

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)**

RODRIGO SANTOS MAGALHÃES

**VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *ASPERGILLUS spp***

Campo Grande - MS

2023

RODRIGO SANTOS MAGALHÃES

**VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *ASPERGILLUS spp***

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a Dr^a Aline Pedroso Lorenz e coorientação do Dr. Wellington Santos Fava.

Campo Grande - MS

2023

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, saúde e pela oportunidade de entrar em uma universidade.

À minha família pelo amor, suporte, e incentivo durante esses quatro anos e durante a elaboração desse trabalho.

Aos meus professores, em especial à Profª Drª Aline Pedroso Lorenz, por tudo que fez por mim como orientadora e ao Wellington Santos Fava pela orientação ao longo do trabalho.

Agradeço aos meus melhores amigos Luiza Sotto, Julia Soares, Lucas Machado, Ruan Michel e Kelto Cláudio por compartilharem comigo as aflições e conquistas, e por estarem ao meu lado em momentos difíceis.

Agradeço cordialmente à Banca Examinadora pela disponibilidade e presença durante a avaliação, bem como pelas considerações acerca do estudo apresentado. É uma honra ter sido avaliado por profissionais docentes competentes.

Agradeço as(os) pacientes por gentilmente nos permitirem relatar e estudar seu caso.

Agradeço ao Dr. James Venturini e Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago, bem como ao Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias, por fornecerem as amostras necessárias para o meu trabalho.

Agradeço a todos que fizeram e fazem parte direta ou indiretamente da minha formação, meus mais sinceros agradecimentos.

E hoje expresso a minha mais sincera gratidão a mim mesmo por não ter desistido e ter conseguido concluir meus sonhos até o momento.

RESUMO

Fungos são microrganismos eucarióticos que possuem funções ecológicas importantes para o meio ambiente, mas também são responsáveis por causar doenças em seres humanos, como ocorre em casos de Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs). O aumento no número de casos está associado a diversos fatores que comprometem a imunidade do paciente, incluindo baixos padrões socioeconômicos. O diagnóstico padrão-ouro de *Aspergillus* é realizado por meio de exames histopatológicos e citopatológicos, coletados através de biópsia do pulmão ou toracoscopia. Com o objetivo de propor métodos menos invasivos aos pacientes, este estudo procurou validar métodos de extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) em amostras de diferentes fluidos do sistema respiratório de pacientes com suspeitas de *Aspergillus*. Para isso, foram testados dois tampões mucolíticos para reduzir a quantidade de muco presente nas amostras, auxiliando a realização do diagnóstico por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Os resultados obtidos foram comparados com o teste de galactomanana. Os dados das 98 amostras foram analisados estatisticamente utilizando a estatística Kappa de Cohen e o teste Qui-quadrado de Pearson, ambos operados no software R. Os resultados apontaram uma concordância de 66% ($Kappa=0,158$) e 79% ($Kappa= 0,412$) para os tampões de Lophomonas e N-acetilcisteína, respectivamente. Este estudo não evidenciou resultados estaticamente significativos para distinguir as duas soluções mucolíticas avaliadas ($p>0,05$), o que sugere a necessidade de aprimorar técnicas já existentes, buscar novos testes e explorar diferentes combinações de diagnóstico com o objetivo de obter uma análise menos invasiva e mais precisa do paciente.

Palavras-chaves: *Aspergillus*, solução mucolítica, ácido desoxirribonucleico

Abstract

Fungi are eukaryotic microorganisms that have important ecological functions in the environment, but they are also responsible for causing diseases in humans, such as Invasive Fungal Infections (IFIs). The increase in the number of cases is associated with various factors that compromise the patient's immunity, including low socioeconomic standards. The gold standard diagnosis for *Aspergillus* is performed through histopathological and cytopathological examinations, collected through lung biopsy or thoracoscopy. With the aim of proposing less invasive methods for patients, this study sought to validate methods for extracting deoxyribonucleic acid (DNA) from samples of different respiratory system fluids from patients suspected of *Aspergillus*. For this purpose, two mucolytic buffers were tested to reduce the amount of mucus present in the samples, aiding in the diagnosis by Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). The obtained results were compared with the galactomannan test. The data from the 98 samples were statistically analyzed using Cohen's Kappa statistic and Pearson's chi-squared test, both operated in the R software. The results showed a 66% agreement ($\text{Kappa} = 0.158$) and 79% agreement ($\text{Kappa} = 0.412$) for the Lophomonas and N-acetylcysteine buffers, respectively. This study did not show statistically significant results to distinguish between the two evaluated mucolytic solutions ($p > 0.05$), suggesting the need to improve existing techniques, search for new tests, and explore different combinations of diagnosis in order to obtain a less invasive and more accurate analysis of the patient.

Keywords: *Aspergillus*, mucolytic solution, deoxyribonucleic acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Objetivo.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 Caracterização do estudo.....	9
2.2 Remoção de muco.....	10
2.3 Extração de DNA.....	10
2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	11
2.5 Análise estatística.....	12
2.6 Aspectos éticos.....	12
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	20

1. INTRODUÇÃO

Fungos são microrganismos eucarióticos encontrados no meio ambiente em diversas formas, como bolores, leveduras, cogumelos, hifas e poliporos (CHANG; LEVITZ, 2019). Eles estão presentes em diversos ambientes, incluindo solo, esterco, plantas e animais (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018). Embora se estime que existam aproximadamente 5 milhões de espécies de fungos no mundo, apenas 100.000 delas foram descritas. Os fungos desempenham funções ecológicas cruciais ao meio ambiente, agindo como decompositores de matéria orgânica e contribuindo para o ciclo do carbono no solo. No entanto, algumas espécies são responsáveis por causar doenças nos seres humanos, ocasionando as Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) (CAMPLESI JUNIOR, 2013).

Estima-se que mais de 800 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por IFIs (BOROUJENI *et al.*, 2021). Dessas, cerca de 3 milhões desenvolvem infecções graves, incluindo 1,9 milhão de casos de IFIs agudas (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020). As taxas de mortalidade anual por IFIs (1.660.000) ultrapassam as da malária (445.000) e se assemelham às da tuberculose (1.700.000) (BOROUJENI *et al.*, 2021). Além das taxas de morbidade e mortalidade, as infecções estão associadas a um ônus econômico. Estudos relatam que apenas nos Estados Unidos, o custo médio total para o tratamento das IFIs é estimado em US\$ 4,6 bilhões, no entanto, autores discutem que muitas doenças fúngicas são desconhecidas, e que o custo real pode ser ainda mais alto que o estimado (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020). A distribuição dos fungos e seus agentes causadores diferem pela região geográfica, nível socioeconômico, clima, contato com animais, idade populacional, interação com o sistema imune e padrões da migração humana. Como resultado, algumas infecções fúngicas são endêmicas, enquanto outras possuem uma grande área de distribuição (TAWFIK *et al.*, 2022).

O aumento no número de casos de IFIs está associado a uma série de fatores que comprometem a imunidade dos pacientes, mas que não se limita apenas em pacientes imunocomprometidos (BOROUJENI *et al.*, 2021). Dentre eles, destacam-se infecções por SARS-CoV-2 (BORG; FARRUGIA; AZZOPARDI, 2022), infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), transplante de órgãos e medula, tratamentos que utilizam quimioterápicos (BARROSO FILHO *et al.*, 2021),

imunossupressão medicamentosa, e mudanças ambientais como o desmatamento. Além das pessoas imunossuprimidas, baixos padrões socioeconômicos com quadros de desnutrição, tabagismo (mais de 20 cigarros por dia por mais de 20 anos) e alcoolismo (mais de 50g por dia) também auxiliam no desenvolvimento de casos de IFIs (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2018).

As IFIs podem ser causadas, por exemplo, por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (BOROUJENI *et al.*, 2021). As infecções podem ocasionar aspergiloses (EL-MAHALLAWY *et al.*, 2006) ocasionada por fungos termofilos e filamentosos (COCIO, 2016) como *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. terreus* (BOROUJENI *et al.*, 2021). Das manifestações clínicas causadas por *Aspergillus*, a mais grave é a aspergilose pulmonar invasiva (API) (GAVRONSKI; BOTELHO; CORDOVA, 2016).

A infecção do *Aspergillus* é ocasionada pela transmissão de uma estrutura de reprodução assexuada dos fungos, chamada de conídios. Em humanos, a inalação é a forma mais frequente de transmissão, que atingem os tecidos da via aérea, transcutânea e mucosa, ocasionado aspergilose por exemplo. Quando em contato com os bronquíolos, os conidiósporos entram na fase miceliana, atingindo os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, onde terminam sua maturação. As primeiras lesões acometem principalmente os pulmões, iniciando infecções subclínicas que podem ser curadas por meio da resposta imune do paciente (SIQUEIRA, 2008), (HEINEKAMP *et al.*, 2015). Também podem se disseminar para outros órgãos utilizando o sistema sanguíneo (DE LIMA, 2022) ocasionando necrose de tecidos (FELIX, 2018), desenvolvendo uma área necrótica conveniente ao crescimento do fungo (PEDROZA, 2015). Ademais, a infecção pode ocorrer em processos de queimaduras, ferimentos e procedimentos cirúrgicos (CAMPOS, 2019).

Convencionalmente, o diagnóstico padrão ouro da API é dado por exames histopatológicos e citopatológicos pulmonares, coletados por meio da toracoscopia ou biópsia do pulmão. Estes exames visam identificar a presença de hifas, juntamente com a análise de cultura positiva (GAVRONSKI; BOTELHO; CORDOVA, 2016). A utilização dessa técnica possui natureza invasiva (PEDROZA, 2015) e de retorno lento, já que o crescimento da cultura pode demorar alguns dias (FELIX, 2018), e há existência de resultados falso positivos que podem ser ocasionados por contaminação, enquanto o quadro clínico do paciente tende a progredir rapidamente

(PEDROZA, 2015). Além disso, há dificuldades em distinguir infecções causadas por *Aspergillus* de outros fungos filamentosos, como *Scedosporium* e *Penicillium*, uma vez que eles possuem morfologias semelhantes (GAVRONSKI; BOTELHO; CORDOVA, 2016).

Existem ainda técnicas de diagnóstico que incluem a detecção do biomarcador de parede celular fúngica, chamado de galactomanana (GM) produzido pelos gêneros *Penicillium*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, entre outros (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020). A GM é um polissacarídeo que compõe a parede celular dos fungos, sendo encontrado em diversas amostras biológicas como sangue, urina e, lavado bronco-alveolar durante o crescimento da hifa no tecido (FERNANDES; JUNIOR; ATAIDES, 2017), (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020). Uma ferramenta útil para detectar a GM é por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), que utiliza de anticorpos para detectar a presença de抗ígenos específicos (FERNANDES; JUNIOR; ATAIDES, 2017). Ademais, é possível utilizar testes para detecção do componente da parede celular fúngica (1,3) - β - D - glucano) (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020), imagens tomográficas computadorizadas (CAMPOS, 2019), e por reação em cadeia da polimerase (PCR) (DENNING, 2021).

Os métodos que utilizam o ácido desoxirribonucleico (DNA) são usados para detectar e diagnosticar a presença ou ausência de patógenos fúngicos (FELIX, 2018). Como nem todos os pacientes com IFIs podem ser identificados com precisão utilizando métodos fenotípicos (padrão ouro), muitos laboratórios de micologia clínica usam o sequenciamento de DNA para identificar fungos patogênicos (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020). No entanto, existem desafios já que há um baixo rendimento de extração de DNA de hifas e/ou conídios, dada a pequena quantidade de material fúngico nas amostras biológicas. Os métodos de extração de DNA utilizam ferramentas de ruptura da membrana e parede celular que variam desde físicas, químicas e enzimáticas, sendo necessário o uso de protocolos específicos para cada gênero. Essas dificuldades se devem à natureza complexa da parede celular fúngica, que consiste em espessas camadas de quitina, (1-3)-β-D-glucana, (1,6)-β-glucanas, lipídios e peptídeos, sendo possível ainda apresentar uma camada de melanina, a qual é resistente à luz UV, degradação química e digestão enzimática (KARAKOUSIS *et al.*, 2006).

Em 2016 foi estimado que fungos do gênero *Aspergillus* ocupavam a segunda posição entre os agentes infecciosos fúngicos mais prevalentes no Brasil, sendo responsável por 25% dos casos de infecções fúngicas (BARROSO FILHO *et al.*, 2021). Entretanto, por não serem doenças de notificação compulsória, não há dados epidemiológicos precisos sobre a verdadeira incidência atribuída à aspergilose (DORNELES, 2022). Por ser uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos que necessitam de diagnóstico e terapia rápida, há uma necessidade significativa de testes que validem métodos de diagnóstico de IFIs por meio da utilização de DNA, a fim de melhorar a qualidade e agilidade do diagnóstico dos pacientes. Os testes baseados em DNA, realizados a partir de amostras biológicas, sem a necessidade do diagnóstico fenotípico padrão, podem disponibilizar um método rápido e confiável para a população, reduzindo significativamente o tempo de início do tratamento.

1.1 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo validar a detecção de DNA de *Aspergillus* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) em amostras biológicas de diferentes fluidos do sistema respiratório de pacientes de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, internados com suspeita de IFIs, comparando-se a eficiência de dois tampões mucolíticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do estudo

Este estudo utilizou 98 amostras respiratórias de diferentes origens conforme Tabela 1 e Tabela 2, provenientes de pacientes com suspeitas de IFI por *Aspergillus*. As amostras coletadas estavam armazenadas em tubos Falcon com capacidade de 15 ml sob congelamento a -80°C no biorrepositório do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LabDIP, FAMED, UFMS), acompanhadas dos resultados correspondentes obtidos por meio do teste de galactomanana.

As amostras de diferentes fluidos do sistema respiratório como aspirado traqueal, lavado bronqueoalveolar, escarro e líquido pleural. As amostras foram coletadas em diversas instituições de saúde de Campo Grande-MS, incluindo o Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS), Laboratório Central de Saúde

Pública (LACEN), Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP) e o Hospital do Coração (HC). Todas as amostras já haviam sido submetidas para o teste de GM por meio da técnica ELISA, sendo que, entre as amostras analisadas, foram identificadas 20 amostras com resultados positivos para GM.

2.2 Remoção de muco

Para a análise de amostras respiratórias densas, que contêm uma grande quantidade de muco, é recomendado tratá-las com soluções mucolíticas. Esse tratamento reduz a quantidade de muco na amostra, o que pode atrapalhar na extração do DNA fúngico (BRASIL, 2022).

As amostras foram separadas em dois grupos Grupo A (amostra 1 a 50) e Grupo B (amostra 51 a 98) ao acaso, para a realização do procedimento de lavagem mucolítica. Cada grupo recebeu um tratamento específico com soluções mucolíticas. As amostras do Grupo A foram tratadas com solução mucolítica para Lophomonas contendo 500 µl de tampão com 50 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM de EDTA, 1% de Tween 20 segundo estudo de Fakhar *et al.* (2019), e o grupo B tratado com uma solução de N-acetilcisteína (10mg/mL), seguindo a técnica descrita no Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2022).

As soluções mucolíticas foram adicionadas até que o volume de 10 ml do tubo Falcon fosse preenchido e mantidas sob agitação *overnight* em temperatura ambiente. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 3600x rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, juntamente com 200 µl de água ultrapura, foi transferido para um microtubo de maceração contendo *beads* de zircônio de 1,4mm.

2.3 Extração de DNA

Para os processos de extração de DNA do fungo, as amostras com *beads* foram maceradas num macerador automático L-Beader 6, Loccus utilizando-se três ciclos de maceração por 60 segundos a uma velocidade de 4000x, com intervalos de 30 segundos, seguido de um *spin* de 15 segundos. Em seguida, foram adicionados 500 µl de tampão de extração contendo 1mM de EDTA, 10 mM de Tris (pH 8,0), 1% de SDS, 2 % de Triton X-100 e 100 nM de NaCl (Sepúlveda *et al.*, 2017), e 20 µl de Proteinase-K segundo estudo de Fakhar *et al.* (2019). As amostras foram submetidas

a agitação em vortex por 30 segundos e incubadas a 65°C por 1 hora em termobloco com agitação de 500x rpm, seguida de um *spin* de 15 segundos.

Posteriormente, 500 µl de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados, seguindo-se agitação vigorosa da solução por 30 segundos em vórtex. Após a agitação, a solução foi submetida à centrifugação a 12000x rpm por 15 minutos, com a transferência do sobrenadante para um microtubo de 1,5ml contendo 500 µl de isopropanol e 50 µl de Acetato de amônio 3M. O homogeneizado obtido foi mantido em freezer a -20°C *overnight*.

No dia posterior, os microtubos de 1,5 ml foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos, desprezando o sobrenadante e mantendo o *pellet*. Subsequentemente, 500 µl de etanol 70% foram adicionados e os microtubos foram novamente centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante e mantendo o *pellet*. Em seguida, os microtubos foram mantidos em um termobloco a 37°C até que todo o etanol fosse evaporado. Por fim, foram eluídos com 100 µl de água ultrapura e a amostra foi armazenada em freezer a -20°C para uso imediato ou em freezer a -80°C para uso a longo prazo.

2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Para avaliar se a extração de DNA do fungo foi bem-sucedida, utilizou-se a detecção de DNA de *Aspergillus* por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Para tanto, foi usada uma reação em volume total de 25 µl, composto por Tampão Master Mix qPCR Promega 1x, 0,75 µM de primer direto (AF4), 0,75 uM de primer reverso (AR1), 0,40 µM da sonda (ASP28P), e ca. 100 ng/uL de DNA genômico. Os primers de PCR AF4 5'-GCG CAC AAG TAG AGT GAT C e AR1 5'-GCG TTC CTC GGT CCA, descrito por Williamson *et al.* (2000) amplificam a região do gene da subunidade ribossômica grande, dada a sequência específica do gênero *Aspergillus*. A sonda ASP28P foi sintetizada segundo White *et al.* (2006) (FAM-CATTCTGCCGGTGTACTCCCCG-TAMRA).

As reações de PCR foram amplificadas em um termociclador de 96 poços Veriti, Applied Biosystems usando os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 70°C por 1 minuto e, em seguida uma extensão final a 70°C por 5 min.

2.5 Análise estatística

A análise estatística empregada neste estudo foi conduzida operando o software R (V 4.1.0), utilizando a estatística Kappa de Cohen, a fim de avaliar o grau de concordância entre os resultados do teste de GM e da qPCR. Além disso, foi aplicado o teste Qui-quadrado de Pearson para avaliar a significância das diferenças observadas entre os tampões mucolíticos utilizados. O nível de significância de ambos os testes foi de 5%.

2.6 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (CEP/UFMS) sob parecer nº 5.066.534 de 2022, CAAE 50812521.5.0000.0021

3. RESULTADOS

Grupo A

De acordo com os resultados obtidos em um conjunto de 50 amostras (Tab. 1), constatou-se que em alguns pacientes não foi confirmado a presença de *Aspergillus* utilizando a técnica de qPCR, ao contrário do que foi observado em resultados positivos obtidos pela técnica de GM. Ao comparar os resultados das duas técnicas, verificou-se concordância em 33 amostras (66%), sendo que em 5 delas houve resultado positivo e em 28 negativo para *Aspergillus*. Em 12 amostras, 24% do total, a qPCR detectou a presença de *Aspergillus* enquanto a técnica de GM apresentou resultados negativos. E em 5 amostras, o resultado da qPCR não identificou o DNA de *Aspergillus*, enquanto a técnica de GM detectou sua presença. O valor do coeficiente Kappa foi de 0,158 ($p = 0,232$), constatando que não houve uma diferença significativa entre os testes de GM e qPCR.

Tabela 1 - Resultado observado do teste de Galactomanana (GM) e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) do tampão mucolítico de Fakhar *et al.*, (2019).

ID AMOSTRA	ORIGEM *	TIPO	TESTE	
			GM	qPCR
1	HRMS	Escarro	Negativo	Não-detectável
2	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
3	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Não-detectável
4	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
5	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
6	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
7	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
8	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
9	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
10	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
11	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
12	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
13	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
14	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
15	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Não-detectável
16	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
17	LACEN	Lavado Broncoalveolar	Positivo	Não-detectável
18	LACEN	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
19	LACEN	Líquido Pleural	Negativo	Não-detectável
20	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
21	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
22	HRMS	Escarro	Negativo	Não-detectável
23	LACEN	Lavado Broncoalveolar	Positivo	Não-detectável
24	LACEN	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
25	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
26	LACEN	Líquido Pleural	Negativo	Não-detectável
27	HRMS	Escarro	Negativo	Não-detectável
28	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
29	HRMS	Escarro	Negativo	Não-detectável
30	LACEN	Escarro	Negativo	Não-detectável
31	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Positivo	Não-detectável
32	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
33	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
34	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
35	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
36	LACEN	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
37	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
38	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
39	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
40	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
41	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
42	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
43	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
44	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
45	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
46	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
47	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
48	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
49	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
50	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável

*HRMS: Hospital Regional de Mato Grosso do Sul; LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública; HUMAP: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian; HC: Hospital do Coração.

Grupo B

Após examinar os resultados obtidos de 48 amostras (Tab. 2), foi constatado que houve concordância entre os resultados de qPCR e de GM em 38 delas (79%), sendo 32 negativo em ambos e 6 positivo. No entanto, em 6 amostras (12,5%) do total, a qPCR detectou a presença de *Aspergillus* enquanto a técnica GM apresentou resultados negativos. E em 4 amostras, o resultado da qPCR não corroborou com a identificação do DNA de *Aspergillus*, enquanto a técnica de GM detectou a presença. O coeficiente Kappa obtido foi de 0,412 ($p = 0,00407$), indicando uma concordância moderada entre as duas técnicas, demonstrando que houve uma diferença significativa entre os testes de GM e qPCR.

O resultado do teste de qui-quadrado mostrou que não houve diferença entre os resultados de concordância obtidos utilizando os dois tipos de tampões mucolíticos ($p = 0,145$).

Tabela 2 - Resultado observado dos testes de Galactomanana GM e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) do tampão mucolítico (N-acetilcisteína) do Guia de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2022).

ID AMOSTRA	ORIGEM *	TIPO **	TESTE	
			GM	qPCR
51	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
52	HC	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
53	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Não-detectável
54	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
55	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
56	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
57	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
58	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
59	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
60	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
61	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
62	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
63	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
64	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
65	HRMS	Amostra respiratória	Positivo	Detectável
66	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
67	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
68	HRMS	Aspirado Traqueal	Positivo	Detectável
69	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
70	LAC	Aspirado Traqueal	Negativo	Detectável
71	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
72	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
73	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
74	HRMS	Amostra respiratória	Negativo	Não-detectável
75	HUMAP	Aspirado Traqueal	Positivo	Não-detectável
76	LACEN	Amostra respiratória	Negativo	Não-detectável
77	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
78	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
79	HUMAP	Aspirado Traqueal	Positivo	Não-detectável
80	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
81	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
82	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
83	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
84	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
85	HUMAP	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
86	HRMS	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
87	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
88	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
89	LACEN	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
90	HUMAP	Escarro	Negativo	Detectável
91	HUMAP	Amostra respiratória	Negativo	Não-detectável
92	HUMAP	Escarro	Negativo	Não-detectável
93	HRMS	Escarro	Negativo	Não-detectável
94	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Positivo	Não-detectável
95	HUMAP	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável
96	HRMS	Escarro	Negativo	Não-detectável
97	LACEN	Aspirado Traqueal	Negativo	Não-detectável
98	HRMS	Lavado Broncoalveolar	Negativo	Não-detectável

*HRMS: Hospital Regional de Mato Grosso do Sul; LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública; HUMAP: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian; HC: Hospital do Coração. **Amostras do tipo “respiratória”, são aquelas que não apresentam informação sobre sua técnica de coleta.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisados os resultados obtidos a partir do uso de duas soluções mucolíticas diferentes nos Grupos A e B. A concordância dos resultados entre os grupos foi de 66% para o Grupo A e 79% para o Grupo B. Além disso, os ensaios de qPCR demonstraram uma eficiência superior a 50% em ambos os grupos. Esses resultados indicam que a qPCR pode ser considerada uma ferramenta de triagem útil em pacientes de alto risco, em conformidade com outras abordagens diagnósticas.

A aspergilose é uma doença que tem demonstrado um aumento crescente ao longo dos anos, principalmente em pacientes com comprometimento do sistema imunológico, e o seu diagnóstico clínico e laboratorial ainda representa um desafio significativo. A análise histopatológica é um método laboratorial reconhecido pela sua eficácia no diagnóstico presuntivo ou mesmo definitivo para IFIs. No entanto, em alguns casos, os patologistas podem deparar-se com biopsias de tecido necrosados ou com poucas hifas, o que dificulta ainda mais a distinção entre os agentes infecciosos envolvidos (FELIX, 2018).

Neste contexto, os métodos moleculares têm surgido como uma alternativa promissora para auxiliar na detecção e identificação de fungos filamentosos. Contudo, há uma falta de padronização em relação ao tipo de amostra clínica utilizado, à seleção dos *primers* e ao tipo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (FELIX, 2018). Ainda assim, a realização de testes moleculares como complemento aos métodos microbiológicos auxilia no parecer médico para o paciente (LUONG *et al.*, 2011).

Dentre os testes complementares destaca-se o teste de GM, que embora tenha melhores índices de sensibilidade e acaba sendo uma técnica menos complexa, sua baixa especificidade pode ser recompensada pela realização da qPCR, que pode amplificar fragmentos específicos do material genômico do patógeno, a fim de obter resultados promissores no desempenho do diagnóstico (GAVRONSKI; BOTELHO; CORDOVA, 2016). Loung *et al.* (2011), discutem que a sensibilidade da PCR é maior quando outros testes também se apresentaram positivos. Diante disso, é possível presumir que os resultados negativos de 60 amostras utilizando os testes de GM e qPCR sejam, de fato, pacientes que não possuem infecção fúngica invasiva por *Aspergillus*, enquanto um total de 11 pacientes que tiveram confirmação positiva para

ambos os testes possuem a infecção fúngica invasiva por *Aspergillus*. No entanto, é importante ressaltar que as amostras não foram submetidas ao teste considerado como padrão-ouro para confirmar esses resultados. Portanto, é necessário realizar estudos de caso individuais para uma avaliação médica precisa, uma vez que a qPCR não é um teste padronizado e pode sofrer variações em seus resultados (GAVRONSKI; BOTELHO; CORDOVA, 2016).

Gavronski; Botelho e Cordova, (2016) descrevem que a combinação dos resultados de PCR e GM resultou em um diagnóstico preciso em 95,2% dos casos. Os dados obtidos neste trabalho demonstraram uma concordância entre os resultados negativo e positivo de 66% e 79% para o Grupo A e Grupo B respectivamente, o que demonstra um valor abaixo da proporção relatado por Gavronski; Botelho e Cordova, (2016). Contudo, Hadrich (2011) encontrou uma sensibilidade de 64% utilizando a qPCR em amostras de origem de lavado bronqueoalveolar (BAL). Além deles, Mushe *et al.* (2004) demonstraram um valor preditivo positivo e negativo dos resultados combinados entre o teste de GM e qPCR de 84% e 96% respectivamente, o que demonstra que os resultados obtidos neste estudo estão na faixa de resultados encontrados por outros autores.

Como métodos moleculares também são limitados por resultados falso positivos ou negativos que são causados por uma variedade de fatores (HADRICH *et al.*, 2011), leva a discussão das causas para resultados falso positivo ou falso negativo nos pacientes. Houve uma discordância de 17 amostras e 10 amostras do Grupo A e Grupo B respectivamente. Musher *et al.* (2004) argumenta que o fluido BAL demonstra uma taxa significativa de resultados falso positivos quando submetido ao imunoensaio enzimático da galactomanana. Além disso, o método qPCR não possui a capacidade de distinguir entre a colonização por conídios de *Aspergillus*, contaminação e reatividade cruzada de *primers*, o que pode resultar em resultados falso positivos (LOUNG *et al.*, 2011). Além da análise utilizando BAL, a análise de escarro é uma ferramenta útil para o diagnóstico de doenças respiratórias, uma vez que pode ser induzido por respostas inflamatórias a alérgenos, vírus e fungos (EVANS; TUVIM; DICKEY, 2009). Bazzo *et al.* (2004) destacaram que o escarro pode apresentar resultados falso negativos na PCR devido à presença de enzimas provenientes de leucócitos degenerados, que contribuem para a degradação do DNA. Essa possibilidade de interferência nos resultados da análise em amostras respiratórias

destaca a importância de considerar que tenha interferido nos resultados em discordância de 27 pacientes neste estudo.

Por mais que existam estudos que sugerem que o escarro pode ter um efeito negativo nos testes que utilizam DNA (BAZZO *et al.*, 2004), é importante notar que outros fatores podem afetar a qualidade dos resultados, incluindo o tipo de amostra (HADRICH *et al.*, 2011), o método de armazenamento, congelamento-descongelamento repetido, umidade, temperatura (MALENTACCHI *et al.*, 2015), e em procedimentos em que o paciente se encontra em tratamento antifúngico, atrapalhando na sensibilidade dos testes de diagnóstico (LUONG *et al.*, 2011). Portanto, é imprescindível seguir as melhores práticas de amostragem para minimizar o risco de contaminação e/ou degradação do DNA e fazer um estudo do caso.

Mesmo que existam vantagens ao utilizar a qPCR, ela ainda não é um critério de diagnóstico para doenças fúngicas invasivas devido a carência de uma padronização nas técnicas (HADRICH *et al.*, 2011). É importante destacar que em alguns casos não se faz necessário a identificação a nível de espécie para determinar a terapia antifúngica certa, pois para o clínico é suficiente que a distinção seja feita apenas ao nível de gênero (FELIX, 2018). Embora existam casos em que se faz necessário a identificação da espécie para um melhor resultado do quadro clínico do paciente (WALSH *et al.*, 2011).

Existem ainda outras técnicas de diagnóstico que incluem, o teste expandido para (1,3) - β - D - glucano (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020), imagens tomográficas computadorizadas (CAMPOS, 2019). Os testes podem ser realizados simultaneamente, como detecção de抗ígenos sorológicos e técnicas moleculares, o que torna o diagnóstico sem cultura eficiente na avaliação de suspeitas de IFIs com resultados rápidos. Por mais que minimizem o tempo de diagnóstico, nenhum teste molecular até agora provou ser suficiente para substituir o padrão ouro (exames histopatológicos e citopatológicos), dado a limitação de tecnologias comerciais disponíveis e a padronização dos testes (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020).

Neste estudo, não foram encontradas evidências estatisticamente significativas para distinguir o efeito do uso de duas soluções mucolíticas durante a extração de DNA sobre a eficiência de amplificação e detecção de *Aspergillus*. Portanto, a escolha entre os dois tampões mucolíticos fica a critério do usuário, considerando fatores como

custo e facilidade de preparo, sendo o N-acetilcisteína a opção mais prática para manipular. Os resultados obtidos sugerem, portanto, a necessidade por pesquisas adicionais com o objetivo de estabelecer diretrizes padronizadas para a extração de DNA em diferentes amostras, considerando a eficiência da técnica de qPCR.

5. CONCLUSÃO

O estudo apresentou uma concordância moderada em seus ensaios entre a detecção de *Aspergillus spp* por GM e qPCR, não evidenciando diferenças estatísticas significativas entre as soluções mucolíticas avaliadas.

É imprescindível ressaltar que, até o momento, não há evidências de que a utilização da qPCR venha substituir o padrão ouro no diagnóstico de Aspergilose Invasiva, porém pode ser uma técnica aliada para adiantar o início de tratamento de casos mais graves.

E apesar dos resultados promissores, há a necessidade de realizar mais estudos para explorar as técnicas já existentes, novas e diferentes combinações diagnósticas, visando uma análise mais precisa e ágil do paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROSO FILHO, Afrânio Almeida; SALES, Larissa Ciarlini Varandas; BACHUR, Tatiana Paschoalette Rodrigues. **DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS NO CONTEXTO BRASILEIRO. UMA IMPORTANTE INFECÇÃO FÚNGICA EM FOCO: ASSOCIAÇÃO ENTRE ASPERGILOSE INVASIVA E O USO DE MACONHA.** Campina Grande: Amplia, v. II, p. 25, 2021.
- BAZZO, Maria Luiza *et al.* Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnóstico de micobacterioses por PCR. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 4, n. 2773/04, p. 23-27, 2004.
- BORG, Darren; FARRUGIA, James; AZZOPARDI, Charles Mallia. **SARS-CoV-2 related ARDS and invasive fungal infections in intensive care patients.** Clinical Infection in Practice. Elsevier B.V., 1 Jan. 2022.
- BOROUJENI, Zeinab Borjian *et al.* Distribution of invasive fungal infections: Molecular epidemiology, etiology, clinical conditions, diagnosis and risk factors: A 3-year experience with 490 patients under intensive care. **Microbial pathogenesis**, v. 152, 1 mar. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde** [recurso eletrônico] Brasília, 5 ed., 1123p., 2022. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2023.
- CAMPLESI JUNIOR, Milton. **Caracterização e identificação de fungos causadores de infecções nosocomiais em pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas.** 2013. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- CAMPOS, Carlos Alberto Passinho. **Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus*.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2019.

CHANG, Christina. C.; LEVITZ, Stuart. M. **Fungal immunology in clinical practice: Magical realism or practical reality?** Medical Mycology. Anais...Oxford University Press, 1 jun. 2019.

COCIO, Tiago Alexandre. **Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo sinal, masA, de *Aspergillus fumigatus*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, SP, 2016.

DE BRITO, Eliana CA et al. Paracoccidioidomycosis screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, p. 102921, set. 2022.

DE LIMA, Alexandre Moretti et al. **Micoses: o que você precisa saber.** – Campo Grande, Ed. UFMS, p. 157. 2022. Disponível em:
<https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/4668>. Acesso em: 10 mar. 2023.

DENNING, D. W. Diagnosing pulmonary aspergillosis is much easier than it used to be: A new diagnostic landscape. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 25, n. 7, p. 525-536, 1 jul. 2021.

DORNELES, FRANCINE DE SALES. **IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ASPERGILLUS OBTIDOS DE SOLOS, EXPOSTOS E ISENTOS DE AZÓLICOS, NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL.** 2022. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

EL-MAHALLAWY, Hadir A. et al. Evaluation of pan-fungal PCR assay and *Aspergillus* antigen detection in the diagnosis of invasive fungal infections in high risk pediatric cancer patients. **Medical Mycology**, v. 44, n. 8, p. 733-739, dez. 2006

EVANS, Christopher M. et al. **Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects.** **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 15, n. 1, p. 4, jan. 2009.

FAKHAR, Mahdi et al. First molecular diagnosis of Lophomoniasis: the end of a controversial story. **Acta parasitologica**, v. 64, n. 2, p. 390-393, 1 jun. 2019.

FELIX, Gabriel Naves. **PCR em tempo real na detecção e discriminação de *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus* e *Fusarium solani* em biópsias obtidas de infecções invasivas em modelo experimental murino.** 2018.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

FERNANDES, Janaina Cândido; JUNIOR, Milton Camplesi; ATAIDES, Fábio Silvestre. Galactomannan: biomarker of invasive Aspergillosis. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, Goiânia, GO, v. 44, p. 86-93, jan./dez. 2017.

GAVRONSKI, Suellen; BOTELHO, T. K. R.; CORDOVA, C. M. M. Diagnóstico laboratorial de aspergilose invasiva: avaliação de métodos moleculares e detecção de抗ígenos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro v. 48, n. 2, p. 96-109, 2016.

HADRICH, I. et al. Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with hematological malignancies. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 489–494, jul. 2011.

HEINEKAMP, Thorsten et al. **Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. In: Seminars in immunopathology.** Springer Berlin Heidelberg, p. 141-152. 1 mar. 2015.

KARAKOUSIS, A. et al. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 65, n. 1, p. 38-48, abr. 2006.

LUONG, M. L. et al. Comparison of an *aspergillus* real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalvelolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 10, p. 1218–1226, 15 maio 2011.

MALENTACCHI, F. et al. Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: The SPIDIA experience. **Clinica Chimica Acta**, v. 440, p. 205–210, 2 fev. 2015.

MUSHER, Benjamin *et al.* *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5517-5522, dez. 2004.

PEDROZA, Kelly Cristine Moura Costa. **Detecção do antígeno galactomanana para diagnóstico de aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos**. 2013. Dissertação (Mestre em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BH, 2013.

SEPÚLVEDA, V. E., Márquez, R., Turissini, D. A., Goldman, W. E., & Matute, D. R. Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01339-17, 1 nov. 2017.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* II consenso brasileiro em paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. spe, p. e0500001, 16 ago. 2018.

SIQUEIRA, Keila Zaniboni. **Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes portadores de Pacoccidioidomicose: correlação com perfis histopatológico, sorológicos e produção de TNF-α**. 2008. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2008.

TAWFIK, K. M.; MOHAMMED, R. R.; SOBHY, A.; SHALTOUT, A. S. Conventional and molecular diagnostics for detection of causative fungi in clinical samples of human dermatomycosis. **Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society**, v. 19, n. 1, p. 21-30, 1 jan. 2022.

TERRERO-SALCEDO, David; POWERS-FLETCHER, Margaret V. Updates in laboratory diagnostics for invasive fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. e01487-19, 1 jun. 2020.

WALSH, Thomas J. *et al.* Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4150-4157, dez. 2011.

WHITE, P. Lewis *et al.* The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 4, p. 479-486, 15 fev. 2006.

WILLIAMSON, Emma CM *et al.* Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. **British journal of haematology**, v. 108, n. 1, p. 132-139, 2000.