic acid (100%) was added to 5 ml blood culture medium to lyse the erythrocytes. The suspension was centrifuged at $10000 \times g$ for 5 min. Then, the supernatant was discarded, and the pellet containing cells was treated following the same procedures described for treating the pellet obtained with CSF samples.

The FISH assay was performed as described by Amann [24]. The whole fixed cells were smeared onto precleaned microscopic slides and dried at 37°C for 20 min. Next, the slides were covered with hybridisation buffer (0.9 M NaCl, 0.01% w/v SDS, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), formamide and 1 μM probe) and incubated at 46°C for 2 h. After this period, the slides were washed with wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.01% w/v SDS, 5 mM EDTA and NaCl) for 30 min at 46°C. The concentrations of formamide and NaCl in the hybridisation buffer and wash buffer, respectively, varied according to the probe (Table 1). Then, the slides were dried at 37°C for 20 min, mounted in Vectashield solution (Vector, Burlingame, CA, USA) and examined using a Zeiss Axioskop 40 microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Ethical considerations

Ethical clearance for this study was obtained from the Ethical Committee at the Fundação de Medicina Tropical Heito Viera Dourado in accordance with Brazilian laws relating to research with human subjects.

Results

Conventional microscopy (India ink) and FISH were performed to confirm or exclude the presence of fungal agents in 112 CSF samples from patients with the clinical suspicion of cryptococcosis. Table 2 displays the calculated sensitivities and specificities of the culture, conventional microscopy and FISH analyses, using PCR for detecting yeast from the *Cryptococcus neoformans* complex, which includes *C. neoformans* and *C. gattii*, in cerebrospinal fluid as a reference. In total, 46 CSF samples tested positive by both conventional microscopy and FISH. In contrast, 2 samples tested positive by FISH and PCR but negative by conventional microscopy.

Table 2: Sensitivity and specificity of culture, microscopy and FISH analyses as calculated using PCR as the gold standard for the detection of *C. neoformans* and *C. gattii* in CSF

			PCR	
			Positive	Negative
Tests compared to PCR	FISH	Positive	48	0
		Negative	0	64
	Sensitivity (%)		100	
	Specificity (%)		100	
	Microscopy (Direct examination)	Positive	46	0
		Negative	2	64
	Sensitivity (%)		95.8	
	Specificity (%)		100	
	Culture	Positive	41	0
		Negative	5	66
	Sensitivity (%)		89.1	
	Specificity (%)		100	

Thirty blood cultures were investigated, and 14 showed positive results with traditional microbiological approaches and with PCR-RFLP and FISH analyses. The identified pathogens included the *C. neoformans* complex (n = 8), *Histoplasma capsulatum* (n = 2) and *Candida albicans* (n = 4). Traditional microbiological approaches and PCR-RFLP and FISH analyses showed identical results for the blood culture materials. However, the mean times to diagnosis after the detection of microbial growth in the automated blood culture system were 5 hours, 20 hours and 6 days for detection by FISH, PCR-RFLP and traditional microbiological approaches, respectively. Selected FISH images of the identified microorganisms are shown in Figure 1. The patients presenting invasive mycoses included 9 males and 5 females between 12 and 54 years of age. Nine patients were serologically positive for HIV, with viral loads between 75.098 and 554.987 copies/ml and with CD4⁺ cell counts between 211 and 669 CD4⁺ lymphocytes/ml.

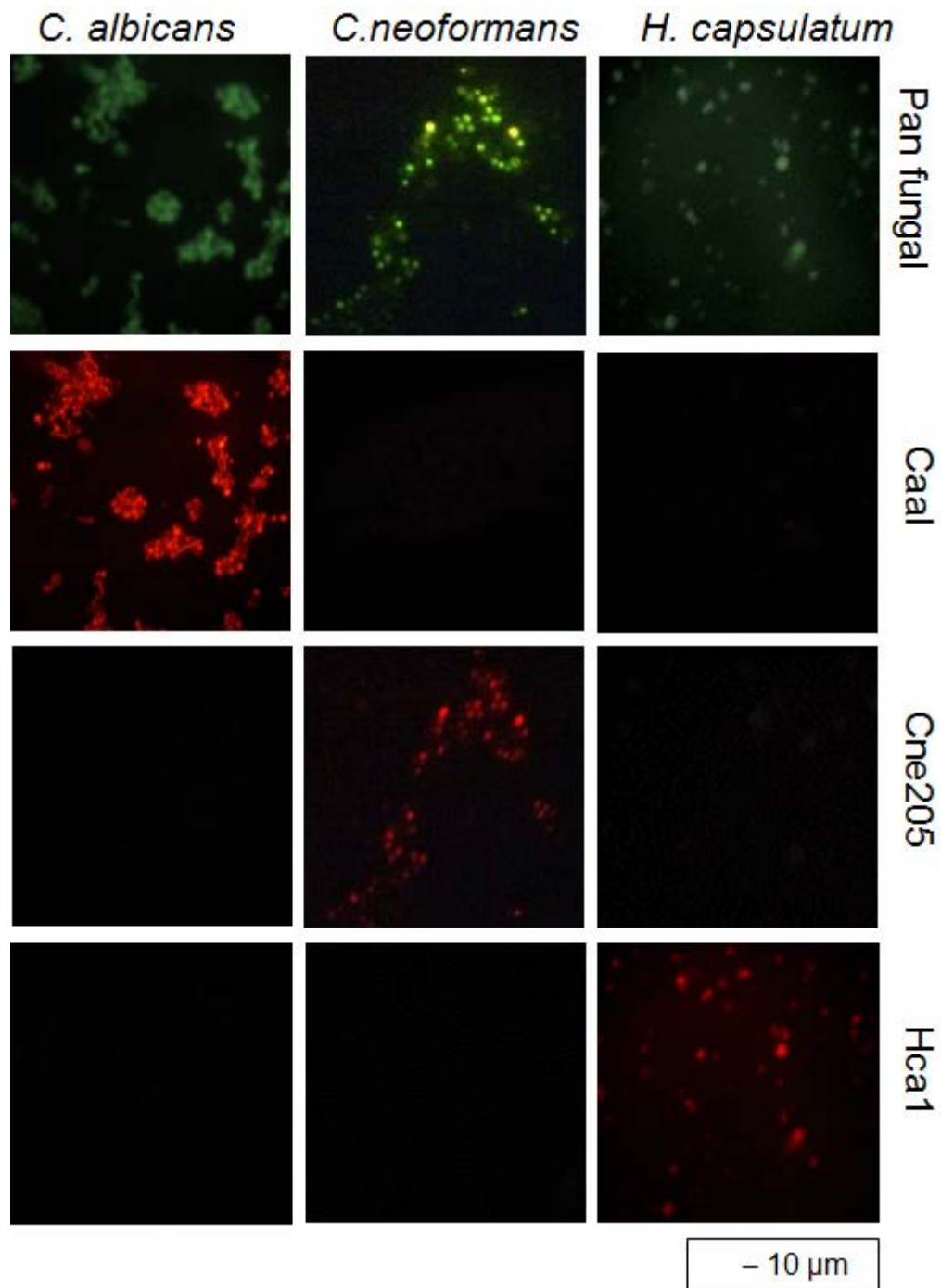


Figure 1: Fluorescence microscopy of microorganisms after FISH with various oligonucleotide probes. *C. albicans*, *C. neoformans* and *H. capsulatum* (vertical columns) were stained with FISH with probes Pan Fungal (green signal; specific for all fungi) and Caal (specific for *C. albicans*), Cne 205 (specific for *C. neoformans* and *C. gattii*), and Hca1 (specific for *H. capsulatum*), each Cy3 labelled (red signal).

Discussion

The present work demonstrated the application of FISH for the routine detection of the primary causative agents of invasive fungal infections in patients in a diagnostic laboratory in South America. Molecular methods, including PCR and FISH, have been developed for the rapid identification of fungal agents from primary sample materials. FISH is a comparatively inexpensive and easy-to-perform molecular method that has already been successfully implemented in clinical microbiology for the identification of pathogenic species of *Candida* and *Cryptococcus* [13,16,25].

The sensitivity of FISH for fungal infections in CSF proved to be slightly better than conventional microscopy (India ink) under the experimental conditions and allowed the detection of two cryptococcosis patients who were missed by conventional microscopy. Martins et al. [14] also demonstrated that FISH presented better results than India Ink microscopy under their experimental conditions. FISH most likely allowed the detection of fungi cells that had an altered capsular appearance caused by antifungal treatment [26], while India Ink microscopy did not. A multi-centric approach to obtain the numbers of respective samples needed to perform a statistical comparison is now necessary.

Fourteen blood cultures from patients with suspected systemic fungal infections showed positive results. The traditional microbiological approaches and PCR-RFLP and FISH analyses gave the same results in terms of the detection (100% sensitivity) and identification of the fungal agents. However, traditional microbiological assays require the sub-culturing of blood culture samples; microscopic assays, including India ink, lactophenol cotton blue and Gram staining; and biochemical assays, including sugar assimilation, sugar fermentation and enzyme production tests. These assays are slow, requiring 3–10 days and trained microbiologists. PCR-RFLP requires DNA extraction, PCR and electrophoresis to assess the PCR products. In addition, the PCR products must be digested by restriction enzymes, and the RFLP profiles must be evaluated. These steps require at least 20 hours and trained staff with experience in molecular techniques. FISH is robust, easier to perform, and considerably faster, with a time-to-result of up to 5 hours.

In addition to these results, FISH demonstrated the capability of identifying the fungi directly in the biological samples and did not require sub-cultures; these characteristics are essential for conventional diagnoses. This capability is a great advantage for histoplasmosis diagnosis because *H. capsulatum* cultures should be manipulated under high biosafety containment conditions [27]. Notably, the present study is the first demonstration of the possibility of FISH using combinations of these six adopted probes.

In the present work, 16 blood cultures presented “microbial growth” in the blood culture system but did not present bacterial (Gram stain) or fungal growth (traditional microbiological assays, FISH and PCR). The false detection of microbial growth by blood culture systems has been previously described [28]. The simultaneous lack of detection by FISH and by the other techniques (PCR-RFLP and culture) demonstrated the adequate specificity of the FISH technique.

Regarding the limitations of the present study, we did not use latex agglutination tests to investigate the presence of cryptococcal polysaccharide antigen in the CSF samples. However, Martins et al. [14] developed the *Cryptococcus* probes that were used in the present work and demonstrated that FISH and the latex agglutination test present similar results when these probes were used. Another limitation is that the combination of probes in this paper did not cover other possible pathogens; however, this limitation was mitigated because the choice of probes used was based on research by Souza et al. [14], who demonstrated the predominant species of fungi that cause invasive mycoses in patients in northern Brazil.

Previous studies have demonstrated that FISH is a useful tool for environmental microbiology studies [23]. The improvement of this technology (the utilisation of enzymes and PNA probes

and the association with flow cytometry) motivated the development of several works in clinical microbiology [6,16,17,25,29,30]. Specifically in medical mycology, the detection of *Candida* spp. motivated most of these studies and resulted in the production of commercial kits [16]. Recently, FISH probes were developed for detecting *Cryptococcus* spp. [14] and *H. capsulatum* [21]. Additionally, these studies have clearly demonstrated that the FISH technique is more effective with biological samples that present high fungal cell contents, such as the specimens that were selected for the present work.

This study is the first to assess the detection and identification of important fungal agents, i.e., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *H. capsulatum*, using the routine procedures of an infectious disease hospital in South America. These results suggest that FISH is a valuable, robust, fast and easy to perform tool that can be readily implemented in the diagnostic routine of hospital laboratories.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest exists.

Acknowledgments

This project was conducted with support from the CNPq, FAPEAM and CAPES.

References

1. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA: **Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America.** *Curr Fungal Infect Rep* 2012, **6**:23–34.
2. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD: **A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS.** *Trends Microbiol* 2014, **22**:120–127.
3. Leopoldina S, De Souza S, Vinícius P, Feitoza S, De Araújo JR: **Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Causes of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome autopsied at the Tropical Medicine Foundation of Ama.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2008, **41**:247–251.
4. Oliveira VCM, Saraceni V, Safe IP, Martins AG, Ramos TCA, Souza JVB, Cordeiro-Santos M: **Fatal Outbreak of Polyclonal Candidemia in a Neonatal Intensive Care Unit.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014, **35**:1077–1079.
5. Sangoi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N: **Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens: a ten-year retrospective review at a single institution.** *Am J Clin Pathol* 2009, **131**:364–375.
6. Farina C, Perin S, Andreoni S, Conte M, Fazii P, Lombardi G, Manso E, Morazzoni C, Sanna S: **Evaluation of the peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation technology for yeast identification directly from positive blood cultures: an Italian experience.** *Mycoses* 2012, **55**:388–392.
7. Lass-Flörl C, Mutschlechner W, Aigner M, *et al*: **Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicenter study.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**:863–868.

8. Guarner J, Brandt ME: **Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century.** *Clin Microbiol Rev* 2011, **24**:247–280.
9. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella D: **Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:2252–2258.
10. Kempf VAJ, Trebesius K, Ingo B, Universita LM: **Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures** **Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:830–838.
11. Bisha B, Kim HJ, Brehm-Stecher BF: **Improved DNA-FISH for cytometric detection of *Candida* spp.** *J Appl Microbiol* 2011, 881–892
12. Lakner A, Essig A, Frickmann H, Poppert S: **Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the identification of *Candida albicans* in comparison with three phenotypic methods.** *Mycoses* 2012, **55**:e114–e123.
13. Frickmann H, Lakner A, Essig A, Poppert S: **Rapid identification of yeast by fluorescence in situ hybridisation from broth and blood cultures.** *Mycoses* 2012, **55**:521–531.
14. Martins ML, Ferreira AS, Sampaio A, Vieira R, Inácio J: **Direct and specific identification of *Cryptococcus neoformans* in biological samples using fluorescently labelled DNA probes.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, **29**:571–576.
15. Rickerts V, McCormick Smith I, Mousset S, Kommedal O, Fredricks DN: **Deciphering the aetiology of a mixed fungal infection by broad-range PCR with sequencing and fluorescence in situ hybridisation.** *Mycoses* 2013, **56**:681–686.
16. Hall L, Le Febvre KM, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL: **Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH probes for identification of *Candida* species from positive blood cultures.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**:1446–1448.
17. Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, Weekes E, Johnson JK, Lincalis DP, Venezia RA: **Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3381–3383.
18. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM: *Laboratory Diagnostic Methods in Medical Mycology.* Fundam. Med. Mycol. John Wiley & Sons, Inc.; 2011: pp 31–73
19. Santos MS, Souza ES, Junior RMS, Talhari S, Souza JVB: **Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis.** *Brazilian J Med Biol Res* 2010, **43**:712–716.
20. Irobi J, Schoofs A, Goossens H: **Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA.** *Mol Cell Probes* 1999, **13**:401–406.

21. Wang Y, Chen L, Liu X, Cheng D, Liu G, Liu Y, Dou S, Hnatowich DJ, Rusckowski M: **Detection of *Aspergillus fumigatus* pulmonary fungal infections in mice with (999 m m) Tc-labeled MORF oligomers targeting ribosomal RNA.** *Nucl Med Biol* 2013, **40**:89–96.
22. Silva Jr R, Neto J, Santos C, Cruz K, Frickmann H, Poppert S, Souza JVB: **Fluorescent in situ hybridization of preincubated blood culture material for the rapid diagnosis of histoplasmosis.** *Med Mycol No prelo* 2014.
23. Amann RI, Krumholz L, Stahl DA: **Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology.** *J Bacteriol* 1990, **172**:762–770.
24. Kategaonkar AH, Pokalwar RU, Sonar SS, Gawali VU, Shingate BB, Shingare MS: **Synthesis, in vitro antibacterial and antifungal evaluations of new alpha-hydroxyphosphonate and new alpha-acetoxyphosphonate derivatives of tetrazolo [1, 5-a] quinoline.** *Eur J Med Chem* 2010, **45**:1128–1132.
25. Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, Merz WG: **Use of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:3802–3803.
26. Nosanchuk JD, Cleare W, Franzot SP: **Amphotericin B and Fluconazole Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of *Cryptococcus neoformans* at Subinhibitory Concentrations Amphotericin B and Fluconazole Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cell.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:233–239.
27. Sampaio IDL, Freire AKL, Ogusko MM, Salem JI, De Souza JVB: **Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.** *Rev Iberoam Micol* 2012, **29**:34–39.
28. Qian Q, Tang Y, Kolbert CP, *et al*: **Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16s rrna gene : evaluation of bactec 9240 instrument true- positive and false-positive results direct identification of bacteria from positive blood cult.** 2001: doi: 10.1128/JCM.39.10.3578
29. Bisha B, Kim HJ, Brehm-Stecher BF: **Improved DNA-FISH for cytometric detection of *Candida* spp.** *J Appl Microbiol* 2011, 881–892
30. Shepard JR, Addison RM, Alexander BD, *et al*: **Multicenter evaluation of the *Candida albicans*/*Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**:50–55.

6 CONCLUSÕES

As sondas desenvolvidas Hca1 e Hca 2 demonstraram alta sensibilidade e especificidade neste trabalho, permitindo a identificação de células de *H. capsulatum* em ambas as amostras puras e mistas contendo *H. capsulatum* e outras espécies de fungos.

A identificação morfológica e bioquímica tradicional, FISH e PCR mostraram resultados idênticos em nossa avaliação, no entanto, FISH obteve resultados em um tempo significativamente menor.

As sondas Hca1 e Hca2 podem contribuir para a identificação de *H. capsulatum* em amostras de hemocultura, reduzindo o risco de não haver diagnóstico específico para *H. capsulatum*. Estudos multicentricos devem ser realizados para validar a especificidade destas sondas.

Os resultados obtidos com as amostras de LCR demonstraram que a sensibilidade de diagnóstico da FISH e coloração de nanquim é semelhante para a detecção de leveduras do complexo *C. neoformans*. FISH ainda permitiu a detecção de dois pacientes com criptococose que foram negativos por microscopia convencional.

As abordagens tradicionais microbiológicas, PCR-RFLP e FISH, conduziram aos mesmos resultados em relação à detecção e identificação dos agentes fúngicos importantes para pacientes com HIV / AIDS, ou seja, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *H. capsulatum.*, no entanto, FISH não requer subcultura, tornando mais rápido e fácil o diagnóstico para estas fungemias.

Os resultados sugerem que a FISH é um instrumento valioso, robusto, rápido e fácil de realizar em agentes fúngicos importantes para pacientes com HIV / AIDS, ou seja, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *H. capsulatum* que pode ser aplicado na rotina de diagnóstico de laboratórios hospitalares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberti C; Brun-Buisson C, Burchardi. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Rev Intensive Care Med* 2002 28:108–21.

Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, Bobillo F. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med.* 2003; 29:1069-1076.

Amann,RI; Krumholz L; Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 1990 172 762-770.

Amann RI; Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev* 1995 59 143-169

Atkins SD, Clar IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet*, 2004; 45(1): 3-15.

Aulakh HS, Straus SE, Kwon-Chung KJ. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella bacillispora* (*Cryptococcus bacillisporus*) as determined by deoxyribonucleic acid base composition and sequence homology studies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1981; 31(1): 97-103.

Azevedo NF, Jardim T, Almeida C, Cerqueira L, Almeida AJ, Rodrigues F, Keevil CW, Vieira MJ. Application of flow cytometry for the identification of *Staphylococcus epidermidis* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH) in blood samples. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2011; 100: 463-470.

Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Mittal S, Shivakumar C, Srinivasan M. Microbiological diagnosis of infective keratitis: comparative evaluation of direct microscopy and culture results. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90: 1271–1276.

Blot SI, Vandewoude KH; Hoste EA; Colardyn FA. Effects of Nosocomial Candidemia on Outcomes of Critically ill Patients. *Am J Med.* 2002; 113:480-485.

Borekçi G; Gül den ERSÖZ G; Feza O, Hakan ÖZTURHAN H; Sebahat S; Fatma S; Hilal A, Yusuf ÖZKUL Y; EMEKDAŞ G .Identification of Candida Species from Blood Cultures with Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and Conventional Methods. *Rev Balkan Medical Journal* 2010 27(2) 183-191.

Borges AS; Ferreira MS; Silvestre MTAS; Nishioka AS; Rocha A. Histoplasmose em pacientes imunodeprimidos: Estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG. *Rev Soc Bras Med* 1997 Trop 41(3)

Bovers M; Hagen F; Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. Iberoam. Micol.* 2008; 25(1): S4-S12.

- Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomes C, Serra E. Molecular Detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Human Clinical Samples. *Jorn. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4): 1753-1755.
- Brasil KW, Pinheiro RL, Pimentel IC. Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and Calcofluor White methods. *An bras Dermatol.* 2003; 78(5): 547-551.
- Casadevall A. Host-microbe interactions: fungi – Recent progress in understanding host-fungal interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3(4):332-333.
- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36:599-607.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2816-23.
- Couto FMM, Macedo DPC, Neves RP. Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(6):745-748.
- Dimopoulos G; Piagnerelli M; Berre. Post mortem examination in the intensive care unit: still useful? *Rev Intensive Care Med.* 2004 30 2080- 5
- Dromer F; Mathoulin-Pelissier S; Fontanet A, Ronin O; Dupont B, Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): Comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS* 2004 18 555–562.
- Eggimann P; Garbino J; Pittet D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3:772-785.
- Ferreira MS; Borges AS. Histoplasmoses. *Rev. Socied. Bras. Med. Trop.* 2009. 42(2): 192-198.
- Franzot SP; Salkin IF; Casadevall AF. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, a separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Rev. J. Clin. Microbiol.* 1999 37(3): 838-840
- Freire AKL; Bentes AS; Sampaio IL; Matsuura ABJ; Ogusku MM; Salem JI; Wanke B; Souza JVB. Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. *Mycoses.* 2012; 55:e145-e150.
- Frickmann H, Lakner A, Essig A, Poppert S. Rapid identification of yeasts by fluorescence in situ hybridization from broth and blood cultures. *Mycoses.* 2012;
- Giovannoni SJ; DeLong EF; Olsen GJ; Pace N R. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol* 1988 170 720-726.

Goodwin Jr RA. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. *Southern Medical Journal*. 1973; 66:13-25.

Goodwin Jr RA; Dez Prez RW. Histoplasmosis. *The American Review of Respiratory Disease*, 1978; 117:929-956.

Goodwin RA; Lody JE. Histoplasmosis in normal hosts. *Medicine (Baltimore)*, 1981; 60:231-266.

Gutierrez ME; Canton A; Sosa N; Puga E; Talavera L. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:1199-1202.

Hall L; Le Febre KM; Deml SM; Wohlfel SL; Wengenack NL. Evaluation of the Positive Yeast Traffic Light PNA FISH Probes for Identification of *Candida* Species from Blood Cultures *J. Clin. Microbiol*. 2012; 50(4):1446

Hartmann H; Stender H; Schafer A; Antenrieth IB; Kempf VA. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination of fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(9):4855-4857.

Heil EL; Daniels LM; Long DM; Rodino KG; Weber DJ; Miller MB. Impact of a rapid peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assay on treatment of *Candida* infections. *Am J of Health Syst Pharm*. 2012; 69(21):1910-1914.

Hsu MC; Chen KW; Lo HJ; Chen YC; Liao MH; Lin YH; Li SY. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J. Med. Microbiol*. 2003; 52(12):1071-1076.

Huston SM; Mody CH. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clin. Chest Med*. 2009; 30(2):253-264.

Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*. 2007; 21:2119-2129.

Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):115-132.

Kempf VA, Maendle T, Schumacher U, Schafer A, Autenrieth IB. Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Int. J. Med. Microbiol*. 2005; 295:47-55.

Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38:830-838.

Khawcharoenporn T, Shikuma CM, Williams AE, Chow DC. Lamivudine associated macrocytosis in HIV infected patients. *Int J STD AIDS*. 2007; 18:39-40.

Kivihya-Ndugga L; Cleff MV; Juma E; Joseph Kimwomi; Githui W; Oskam L; Schuitema A; Soolingen DV; Nganga L; Kibuga D; Odhiambo J; Klatser P. Comparison of PCR with the Routine Procedure for Diagnosis of Tuberculosis in a Population with High Prevalences of

Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus. *Journ. Clinic. Microbiol.* 2004; 42(3): 1012–1015.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992. 867p.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(4):574-587.

John HA; Birnstile ML; John KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969, 223 582-587

Lakner A; Essig A; Frickmann H; Poppert S. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the identification of *Candida albicans* in comparison with three phenotypic methods. *Mycoses.* 2012; 55(3):e114–e123.

Lengeler KB; Cox GM; Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Rev Infect Immun* 2001 69(1) 115-122.

Levitz SM, Boekhout T. *Cryptococcus*: the once-sleeping giant is fully awake. *FEMS Yeast Research.* 2006; 6(4):461-462.

Luo G; Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(8):2860-2865.

Martinez LR; Garcia-Rivera J; Casadevall. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains *Rev. J Clin Microbiol* 2001 39(9) 3365-3367.

Markham AF. The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. *BMJ* 1993; 306:441-446.

Mwaba P; Mwansa J; Chintu C; Pabee J; Scarborough M. The clinical presentation, natural history, and the cumulative death rates of 230 adults with primary cryptococcal meningitis among Zambian AIDS patients who were treated under local conditions. *Rev Postgrad Med J.* 2001 77(914) 769–73.

McGinnis S; Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:W20-W25.

Mitchell TG. Update view of *Cryptococcus neoformans* mating type and virulence *Rev. Infect Immun* 2003 71(9) 4829-4830.

Mielle A Filho; Remualdo V. *Biologia molecular aplicada ao diagnóstico de doenças infecciosas. Prát. Hosp. (infect)*, 2007. Ano IX. Nº 53: 33-35.

Moter, A; Gobel, UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of Microorganisms. *J Microbiol Methods.* 2000; 41: 85–112.

Nucci M; Marr KA. Emerging Fungal Diseases. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 251-6.

Oliveira K; Procop GW; Wilson D; Coull J; Stender H. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol*, 2002. 40:247-251.

Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG, Shoham S, reboli A, Barron MA, Sims C, Wood C, Sobel JD. Improvement of a clinical prediction rule for a clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit. *Mycoses*. 2011; 54(1):46-51.

Pappalardo MCSM; Melhem MSC; Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev. Inst Med Trop S Paulo* 2003 45(6) 299-305.

Pappas PG; Rex JH; Lee J; Hamill RJ; Larsen RA; Powderly W; Kauffman CA; Hyslop N; Mangino JE, Chapman S; Horowitz HW; Edwards JE; Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. A prospective Observacional Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clin Infect. Dis*. 2003;37: 634-43.

Pardue JL; Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Kline Biology Tower* 1969

Paschoal RC; Hirata MH; Hirata RC; Melhem MS; Dias ALT Paula CR. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. *Ver. Inst. Med. Trp. São Paulo*. 2004; 46(4): 203-207.

Pfaller MA; Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Cin Microbiol Infect*. 2004; 10(1):11-23.

Pfaller MA; Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis. *Clin Microbiol Reviews*. 2007; 20:133-163.

Pfaller MA; Boyken L; Hollis LRJ; Messer SA; Diekema DJ. Global Surveillance of In Vitro Activity of Micafungin against **Candida**: a Comparison with Caspofungin by CLSI-Recommended Methods *Rev J Clin Microbiol*. 2006 44(10) 3533–3538.

Ramdial KP; Mosam A; Dlova NC; B Satar N; Aboobaker J; Singh SM. Disseminated cutaneous histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev* 2002 29(4):215-25.

Rigby et al. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(6):2182-2186.

Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol*. 1998, 16(8):743-747.

Sampaio, IL; Freire, AKL; Ogusko, MM; Salem, JI; Souza, J.V.B. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Iberoam Micol*. 2012; 29:34-39.

Santangelo R, Zoellner H, Sorrell T, Wilson C, Donald C, Djordjevic J, Shounan Y, Wright L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a marine model. *Infect Immun*. 2004; 72(4):2229-2239.

Santos MS; Souza ES; Junior RMS; Talhari S; Souza JVB. Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Braz J Med Bio Res*. 2010; 43(8):712-716.

Segal E, Baum GL. Pathogenic yeasts and yeasts infections. CRC Press: Boca Raton 1994. 238p.

Sidrim JJC; Costa AKF; Cordeiro RA; Brilhante RSN; Moura FEA; Castelo-Branco DSCM; Araujo MP; Rocha MFG. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can. J. Microbiol*. 2010; 56:445-458.

Silva BK; Freire AK; Bentes AS; Sampaio IL; Santos LO; Santos MS; Souza, JVB. Characterisation of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans-C. gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. *Rev Iberoam Micol*. 2011; 29:40-43.

Souza SLS¹; Feitoza PVS; Araújo JR; Andrade RV ; Luiz Carlos de Lima Ferreira LCL. Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008 41(3)

Trnovsky J; Merz W; Della-Latta P; Wu F; Arendrup MC; Stender H. Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISHFlow. *Rev Journal of Clinical Microbiology* 2008 46 (4) 1537–1540.

Tortorano AM; Kibbler C; Peman J; Bernhardt H; Klingspor L; Grillot R; Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Rev Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27:359-66.

Trick WE; Fridkin SK; Edwards JR; Hajjeh RA; Gaynes RP; National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis*. 2002; 35:627-30.

Zaragora R; Perman J. Invasive fungal infections in critically ill patients: different therapeutic options and a uniform strategy. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23:59-63.

Zaragora R; Perman J. Diagnostic and therapeutic approach to fungal infections in critical care settings: different options but the same strategy. *J Invasive Fungal Infect*. 2007; 1:50-58.

Wheat LJ; Garringer T; Brizendine E & Conolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Rev Diagn Microbiol Infect Dis* 2001 43 29–37.

Wilson, DA; Joyce, MJ; Hall, LS; Reller, LB; Roberts, GD; Hall, GS; Alexander BD; Procop GW. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(6):2909.

Woese CR; Kandler O; Wheelis ML. Towards a Natural System of Organisms: Proposal For the Domains Archaea Bacteria and Eucarya. Rev Proc. Natl. Acad. Sci 87 4576-4579.

Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. Rev Fungal Genet Biol 2002 35 81-97.

8 APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA (TCLE)

TÍTULO DO ESTUDO: DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DE MICOSES SISTÊMICAS UTILIZANDO HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH).

Nome do Voluntário:

Introdução:

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Os pesquisadores responsáveis por este estudo são João Vicente Braga de Souza e Roberto Moreira da Silva Junior. Este termo de consentimento irá informá-lo sobre este estudo e ajudá-lo a decidir se gostaria de participar do mesmo. **A SUA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É VOLUNTÁRIA.** Você tem o direito de recusar ou se retirar do estudo a qualquer momento sem que isto implique em riscos para seu tratamento médico. Se você concordar em participar do estudo, você deverá assinar este documento e receber uma cópia do mesmo.

PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Este estudo está sendo realizado para avaliar um tipo que não é usado na rotina para detecção de fungo (micoses profundas e oportunistas).

COMO SERÁ SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

Se você concordar em participar deste estudo, quando o médico solicitar a pesquisa de fungos em sangue, líquido cefalorraquidiano e aspirado medular, será feita a rotina tradicional do hospital; o técnico do laboratório irá colher a amostra do paciente para pesquisar fungo, e na mesma hora da coleta será separado uma parte da amostra em um tubo para a realização do estudo. Você não precisará ser furado duas vezes para a realização do estudo.

O QUE SERÁ FEITO COM AS AMOSTRAS?

A sua amostra será encaminhada para Laboratório da Gerência de Bacteriologia e será examinada através do método convencional (Hemocultura). O tubo com amostra separada

será encaminhado pelo próprio pesquisador para o laboratório do INPA, onde será feito o estudo.

SE MEU TESTE FOR POSITIVO O MEU MÉDICO RECEBERÁ O EXAME ?

Como ainda não temos certeza que este novo método é melhor que o método tradicional (hemocultura), iremos considerar para diagnóstico da sua doença somente os resultados do método tradicional. Mas, mesmo assim o resultado será entregue ao médico para possíveis análises.

QUEM PODERÁ PARTICIPAR E QUEM NÃO PODERÁ PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Poderão participar deste estudo pessoas de todas as faixas de idade com suspeita de fungos no sangue. Pacientes menores de 18 anos que aceitarem participar do estudo, só serão incluídos se os responsáveis concordarem em assinar o TCLE. Não poderão participar deste estudo, pacientes que não assinarem este documento (TCLE).

EXISTEM RISCOS AO PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Não haverá risco na sua participação no estudo.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS?

É possível que você não tenha nenhum benefício direto ao participar deste estudo, no entanto, se este novo teste for melhor que o convencional ele poderá substituir o teste antigo e desta forma melhorar o diagnóstico da doença. Neste caso, este novo método poderá permitir que mais pessoas possam ser diagnosticadas e tratadas mais rapidamente. No entanto, informaremos o seu médico do resultado dessa nova metodologia.

HAVERÁ ALGUMA DESPESA PARA PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Você não terá despesas para participar do estudo. O diagnóstico e tratamento de suas doenças serão gratuitos e subsidiados pelos hospitais.

HAVERÁ ALGUM TIPO DE PAGAMENTO?

A sua participação neste estudo é voluntária, você não receberá nenhum tipo de pagamento pela sua participação no mesmo.

QUAIS SÃO SUAS ALTERNATIVAS CASO NÃO QUEIRA PARTICIPAR DO ESTUDO?

Caso não queira participar do estudo não haverá nenhum prejuízo, a assistência à sua saúde será feita e todos seus exames requisitados pelo médico serão realizados.

HAVERÁ CONFIDENCIALIDADE DE SUAS INFORMAÇÕES?

Todas as suas informações serão mantidas confidenciais. Você terá um número de registro e seu nome não será usado. Se as descobertas desse estudo forem publicadas, seu nome ou sua identificação não serão divulgados. Sua identidade permanecerá confidencial. Ao participar deste estudo, serão coletadas informações pessoais, mas você tem o **direito de se recusar a responder às perguntas**. Estes dados serão registrados pelos pesquisadores e médicos que irão arquivá-los. As informações serão guardadas após o término do estudo por um período de 6 anos, como recomenda a legislação do país.

QUAIS SÃO OS SEUS DIREITOS?

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem o direito de recusar ou de se retirar do estudo a qualquer momento sem prejuízo a assistência à sua saúde nesta instituição.

AFIRMAÇÕES DO PACIENTE

Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos e benefícios:

SIM..... NÃO

Fui esclarecido sobre a liberdade de desistir de participar a qualquer momento, sem que isso traga prejuízos ao meu atendimento e tratamento. SIM.....NÃO

Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira. SIM.....NÃO

QUEM VOCÊ PODERÁ CONTACTAR CASO TENHA DÚVIDA?

Se você tiver alguma dúvida sobre seu direito como voluntário na pesquisa, você poderá entrar em contato com:

Coordenador do Projeto: Dr. João Vicente Braga de Souza / Tel: (92) 9114-7815 / e-mail: joão.souza@inpa.gov.br / Endereço: Av. André Araújo

Executor dos testes: Roberto Moreira da Silva Junior / Tel: (92) 9203-7075 / e-mail: robertomsjr@hotmail.com / Endereço: Av. André Araújo

Coordenador do Comitê de Ética e Pesquisa da FMT-HVD: Maria Paula Gomes Mourão.
da FMT-HVD:Endereço : Av. Pedro Teixeira, 25 – Bairro D. Pedro I /Tel: (92) 2127-3572

Comitê de Ética e Pesquisa da FMT-HVD:Endereço : Av. Pedro Teixeira, 25 – Bairro D. Pedro I /Tel: (92) 2127-3572

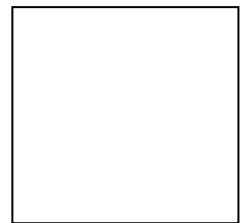
TERMO DE CONSENTIMENTO:

Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento e sei que uma cópia ficará guardada no meu arquivo do estudo. Eu entendo que posso deixar o estudo a qualquer momento que quiser ou que o médico do estudo pode me pedir para deixar o estudo se ele entender que esta decisão é melhor para os meus interesses.

Eu entendo que se eu colocar minha impressão digital no espaço abaixo, eu estou concordando em participar do estudo e a realizar todos os procedimentos dos mesmos estabelecidos neste documento.

Assinatura do Voluntário

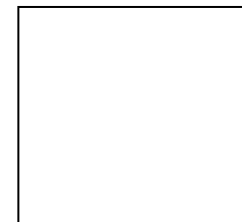
Nome do Voluntário -



Impressão dactiloscópica

Assinatura do responsável

Nome do responsável legal



Impressão dactiloscópica

Assinatura da testemunha

Nome da testemunha

Eu expliquei os objetivos deste estudo para o voluntário. Tenho plena convicção que ele/ela entendeu os objetivos, riscos e benefícios da sua participação no estudo.

Assinatura do investigador

Nome do investigador

Local: _____ Data: _____/_____/_____

9 ANEXOS

9.1 Carta de aceite Artigo 1

10/23/2015

In print

Assunto: Medical Mycology - Decision on Manuscript ID MM-2014-0126.R2

De: irasalkin@informationfromscience.com (irasalkin@informationfromscience.com)

Para: joaovcentebragasouza@yahoo.com.br;

Cc: arunaloke@hotmail.com;

Data: Quinta-feira, 16 de Outubro de 2014 9:42

16-Oct-2014

Dear Dr. Joao Souza:

It is my pleasure to inform you that your manuscript, MM-2014-0126.R2, Fluorescent in situ hybridization of preincubated blood culture material for the rapid diagnosis of histoplasmosis, has been accepted for publication in Medical Mycology. The report and all support materials have been forwarded to the publisher, from whom you will receive, in due course, galley proofs for your review. Once you have returned the proofs, with any corrections, the article will be electronically published ahead of print on the publisher's website. While there will be no page numbers associated with the report, it will carry a DOI, making it trackable and citable. Your manuscript will remain published online in this manner until it is published in a future issue of Medical Mycology.

In the event that you are not an ISHAM member, I would like to take this opportunity to invite you to visit the society's Web site at www.ISHAM.org to obtain a membership form and information on the many benefits provided by ISHAM.

Thank you for submitting your manuscript to Medical Mycology. If you have any questions or require further information, please don't hesitate to contact me.

Sincerely,

Prof. Ira F. Salkin, Ph.D.
 Editor-in-Chief
 Medical Mycology

9.2 Folha de rosto da versão on-line Artigo 1

10232015 Fluorescent in situ hybridization of pre-incubated blood culture material for the rapid diagnosis of histoplasmosis

Oxford Journals Medicine & Health Medical Mycology Volume 53, Issue 1 Pp. 169-174



19th Congress of the
International Society for Human and Animal Mycology
Sponsoring the 19th Mycology Meeting 2014
4th - 8th May 2014, Melbourne, Australia

Medical Mycology
www.oxfordjournals.org

Med Mycol (February 2015) 53 (2) 169-174. doi: 10.1093/mmy/mys080
First published online December 23, 2014

Fluorescent *in situ* hybridization of pre-incubated blood culture material for the rapid diagnosis of histoplasmosis

Roberto Moreira da Silva Jr¹, João Ricardo da Silva Neto², Carla Silvana Santos²,
Kátia Santana Cruz², Hagen Fricke³, Sven Poppert⁴, Daniela Koshlauer⁵ and
João Vicente Braga de Souza^{1*}

Author Affiliations

¹To whom correspondence should be addressed. João Vicente Braga de Souza, Biotecnologia/Tecnologia Mine III, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, Laboratório de Micologia, 3643-1025 ou 3643-1026, Av. André Araújo, 2936, Aléxis, CEP 69060-001, Manaus - AM, Brazil; E-mail: joao.v.souza@inpa.gov.br

Received June 10, 2014.
Revision received October 6, 2014.
Accepted October 16, 2014.

Abstract

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has been shown to be useful for the detection of *Candida* and *Cryptococcus* species in blood culture materials. FISH procedures for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* have not been reported so far. This study describes the development and evaluation of fluorescently labeled rRNA-targeting FISH probes to detect and identify *H. capsulatum* in blood cultures. All three analyzed *H. capsulatum* reference strains and clinical isolates showed positive signals with the newly designed specific oligonucleotide probes for *H. capsulatum*, whereas negative reactions were observed for all three nontarget yeast species and the two nontarget bacteria. The assay was also successfully applied for detections of *H. capsulatum* cells in pre-incubated blood culture samples of patients with clinical suspicion of histoplasmosis ($n = 24$). The described FISH-based assay was shown to be easy to apply, sensitive, and specific (compared to polymerase chain reaction) for the detection and identification of *H. capsulatum* in this

About the Index

○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ Show related link

Key words development FISH histoplasmosis molecular probes

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of The International Society for Human and Animal Mycology. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

9.3 Aceite Artigo 2

1/23/2015

imprimir

Assunto: FW: Your manuscript has been accepted for publication in principle.

De: roberto moreira da silva junior (robertomsjr@hotmail.com)

Para: joaovcentebagasouza@yahoo.com.br,

Data: Sexta-feira, 23 de Janeiro de 2015 9:59

> From: acma@biomedcentral.com
 > To: robertomsjr@hotmail.com
 > Subject: Your manuscript has been accepted for publication in principle.
 > Date: Sun, 18 Jan 2015 15:48:21 -0800
 >
 > Authors: Roberto M Silva Jr, Daniela Koshikene, João R Silva Neto, Carla S Santos, Hagen Frickmann, Sven Poppert, Katia S Cruz and João VB Souza
 > Title : Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid of patients with suspected invasive mycoses
 > Journal: Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials
 > MS : 4579892991451204
 >
 > Dear Prof Silva Jr,
 >
 > Peer review of your manuscript (above) is now complete and we are delighted to accept the manuscript for publication in Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.
 >
 > Before publication, our production team needs to check the format of your manuscript, to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will get in touch with you shortly to request any necessary changes or to confirm that none are needed.
 >
 > If you have any problems or questions regarding your manuscript, please do get in touch.
 >
 > Best wishes,
 >
 > Prof. Hakan Leblebicioglu, MD
 > ACMA
 > Editor-in-Chief
 > Tel: + 90-362-4576000/2480
 > Facsimile: + 90-362-4576029
 >
 >
 > Tel: + 90-362-4576000/2480 Facsimile: + 90-362-4576029
 > e-mail: acma@biomedcentral.com
 > Web: <http://www.ann-clinmicrob.com/>
 > -----
 >
 >

9.4 Folha de rosto da versão on-line Artigo 2

Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses

Roberto Moreira Da Silva Jr¹
Email: robertomsjr@hotmail.com

João Ricardo Da Silva Neto²
Email: netto.23@hotmail.com

Carla Silvana Santos²
Email: carlasilvana@oi.com.br

Hagen Frickmann³
Email: frickmann@bni-hamburg.de

Sven Poppert⁴
Email: svenpoppert@gmx.de

Kátia Santana Cruz²
Email: katia.cruz@funt.am.gov.br

Daniela Koshikene⁵
Email: danielakoshikene@policiacivil.am.gov.br

João Vicente Braga De Souza^{6,7,*}
Email: joao.souza@inpa.gov.br

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil

² Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil

³ Department of Tropical Medicine at the Bernhard Nocht Institute, German Armed Forces Hospital of Hamburg, Hamburg, Germany

⁴ Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

⁵ Instituto de Criminalística, Manaus, Brazil

⁶ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil

⁷ Biotecnólogo/Tecnologista Pleno III, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, Laboratório de Micologia, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, AM CEP 69060-001, Brazil

* Corresponding author. Biotecnólogo/Tecnologista Pleno III, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, Laboratório de Micologia, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, AM CEP 69060-001, Brazil

Abstract

The aim of this study was to evaluate the diagnostic performance of in-house FISH (fluorescence in situ hybridisation) procedures for the direct identification of invasive fungal infections in blood cultures and cerebrospinal fluid (CSF) samples and to compare these FISH results with those obtained using traditional microbiological techniques and PCR targeting of the ITS1 region of the rRNA gene. In total, 112 CSF samples and 30 positive blood cultures were investigated by microscopic examination, culture, PCR-RFLP and FISH. The sensitivity of FISH for fungal infections in CSF proved to be slightly better than that of conventional microscopy (India ink) under the experimental conditions, detecting 48 (instead of 46) infections in 112 samples. The discriminatory powers of traditional microbiology, PCR-RFLP and FISH for fungal bloodstream infections were equivalent, with the detection of 14 fungal infections in 30 samples. However, the mean times to diagnosis after the detection of microbial growth by automated blood culture systems were 5 hours, 20 hours and 6 days for FISH, PCR-RFLP and traditional microbiology, respectively. The results demonstrate that FISH is a valuable tool for the identification of invasive mycoses that can be implemented in the diagnostic routine of hospital laboratories.

Keywords

FISH, Invasive mycoses, CSF, Blood culture, rRNA, Hybridisation

Introduction

The number of invasive fungal infections has increased over the last few decades. This phenomenon is the result of the growing number of pathological or iatrogenic immunocompromising conditions, premature births, neoplasms, abdominal surgeries, medical device insertion procedures and antibiotic therapies [1,2].

In northern Brazil, specifically in the state of Amazonas, histoplasmosis and cryptococcosis are some of the most frequent causes of death in AIDS patients [3], and candidemia is a problem in neonatal intensive care units [4]. In northern Brazil, the current diagnostic procedures at the hospital laboratories for the detection and identification of invasive fungal infections include culture (blood cultures, clinical specimens cultured on selective fungal media), biochemical methods, microscopic morphological determination and immunological assays. However, these traditional methods are time consuming, and their sensitivity for early detection is low [5]. To overcome these limitations, molecular approaches can be used for the detection and identification of pathogenic fungi [6].

Molecular techniques, particularly PCR-based approaches, have been developed to detect fungi in a short period of time; these approaches include nested PCR, multiplex PCR, real-time PCR and microarray techniques [7]. Although they have shown convincing results, the