

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ALESSANDRA LEAL DA SILVA CHAVES

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ISOLADOS DE
Fusarium spp. EM UM HOSPITAL DE ONCOLOGIA
DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Orientador: Dr. Bodo Wanke

Co-orientador: Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Rio de Janeiro

Dezembro 2015

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ISOLADOS DE
Fusarium spp. EM UM HOSPITAL DE ONCOLOGIA DO
RIO DE JANEIRO, BRASIL

ALESSANDRA LEAL DA SILVA CHAVES

Dissertação apresentada ao curso de
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
do Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas para obtenção do grau
de mestre em ciências.

Rio de Janeiro
2015

Aos meus pais, Tânia e Sérgio, pela dedicação de suas vidas à minha educação e pelo despertar da curiosidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas pela oportunidade oferecida através do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas.

Ao corpo docente do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas por compartilharem seus conhecimentos.

Aos pesquisadores Dr. Bodo Wanke, Dr. Rodrigo de Almeida Paes e Dra. Márcia Lazéra por me inspirarem no diagnóstico micológico e me apoiarem para a execução deste projeto. Obrigada pela oportunidade de convivência e aprendizado junto ao grupo.

Ao Dr. Eduardo Velasco e à Dra. Ilda Akemi Muramoto pelo incentivo em buscar conhecimento.

À Dra. Marília Nishikawa por me acompanhar como revisora durante os seminários.

Ao Dr. Dayvison Freitas por compartilhar seu conhecimento e contribuir com a revisão deste projeto.

Ao Dr. Manoel Marques Evangelista e à Dra. Luciana Trilles por terem colaborado substancialmente com as análises moleculares.

À plataforma de sequenciamento PDTIS/Fiocruz por seu excelente trabalho.

Aos amigos do laboratório de diagnóstico micológico do INI, Maria Helena Galdino, Fábio Brito, Luã Cardoso e Rowena Alves, pela amizade e incentivo constante durante o curso.

Às Dras. Ianick Souto e Mariane Monteiro pelo apoio na investigação epidemiológica.

Aos amigos do laboratório de micologia do Inca, Nelita, Rita e Mara Castro, por contribuírem durante as análises fenotípicas e principalmente pelo suporte com as atividades de rotina do laboratório.

Ao Dr. Mauro de Medeiros Muniz por compartilhar gentilmente seu espaço de trabalho no laboratório de imunodiagnóstico durante as análises moleculares.

A meu marido, Cláudio, por me incentivar com palavras de força e por contribuir durante o período de realização do curso com as atividades de rotina de nossa casa. Obrigada pelo carinho e dedicação sempre presentes.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

A Deus, onde tudo começou.

“Muitas coisas não ousamos empreender por parecerem difíceis; entretanto, são difíceis porque não ousamos empreendê-las”.
(Sêneca)

Chaves, A.L.S., **Análise microbiológica de isolados de *Fusarium* spp. obtidos em um hospital de oncologia do Rio de Janeiro, Brasil.** Rio de Janeiro, 2015. 89 f. Dissertação [Mestrado de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Fungos do gênero *Fusarium* spp. são ubíquos e geralmente não são patogênicos. Algumas espécies termotolerantes podem causar infecção localizada em pele traumatizada e unhas de hospedeiros imunocompetentes. Grave infecção disseminada é comum em pacientes imunossuprimidos, principalmente neutropênicos portadores de neoplasias. *Fusarium* spp. tem sido relatado como patógeno emergente em centros oncológicos, sendo considerado atualmente a terceira causa de micose invasiva no Instituto Nacional do Câncer – Inca, Rio de Janeiro. É fundamental o diagnóstico precoce do fungo, assim como a correta identificação laboratorial da espécie isolada, para se estabelecer o correto tratamento e o sucesso terapêutico. O objetivo deste estudo foi identificar isolados de *Fusarium* spp., de origem clínica e ambiental, por técnicas fenotípicas e genotípicas, e o perfil de sensibilidade aos antifúngicos em um hospital de oncologia do Rio de Janeiro, no período de janeiro a setembro de 2014. Foram avaliados 42 isolados de *Fusarium* spp., sendo 35 isolados clínicos provenientes de 19 pacientes com cultura positiva para *Fusarium* spp., obtidos principalmente de hemoculturas, e sete isolados ambientais provenientes de diferentes locais do hospital, obtidos durante investigação epidemiológica nas enfermarias onde os pacientes estavam internados. Dezesete pacientes apresentaram fusariose, um paciente teve infecção localizada de pele e outro paciente apenas colonização em lavado brônquico alveolar. A maioria é representada por pacientes pediátricos (58,8%), do gênero masculino (58,8%), neutropênicos (52,9%), com doença de base hematológica (70,6%), internados no hospital e submetidos à quimioterapia (88,2%). Todos os pacientes com fusariose utilizaram cateter de longa duração. Através da amplificação e sequenciamento da região *Internally Transcribed Spacer* (ITS) e do gene *Elongator Factor 1 α* (EF), foi possível indentificar três espécies diferentes. O isolado mais frequente foi FOSC - complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (32; 76,2%), seguido de FSSC - complexo de espécies *Fusarium solani* (9; 21,4%) e FIESC - complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti* (1; 2,4%). Foi possível identificar 100% de similaridade entre 31 isolados clínicos e uma amostra ambiental obtida na sala de manutenção de cateter do hospital, identificados como FOSC. Houve boa correlação entre os resultados das identificações morfológica e molecular dos isolados. Anfotericina B foi a única droga com atividade *in vitro*, com CIM 2-8 $\mu\text{g/ml}$ para os isolados clínicos, sugerindo resistência. Posaconazol não demonstrou inibição do crescimento. Enquanto voriconazol demonstrou valores mais elevados de CIM para FOSC, com MG de 10,7 $\mu\text{g/ml}$, quando comparado a FSSC, com MG de 8 $\mu\text{g/ml}$. Não houve diferença significativa entre a sensibilidade dos antifúngicos testados e as espécies identificadas. Os resultados encontrados confirmam a resistência intrínseca natural do gênero.

Palavras-chave: *Fusarium* spp, *Fusarium oxysporum*, fusariose, antifúngicos, teste de susceptibilidade aos antifúngicos.

Chaves, A.L.S., **Microbiological analyses of *Fusarium* spp. isolates in an oncology hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Rio de Janeiro, 2015. 89 s. Dissertation [Clinical Research MSc in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Fusarium* spp. are ubiquitous and are generally non-pathogenic. Some thermotolerant species can cause localized infection in traumatized skin and nail of immunocompetent hosts. Severe disseminated infection is common in immunocompromised patients, especially neutropenic patients with cancer. *Fusarium* spp. has been reported as an emerging pathogen in cancer centers, and is currently considered the third leading cause of invasive mycosis at the National Cancer Institute - INCA, Rio de Janeiro. It is essential the early detection of the fungus, as well as the correct laboratory identification of isolated species, to establish the correct treatment and therapeutic success. The objective of this study was to identify isolates of *Fusarium* spp., of clinical and environmental origin, by phenotypic and genotypic techniques, and the sensitivity profile to antifungal agents from an oncology hospital in Rio de Janeiro, Brazil, from January-September 2014. Forty-two isolates of *Fusarium* spp. were evaluated, 35 clinical isolates from 19 patients obtained mainly from blood cultures and seven environmental isolates from different locations in the hospital, obtained during epidemiological investigation in the wards of the patients. Seventeen patients had fusariosis, one patient had localized infection of the skin and another patient had bronchial alveolar colonization. Most are represented by pediatric patients (58.8%), males (58.8%), neutropenics (52.9%), with hematologic underlying disease (70.6%) admitted to hospital and underwent chemotherapy (88.2%). All patients with fusariosis used long-term catheter. By amplification and sequencing the Internal Transcriber Spacer region (ITS) and Elongator Factor 1 α gene (EF), it was possible to identify three different species. The most frequent isolate was FOOSC - *Fusarium oxysporum* species complex (32; 76.2%), followed FSSC - *Fusarium solani* species complex (9; 21.4%) and FIESC - *Fusarium incarnatum equiseti* species complex (1; 2.4%). It was possible to identify 100% - similarity among 31 clinical isolates and an environmental sample obtained from the hospital catheter maintenance room, identified as FOOSC. There was a good correlation between the results of morphological and molecular identification of the isolates. Amphotericin B was the only drug with in vitro activity with MIC 2-8 μ g/ml for clinical isolates, suggesting resistance. Posaconazole showed no growth inhibition. Voriconazole showed higher MIC values for FOOSC, 10.7 μ g/ml, compared to FSSC, 8 μ g/ml. There was no significant difference between the sensitivity of the antifungal tested and identified species. The results confirm the natural intrinsic resistance of the genus.

Keywords: *Fusarium* spp, *Fusarium oxysporum*, fusariosis, antifungal, susceptibility testing to antifungal agents

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1a	Paroníquia micótica em pododáctilo por <i>Fusarium</i> spp.	4
Figura 1b	Múltiplas lesões necróticas de pele em paciente com fusariose	4
Figura 2a	Amostra de sangue periférico corada pelo método de Gram	13
Figura 2b	Microscopia de sangue periférico com KOH 30%	13
Figura 2c	Macroscopia de colônia de <i>Fusarium</i> spp. em meio de cultivo PDA	13
Figura 2d	Microscopia de <i>Fusarium</i> spp com lactofenol de algodão.	13
Figura 3a	Flor de craveiro branco - <i>Dianthus caryophyllus</i>	22
Figura 3b	Folhas de craveiro branco	22
Figura 3c	Folhas de craveiro fragmentadas e desidratadas	22
Figura 3d	Meio de cultivo CLA.	22
Figura 4	Representação gráfica de placa de 96 poços com fundo em “U”	29
Gráfico 1	Perfil epidemiológico de fusariose no Inca em 2014	32
Gráfico 2	Mediana da idade dos pacientes com fusariose	34
Gráfico 3	Gênero dos pacientes com fusariose	34
Gráfico 4	Doença de base dos pacientes com fusariose	34
Gráfico 5	Neutropenia nos pacientes com fusariose	35
Gráfico 6	Transplante de medula óssea nos pacientes com fusariose	35
Gráfico 7	Exposição à quimioterapia nos pacientes com fusariose	35
Gráfico 8	Uso de corticoides nos 30 dias anteriores à infecção nos pacientes com fusariose	36
Gráfico 9	Localização dos pacientes com fusariose	36
Gráfico 10	Co infecção por outros fungos nos pacientes com fusariose	36
Gráfico 11	Terapia antifúngica prévia nos pacientes com fusariose	37
Gráfico 12	Óbito após 30 dias à infecção nos pacientes com fusariose	37
Gráfico 13	Espécies de <i>Fusarium</i> identificadas nos pacientes	37
Gráfico 14	Amostras clínicas dos pacientes com fusariose	38
Figura 5a	Micromorfologia 1 em meio de cultivo CLA: sugestivo de	41

	FSSC	
Figura 5b	Micromorfologia 2 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FOSC	41
Figura 6a	Micromorfologia 3 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FIESC	41
Figura 6b	Micromorfologia 4 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FFSC	41
Figura 7	Micromorfologia 1 em meio de cultivo SNA	43
Figura 8	Macromorfologia 1 em meio de cultivo PDA: Sugestivo de FOSC	44
Figura 9	Macromorfologia 2 em meio de cultivo PDA: Sugestivo de FSSC	45
Figura 10	Macromorfologia 3 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FSSC	46
Figura 11	Macromorfologia 4 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FSSC	46
Figura 12	Macromorfologia 5 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FIESC	47
Figura 13	Macromorfologia 6 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FFSC	48
Figura 14	Dendrograma representando 45 isolados de <i>Fusarium</i> spp.	50
Figura 15	Árvore filogenética <i>Neighbor Joining</i> a partir da sequência do gene ITS	52
Figura 16	Árvore filogenética <i>Neighbor Joining</i> a partir da sequência do gene EF	53
Figura 17	Árvore filogenética <i>Neighbor Joining</i> combinada a partir da sequência dos genes ITS e EF	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos incluídos neste estudo	18
Tabela 2	Chave de identificação para espécies de <i>Fusarium</i>	24
Tabela 3	Frequências absolutas e relativas das espécies de <i>Fusarium</i> por tipo de isolado encontrado no Inca entre janeiro e setembro de 2014	55
Tabela 4	Valores de concentrações inibitórias mínimas e média geométrica do perfil de sensibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> de 35 isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp. no Inca entre janeiro e setembro de 2014 de acordo com o documento CLSI M38-A2, 2008	56
Tabela 5	Valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) do perfil de sensibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> de sete isolados ambientais de <i>Fusarium</i> spp. isolados no Inca entre janeiro e setembro de 2014 de acordo com o documento CLSI M38-A2, 2008	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	pares de base
CIM	concentração inibitória mínima
CIM50	concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados fúngicos
CIM90	concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados fúngicos
CLA	<i>carnation leaf-piece agar medium</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-r	ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTP	desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EF	<i>Elongator Factor 1 α</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCSC	complexo de espécies <i>Fusarium chlamydosporum</i>
FDSC	complexo de espécies <i>Fusarium dimerum</i>
FFSC	complexo de espécies <i>Fusarium fujikuroi</i>
FIESC	complexo de espécies <i>Fusarium incarnatum equiseti</i>
FOSC	complexo de espécies <i>Fusarium oxysporum</i>
FSAMSC	complexo de espécies <i>Fusarium sambucinum</i>
FSSC	complexo de espécies <i>Fusarium solani</i>
FTSC	complexo de espécies <i>Fusarium trincinctum</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana
Inca	Instituto Nacional do Câncer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITS	<i>Internally transcribed spacer</i>

KOH	hidróxido de potássio
LB	linfoma de Burkitt
LH	linfoma Hodgkin
LLA	leucemia linfoide aguda
LMA	leucemia mieloide aguda
MG	média geométrica
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>potato dextrose agar</i>
PDTIS	Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz
RNA-r	ácido ribonucleico ribossômico
RPM	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNA	<i>Spezzieller Nährstoffarmer agar</i>
TAQ	DNA polimerase termoestável
TES	N-tris [hidroximetil]metil-2-aminoetano sulfonato
Tris base	hidroximetilaminometano
Tris HCl	hidroximetilaminometano cloridrato
TSA	teste de susceptibilidade aos antifúngicos
UFC	unidade formadora de colônia

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O GÊNERO <i>Fusarium</i>	1
1.2	FUSARIOSE	2
1.3	EPIDEMIOLOGIA DA FUSARIOSE	5
1.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	7
1.5	TRATAMENTO	9
1.6	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	10
2	JUSTIFICATIVA	12
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	16
4.2	MICRORGANISMOS	16
4.3	MARCADORES CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES COM FUSARIOSE	20
4.4	TERMOTOLERÂNCIA	21
4.5	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	21
4.6	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	25
4.6.1	Extração do DNA fúngico	25
4.6.2	Identificação molecular dos complexos de espécies	26
4.7	TSA - TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	28
5	ANÁLISE DE RESULTADOS	32
5.1	MARCADORES CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES COM FUSARIOSE	32
5.2	TERMOTOLERÂNCIA	39
5.3	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	39
5.3.1	Avaliação em meio de cultivo CLA	39
5.3.2	Avaliação em meio de cultivo SNA	42
5.3.3	Avaliação em meio de cultivo PDA	44
5.3.4	Classificação fenotípica dos complexos de espécies	48
5.4	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	51
5.5	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	56
6	DISCUSSÃO	59

7 CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
APÊNDICES	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Fusarium*

O gênero *Fusarium* foi introduzido por Link em 1809. Os membros deste gênero contêm muitas espécies fitopatogênicas descritas. São chamados hialohifomicetos e podem ocasionar doenças em plantas, seres humanos e animais domésticos (O'DONNELL *et al.*, 2010; LESLIE *et al.*, 2006). Os fungos do gênero *Fusarium* são microrganismos ubíquos, vivendo como saprófitos no solo, água e plantas. No homem, podem afetar os tecidos superficiais e profundos, causando grande variedade de manifestações clínicas (SIDRIM *et al.*, 2010). Segundo Emmons e colaboradores (1977), a patogenicidade de um fungo pode ser expressa pela capacidade do microrganismo de tolerar temperaturas de 35-37°C. *Fusarium* spp. se desenvolve a temperatura ambiente 25-30°C, porém, nem todos os isolados são termotolerantes e, portanto, capazes de causarem infecções invasivas. O gênero *Fusarium* compreende cerca de 200 espécies agrupadas em complexos de espécies filogenéticas, que apresentam pouca ou nenhuma diferença morfológica entre si (O'DONNELL *et al.*, 2010). Em 2013, Guarro classificou em oito os complexos de espécies filogenéticas:

FIESC – complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti*

FSAMSC - complexo de espécies *Fusarium sambucinum*

FTSC - complexo de espécies *Fusarium trincinctum*

FFSC - complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*

FOSC - complexo de espécies *Fusarium oxysporum*

FCSC - complexo de espécies *Fusarium chlamydosporum*

FSSC - complexo de espécies *Fusarium solani*

FDSC - complexo de espécies *Fusarium dimerum*

A identificação em nível de gênero não apresenta dificuldade. Baseia-se na visualização microscópica de macroconídios septados, estruturas em forma de meia lua (GUARRO *et al.*, 1992). Entretanto, as espécies podem ser identificadas de acordo com critérios morfológicos descritos em chaves de identificação (DE HOOG *et al.*, 2011). Recomenda-se a confirmação com métodos moleculares (GUARRO, 2013). A técnica de PCR baseada na detecção da região *Internally transcribed spacer* (ITS) (OECHSLER *et al.*, 2009) e do gene *elongator factor 1 α* (EF) (GEISER *et al.*, 2004), permite identificar os complexos de espécies (LIU, 2011).

Em 2013, foi publicada uma proposta taxonômica de utilização unitária do nome *Fusarium*, a fim de abolir a nomenclatura do microrganismo de acordo com seu estágio sexual e preservar a nomenclatura da forma anamorfa. Assim, os nomes *Gibberella* e *Haemonectria*, correspondentes à forma telemorfa do gênero, estão em desuso (GEISER *et al.*, 2013).

Durante muitos anos, este gênero foi considerado apenas um contaminante em laboratórios clínicos. Entretanto, seu papel como patógeno vem ganhando terreno nos últimos anos. Numa classificação geral, as fusarioses pertencem ao grupo das infecções oportunistas, frequentemente também classificadas como hialohifomicoses (SIDRIM *et al.*, 2010).

A maioria das espécies patogênicas de *Fusarium* tem sido encontrada em amostras ambientais, incluindo sistemas de encanamento de água em hospitais (SHORT *et al.*, 2011). Entretanto, um estudo que investigou amostras ambientais do fungo em um hospital terciário demonstrou que a fonte provável de infecção foi proveniente de amostras ambientais externas ao ambiente hospitalar, como por exemplo, a água (RAAD *et al.*, 2002).

1.2 FUSARIOSE

A Fusariose é considerada uma infecção extremamente rara, que apesar da incidência estável, apresenta elevada mortalidade, que combinadas à ausência de um protocolo de manejo adequado nos casos de infecção, contribuem para o crescente interesse no estudo desta micose (GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2015). A doença

é definida pelo isolamento de *Fusarium* spp. em qualquer material biológico, como sangue, ou em biópsia de lesões de pele, ou ainda de secreções respiratórias em pacientes com sinais clínicos típicos, incluindo febre e lesões cutâneas disseminadas (NUCCI *et al.*, 2003).

Os quadros invasivos da doença são observados apenas em pacientes gravemente imunossuprimidos, com desfecho fatal na maioria dos casos. A fusariose disseminada é particularmente frequente em pacientes com transplante de medula alogênico, devido à maior imunossupressão acompanhada de neutropenia profunda e prolongada. Pacientes neutropênicos com leucemia aguda, principalmente leucemia mieloide aguda, estão propensos à infecção (NUCCI *et al.*, 2003). Pacientes imunossuprimidos são susceptíveis a infecções cavitárias. A mortalidade em casos de infecções sistêmicas por *Fusarium* spp. é superior a 70 % (LESLIE *et al.*, 2006). O resultado é pior nos pacientes em uso de corticosteroides em relação àqueles que não receberam esta terapia (NUCCI *et al.*, 2003).

As espécies de *Fusarium*, assim como outros hialohifomicetos, apresentam uma tendência a invadir vasos sanguíneos e provocar trombose e necrose, sendo manifestação comum, nos quadros disseminados, a presença de lesões necróticas múltiplas da pele, das quais o cultivo é facilmente obtido. Vários são os órgãos acometidos durante a disseminação hematogênica, tais como pulmão, rins, olhos, fígado e baço. As hemoculturas geralmente são positivas em 60% dos casos (SIDRIM *et al.*, 2010).

Devido à falta de resposta ao tratamento antifúngico para fusariose, antes de se iniciar a terapia imunossupressora, a presença de infecções cutâneas por *Fusarium* spp. envolvendo pele ou unha deve ser investigada cuidadosamente, uma vez que estas lesões (**Figura 1**) podem ser um foco de disseminação hematogênica (NUCCI *et al.*, 2007).



Figura 1: (a) Paroníquia micótica em pododáctilo por *Fusarium* spp.; (b) Múltiplas lesões necróticas de pele em paciente com fusariose.

Nos pulmões a fusariose inclui doença alérgica broncopulmonar, pneumonite de hipersensibilidade, colonização de uma cavidade preexistente, e pneumonia. A pneumonia por *Fusarium* spp. ocorre quase exclusivamente em pacientes imunodeprimidos, podendo ocorrer em quase 50% dos casos. A imagem radiológica nestes casos é semelhante a aspergilose invasiva, com infiltrado alveolar, nódulos com ou sem sinal do halo, infiltrados em vidro fosco e derrame pleural (NUCCI *et al.*, 2015).

Em estudo recente, Nucci e colaboradores (2013a) observaram um aumento na incidência de fusariose invasiva nos pacientes da enfermaria hematológica em um hospital no Rio de Janeiro. A porta de entrada cutânea foi evidente na maioria dos casos. O estudo também demonstrou um aumento na incidência de infecções superficiais causadas por *Fusarium* spp. em pacientes ambulatoriais não hematológicos no mesmo hospital durante o mesmo período. Foram coletadas amostras ambientais de ar e água na unidade, e a análise molecular dos isolados obtidos foi realizada. A hipótese para porta de entrada do microrganismo foi de colonização de pele traumatizada através da água contaminada do hospital, o que não ficou comprovado, demonstrando a necessidade de mais estudos para

determinar reservatórios de *Fusarium* spp. nas comunidades e de medidas preventivas para pacientes com alto risco para a doença.

Buchta e colaboradores (2014) relataram um raro surto por FOOSC em um hospital universitário na República Tcheca. No período de uma semana, 20 pacientes, do total de 40 pacientes, foram diagnosticados com endoftalmite após cirurgia de catarata. Os fatores comuns entre os pacientes foi o uso da mesma sala do centro cirúrgico e o uso do mesmo lote de uma solução oftalmológica durante as cirurgias. Estes foram investigados, porém a fonte de contaminação ambiental não foi confirmada. O setor foi isolado e foram adotadas medidas de desinfecção, com acompanhamento microbiológico do ambiente por cinco semanas. Nenhum microrganismo foi identificado.

A elevada incidência da doença nas últimas décadas ocorre provavelmente devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos com sobrevida média prolongada, particularmente durante a terapia antifúngica profilática para infecções fúngicas, que não são efetivas para *Fusarium* spp. A melhor capacitação dos profissionais em identificar o agente etiológico nos laboratórios também contribui com o aumento da detecção de fusariose no período (NUCCI *et al.*, 2014a).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA FUSARIOSE

Aproximadamente 60% das infecções em seres humanos são causadas por espécies do complexo *Fusarium solani* (FSSC) e 20% pelo complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOOSC). No entanto, nem todos os isolados de FOOSC são capazes de crescer a 35-37°C e, portanto, de causar infecções invasivas, já que termotolerância é um pré-requisito para virulência. As demais infecções em humanos são produzidas por espécies dos complexos FIESC – Complexo de Espécies *Fusarium incarnatum equiseti*, FFSC - Complexo de Espécies *Fusarium fugikuroi*, FCSC - Complexo de Espécies *Fusarium chlamyosporum*, e FDSC - Complexo de Espécies *Fusarium dimerum* (SHORT *et al.*, 2011). Dentro destes complexos quatro espécies são comumente identificadas em humanos: *F. petrophilum*, *F. keratoplasticum* e duas espécies filogenéticas não nomeadas dos complexos FOOSC

e FDSC (SHORT *et al.*, 2013). FFSC é a espécie mais frequente, isolada em 57% dos casos de infecções disseminadas. Enquanto que FSSC é mais comum em infecções superficiais, frequente em 46% destes casos (TORTORANO, 2008).

Colombo e colaboradores (2013) relataram um caso de colonização de cateter venoso central por *Fusarium solani*, sem infecção disseminada, demonstrando que estes dispositivos estão propensos à contaminação por fungos filamentosos e que, portanto, pacientes com cateter venoso central, devem ser investigados em caso de febre persistente.

Em recente estudo, foram relatados sete casos de infecção sistêmica por *Fusarium verticillioides* em pacientes imunocompetentes após realização de reforma em uma unidade hospitalar em Lárissa, Grécia, demonstrando que medidas eficazes de controle de infecção são necessárias, antes, durante e após as atividades de demolição e construção em serviços de saúde (GEORGIADOU *et al.*, 2014).

No Brasil foi recentemente relatado que a fusariose é a primeira doença fúngica invasiva seguida por aspergilose e candidose (NUCCI *et al.*, 2013b). Diferenças regionais na distribuição das espécies de *Fusarium* spp. podem ser encontradas (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014). No Brasil foi recentemente relatado que a fusariose é a primeira doença fúngica invasiva seguida por aspergilose e candidose (NUCCI *et al.*, 2013b). Um estudo epidemiológico retrospectivo na Turquia identificou as espécies responsáveis por 47 casos de fusariose durante 20 anos. Os resultados provaram que FFSC foi o agente encontrado com maior frequência, responsável por 17 casos (51,5%), seguido por FSSC, responsável por 14 casos (42,4%), FDSC e FOSC, um caso de cada agente respectivamente (CILO *et al.*, 2015).

A prevenção da infecção nos pacientes colonizados, a suspeita clínica para detecção de diagnóstico precoce e o uso combinado de anfotericina B e voriconazol, são essenciais para diminuir a mortalidade desta doença devastadora (GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2015).

1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Um ponto fundamental para o diagnóstico preciso da fusariose é o procedimento correto de obtenção da amostra clínica para exame. Considerando-se a possibilidade da existência de infecções mistas por *Fusarium* spp. e que mais de uma espécie pode estar envolvida, o diagnóstico não deve depender da identificação de amostra única. Guarro e colaboradores (2000) identificaram duas cepas de duas amostras distintas de um paciente com infecção pelo HIV, sendo uma cepa de *F. verticillioides* a partir da hemocultura, e outra cepa de *F. solani* a partir da biópsia de pele do paciente. A detecção de uma única espécie, quando estão presentes mais espécies, pode resultar num tratamento errôneo (GUARRO, 2013).

Mediante a coleta de uma amostra clínica satisfatória, o diagnóstico micológico laboratorial inicia-se com a preparação de lâminas para observação direta (lâmina-lamínula com KOH 10-40%), onde serão observadas estruturas filamentosas hialinas, septadas, algumas vezes irregulares e com ramificações, formando ângulo de 45°, situação essa similar aos achados de *Aspergillus* spp. A cultura é feita em meio de cultivo PDA – *Potato Dextrose Agar*, e incubada à temperatura ambiente de 25°C a 30°C. As diferentes espécies crescem rapidamente (2-4 dias), mostrando colônias de textura algodonosa e coloração branca, que com o passar do tempo podem adquirir tonalidades variadas, como marrom, rosa ou violeta. O reverso da colônia apresenta pigmentação bastante variável, sendo de um modo geral, mais claro que o anverso. Micromorfologicamente, as colônias apresentam fiálides perpendiculares aos filamentos fúngicos, solitárias (monofiálides) ou ramificadas (polifiálides), evidenciando-se ou não, sobre estas, macrofialoconídios e/ ou microfialoconídios. Os macrofialoconídios são hialinos, bisseptados ou multisseptados, fusiformes ou em forma de meia-lua ou canoa, medindo de 3-8 µm x 11-70 µm. Os microfialoconídios são ovoides ou cilíndricos, sem septos ou com um septo, isolados ou formando pequenas cadeias. Sua dimensão varia de 3-4 µm x 4-8 µm (SIDRIM *et al.*, 2010).

As características macro e micro morfológicas são fundamentais para a identificação de *Fusarium* spp., no entanto, as espécies do gênero variam

significativamente, tanto morfológica como fisiologicamente. Pelo menos parte dessa variação ocorre em resposta a diferenças ambientais, incluindo diferenças de meios de cultivo, luz e temperatura (LESLIE *et al.*, 2006).

Muitos micologistas estão extremamente preocupados com o aumento das espécies de *Fusarium* que são difíceis, porém não impossíveis, de identificar morfológicamente (LESLIE *et al.*, 2006). As principais espécies causadoras de doenças em humanos são espécies dos complexos *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme* e *F. proliferatum* (RICHARDSON *et al.*, 2012). Para a identificação das diferentes espécies de *Fusarium*, deve-se consultar literatura especializada ou enviar as cepas para identificação em um centro de referência (SIDRIM *et al.*, 2010). Os manuais mais conhecidos utilizados para a identificação morfológica foram escritos por Gerlach *et al.* (1982), Nelson *et al.* (1983), Burgess *et al.* (1994) e Leslie *et al.* (2006).

A identificação específica de *Fusarium* é um desafio. Embora algumas espécies possam ser identificadas por critérios morfológicos, recomendam-se técnicas moleculares para confirmação. A maioria dos casos de fusariose é causada por espécies do complexo *Fusarium solani*, algumas não identificadas, que só podem ser confirmadas por métodos moleculares (GUARRO, 2013). Num estudo recente de Scheel e colaboradores (2013), a análise comparativa do sequenciamento do gene EF, utilizando o banco de dados FUSARIUM ID, característica BLAST, permitiu a identificação da maioria dos isolados, em nível de espécie, com a sequência das identificações que variaram entre 94,1 % e 100 % (média = 99,9% e mediana = 100%), quando comparado com os isolados do banco de dados.

A pesquisa do antígeno galactomanana é um teste importante para o diagnóstico e acompanhamento da aspergilose invasiva (CHAI *et al.*, 2010; NUCCI *et al.*, 2014b). Tortorano e colaboradores publicaram em 2012 um estudo onde 9 dos 11 pacientes hematológicos com fusariose disseminada testados pelo menos duas vezes para o antígeno galactomanana apresentaram resultados positivos na ausência de isolamento de *Aspergillus* em cultura.

Nucci e colaboradores (2014b) afirmaram em estudo retrospectivo que o antígeno galactomanana apresenta reação cruzada com *Fusarium* spp., sendo encontrado frequentemente no soro de pacientes com fusariose invasiva, caracterizando-se então como um antígeno marcador de doença precoce por tornar-se positivo antes do diagnóstico na maioria dos pacientes. A sensibilidade e especificidade encontradas foram de 83% e 67%, respectivamente. A pesquisa de galactomana nos pacientes foi positiva antes do diagnóstico da fusariose invasiva em 11 dos 15 casos avaliados (73%). Esses achados podem ter implicações importantes para a escolha da terapia antifúngica em locais com alta prevalência de fusariose invasiva. A reação cruzada por *Fusarium* spp. encontrada no teste de galactomana para *Aspergillus* spp. parece estar relacionada ao fato de que os dois gêneros apresentam parede celular semelhante (TORTORANO *et al.*, 2012).

1.5 TRATAMENTO

As condutas terapêuticas corretas recomendadas para os quadros de fusariose não são muito claras e são de difícil interpretação em razão do pequeno número de casos diagnosticados e tratados. Assim a eficácia terapêutica é avaliada nos resultados dos relatos clínicos e estudos retrospectivos (GUARRO, 2013). A ressecção cirúrgica do tecido infectado associada ao uso de anfotericina B tem sido relatada. Deve-se ter em mente o fato de que a melhora da neutropenia do paciente, sem dúvida, ajuda na resposta clínica nesses quadros (SIDRIM *et al.*, 2010).

Os fármacos mais eficazes no tratamento de fusariose são anfotericina B, voriconazol e posaconazol (GUARRO, 2013). De acordo com orientações terapêuticas disponíveis para o tratamento da hialohifomicose, recomenda-se anfotericina B e voriconazol na terapêutica da fusariose sistêmica (TORTORANO *et al.*, 2014).

Outros aspectos relevantes a serem considerados no tratamento da fusariose são a remoção cirúrgica do foco da infecção, a remoção de cateter venoso contaminado e a recuperação da neutropenia (GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2015).

1.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Com o aumento da incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o crescente número de agentes antifúngicos disponíveis, criou-se em 2002 pelo CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, um consenso de referência de métodos laboratoriais reprodutíveis, baseado na susceptibilidade *in vitro* de fungos filamentosos aos fármacos, para auxiliar na escolha da terapia antifúngica mais adequada aos casos de infecções por fungos filamentosos (CLSI, 2002).

Em 2008, foi publicada uma atualização deste método de referência (M38-A2) recomendado pelo CLSI para a determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de fungos filamentosos oportunistas não dermatófitos que causam infecções invasivas, incluindo *Fusarium* spp. (CLSI, 2008).

De acordo com o CLSI não há pontos de corte definidos até o momento para a interpretação dos resultados. A relevância clínica dos testes desse grupo de fungos patógenos continua incerta. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração do fármaco que proporciona qualquer grau de crescimento discernível. Para a anfotericina B sugere-se que, quando um isolado fúngico, incluindo *Fusarium* spp., apresenta valor da CIM > 2 µg/mL é provável que este isolado seja resistente à anfotericina B. Para os antifúngicos triazólicos voriconazol e posaconazol não há pontos de corte definidos e dados disponíveis que indiquem uma correlação entre a CIM e o resultado do tratamento (CLSI, 2002; 2008).

O perfil de susceptibilidade para *Fusarium* é espécie dependente. Assim, o teste deve ser realizado para qualquer isolado do microrganismo envolvido em infecção fúngica invasiva. Em estudo sobre a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos de diferentes espécies de *Fusarium* foi relatado que a maioria dos isolados resistentes foram identificadas como *F. solani* e apresentaram valores de CIM com média geométrica (MG) > 8 µg/mL para itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol e terbinafina. Enquanto que para a mesma espécie, a anfotericina B apresentou CIM com média geométrica de 1,33 µg/mL. O estudo demonstrou ainda que a anfotericina B é o único fármaco com atividade *in vitro* para

todos os isolados de *Fusarium* spp. A MG das CIM para esta droga foi 1,15 µg/mL (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2008).

Azor e colaboradores (2009a) avaliaram a susceptibilidade antifúngica de 25 isolados de FOOSC, obtidos principalmente a partir de infecções superficiais. Foram testados os fármacos anfotericina B, albaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol, flucitosina, micafungina e terbinafina. A melhor MG foi detectada para anfotericina B, 2,32 µg/mL. Para terbinafina a CIM variou entre 0,125 - 32 µg/mL. As outras drogas testadas foram praticamente inativas para os isolados de FOOSC.

Estudo recente relatou que o antifúngico anfotericina B costuma apresentar alta atividade *in vitro* para todas as espécies, com valores de MG entre 0,125 – 4 µg/mL. Enquanto que voriconazol e posaconazol apresentaram atividade variável entre as espécies do complexo FSSC, com valores de MG entre 2 - 8 µg/mL e 0,125 - >16 µg/mL, respectivamente (CILO *et al.*, 2015).

Segundo García-Ruiz e colaboradores (2015), em revisão que relatou três casos de fusariose em pacientes imunodeprimidos na Espanha, a maioria dos isolados demonstrou baixa susceptibilidade aos antifúngicos analisados, que foram anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina, e terbinafina. As exceções foram FDSC, com MIC 0,25 µg/mL para anfotericina B e MIC 1 µg/mL para terbinafina, e FOOSC, com MIC 1 µg/mL para anfotericina B.

2 JUSTIFICATIVA

A identificação do gênero *Fusarium* não apresenta maiores dificuldades, mas a identificação das espécies é um desafio para os micologistas, visto que há uma grande diversidade de espécies no ambiente, o que torna a sua diferenciação extremamente complexa (LESLIE *et al.*, 2006). Além disso, a fusariose é de mau prognóstico, a sobrevivência dos pacientes com neutropenia e corticoterapia é de 0%, enquanto para pacientes neutropênicos, sem uso de corticoides, é de 4%. Em contraste, pacientes sem fatores de risco ou apenas em uso de corticoides, apresentam taxas de sobrevivência de 67% e 30%, respectivamente (NUCCI *et al.*, 2007), tornando fundamental fazer um diagnóstico laboratorial em pouco tempo. Tal fato demonstra que são necessários mais estudos para a correta e rápida identificação das espécies do gênero *Fusarium*.

Por se tratar de uma infecção invasiva grave, a identificação precoce do fungo, assim como a correta identificação das espécies isoladas, é determinante para se estabelecer o correto tratamento e o sucesso terapêutico (ATALLA *et al.*, 2010). As diferentes espécies respondem diferentemente aos fármacos disponíveis para o tratamento da fusariose. Os sintomas clínicos da doença mimetizam a aspergilose invasiva e a diferenciação das hifas de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. ao exame direto nem sempre é possível, o que aumenta a letalidade.

Fusarium spp. tem sido relatado como patógeno emergente em centros de atendimento oncológico (HERBRECHT *et al.*, 2000), sendo considerado atualmente o terceiro agente de micose invasiva no Inca - Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, logo após infecções causadas por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., respectivamente. No primeiro semestre de 2014, no período de uma semana, observou-se um número crescente de amostras de hemoculturas positivas no Laboratório de Micologia do Inca. Após pesquisa direta dos espécimes clínicos com coloração de Gram e KOH 30% foi possível observar imagens sugestivas de *Fusarium* spp.. O resultado foi confirmado posteriormente pela cultura positiva do material (**Figura 2**).

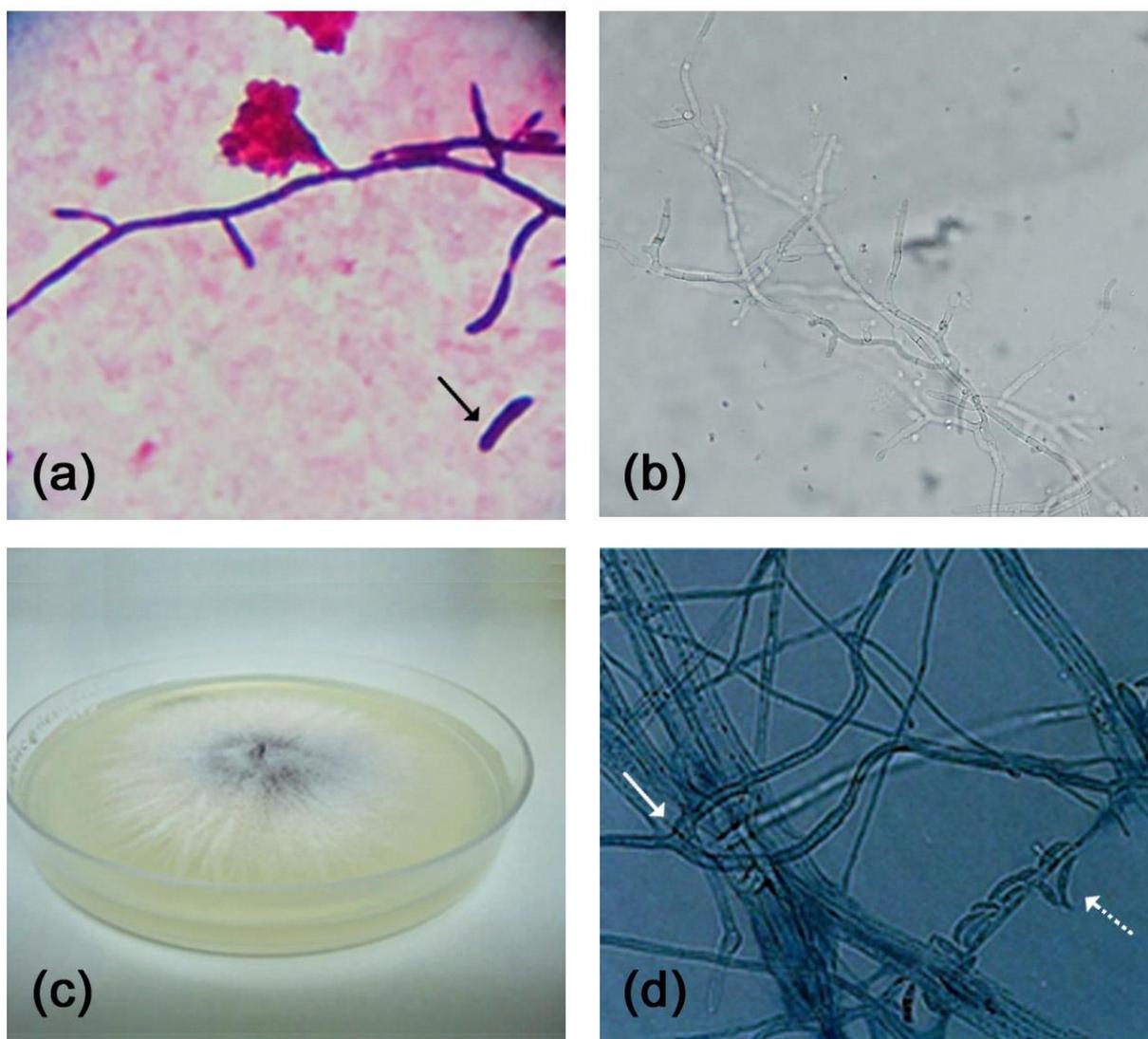


Figura 2 (a) Amostra de sangue periférico corada pelo método de Gram: presença de hifas ramificadas e macroconídios em “forma de banana”, indicados pela seta. (b) Microscopia de sangue periférico com KOH 30%: presença de hifas hialinas septadas e ramificadas; (c) Macroscopia de colônia de *Fusarium* spp. em meio de cultivo PDA: isolada a partir de amostra de sangue periférico; (d) Microscopia de *Fusarium* spp com lactofenol de algodão: a partir de colônia isolada de amostra de sangue periférico. Presença de hifas hialinas septadas e ramificadas com angulo em 45° evidente, indicado por seta em linha reta, e macroconídios multicelulares em “forma de banana”, indicados por seta em linha tracejada.

Na tentativa de identificar a possível fonte de contaminação para interromper o surto de fusariose no Inca, foram coletadas amostras ambientais nas clínicas onde os pacientes com amostras positivas estavam internados.

Fusariose disseminada grave é cada vez mais frequente em portadores de neoplasias, principalmente pacientes imunossuprimidos e neutropênicos (SEGAL *et al.*, 2012). A identificação das espécies causadoras de fusariose disseminada em um hospital de oncologia e a determinação de sua susceptibilidade antifúngica é fundamental para reduzir a sua elevada letalidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os complexos de espécies de *Fusarium* spp., de origem clínica e ambiental, por técnicas fenotípicas e genotípicas, e determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos em um hospital de oncologia do Rio de Janeiro no período de janeiro a setembro de 2014.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar as frequências dos principais marcadores clínicos e epidemiológicos dos pacientes com fusariose no período estudado.
- 2 Analisar fenotipicamente, pela macro e micromorfologia, os isolados de *Fusarium* sp.
- 3 Analisar genotipicamente, utilizando a região ITS do DNAr e o gene *ef-1 α* pelas técnicas de PCR e sequenciamento, os isolados de *Fusarium* spp.
- 4 Determinar as frequências dos complexos de espécies de *Fusarium* identificados.
- 5 Verificar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, posaconazol e voriconazol.
- 6 Correlacionar os complexos de espécies de *Fusarium* identificados e seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos no período estudado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI/Fiocruz, sob o número 38527614.6.0000.5262, datado de 09/12/2014, conforme os requisitos da resolução do CNS 466/ 2012, que regulamentam a pesquisa em seres humanos.

4.2 MICRORGANISMOS

O critério de inclusão utilizado no estudo foi a identificação clássica do gênero por características micro e macromorfológicas. Foram registrados no Laboratório de Micologia do Inca o total de 42 isolados de *Fusarium* spp., no período de janeiro a setembro de 2014. Destes, 35 foram isolados clínicos, provenientes de 19 pacientes com cultura positiva para *Fusarium* spp. obtidos de diferentes espécimes clínicos: 26 amostras de hemoculturas, seis amostras de ponta de cateter, uma amostra de urina, uma amostra de lavado brônquico alveolar e uma amostra de raspado de pele **(Tabela 1)**.

Após perceber o crescente número de amostras positivas para *Fusarium* spp. no período estudado, provenientes principalmente de hemoculturas, um forte indício de surto hospitalar, iniciou-se uma investigação sobre os medicamentos e soluções injetáveis comuns que foram administrados aos pacientes. Estes materiais foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do Inca, e após concentração do volume por centrifugação, foram processados em duplicata nos meios de cultivo agar sabouraud 2% de glicose com cloranfenicol (Difco) e agar mycosel (Difco). Nenhum microrganismo foi recuperado durante esta investigação.

Amostras ambientais também foram coletadas nas áreas úmidas nas clínicas onde os pacientes estavam internados. A coleta foi realizada com swab estéril, sem meio de transporte, posteriormente eluido em caldo BHI – *brain heart infusion* (Difco) e semeados em duplicata nos meios de cultivo agar sabouraud 2% de glicose com

cloranfenicol (Difco) e agar mycosel (Difco). O monitoramento microbiológico do ar também foi realizado por empresa terceirizada através da técnica de *Air Sampler*. Durante a investigação ambiental foram registrados sete isolados de *Fusarium* spp. provenientes de diferentes locais do hospital: parede da pia da sala de manutenção do cateter, forro da sala de preparo de quimioterápicos da farmácia, parede da pia da sala de preparo de medicamentos da enfermaria pediátrica, parede da pia da emergência pediátrica, piso e chuveiro do quarto do paciente 19 e parede da pia do posto de medicamentos do Cemo (**Tabela 1**).

As cepas de referência utilizadas no estudo foram obtidas no Setor de Fungos de Referência do INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na Fiocruz. Foram utilizadas como controle de qualidade durante as análises fenotípicas e genotípicas *Fusarium solani* (ATCC36031) INCQS 40099, *Fusarium oxysporum* (ATCC48112) INCQS 40144 e *Fusarium verticillioides* (ATCC38159) INCQS 40151. Para o teste de susceptibilidade aos antifúngicos, as cepas *Aspergillus flavus* (ATCC204304) INCQS 40182 e *Aspergillus fumigatus* (ATCC204305) INCQS 40248 também foram utilizadas (**Tabela 1**).

Tabela 1: microrganismos incluídos neste estudo.

NÚMERO	MICROORGANISMO	DATA	ORIGEM	PACIENTE
F01	<i>Fusarium</i> spp.	fev/14	sangue periférico	1
F02	<i>Fusarium</i> spp.	fev/14	sangue cateter longa duração	2
F04	<i>Fusarium</i> spp.	fev/14	sangue cateter longa duração	3
F06	<i>Fusarium</i> spp.	fev/14	sangue periférico	
F07	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	4
F09	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	5
F10	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	6
F41	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	urina	
F11	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter curta duração	7
F12	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue periférico	
F14	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	ponta de cateter	
F15	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	8
F16	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter curta duração	
F18	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue periférico	
F19	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	raspado de pele	9
F21	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	10
F23	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	ponta de cateter	
F24	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	11
F25	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue cateter longa duração	12
F27	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue periférico	
F29	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	sangue periférico	13
F33	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	ponta de cateter	
F34	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	sangue cateter longa duração	14
F36	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	ponta de cateter	
F37	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	lavado bronco alveolar	15
F38	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	sangue cateter curta duração	16
F39	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	sangue cateter longa duração	
F40	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	ponta de cateter	
F43	<i>Fusarium</i> spp.	abr/14	sangue periférico	17
F44	<i>Fusarium</i> spp.	mai/14	sangue cateter longa duração	
F45	<i>Fusarium</i> spp.	mai/14	sangue cateter curta duração	
F46	<i>Fusarium</i> spp.	mai/14	ponta de cateter	
F47	<i>Fusarium</i> spp.	mai/14	sangue cateter longa duração	18
F49	<i>Fusarium</i> spp.	mai/14	sangue periférico	
F51	<i>Fusarium</i> spp.	jun/14	sangue cateter longa duração	19
A01	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	parede da pia - sala de manutenção do cateter	N/A
A02	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	forro do teto - sala de preparo de quimioterápicos	N/A
A03	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	parede da pia - sala de preparo de medicamentos da pediatria	N/A
A04	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	parede da pia - sala da emergência pediátrica	N/A
A05	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	piso do chuveiro - quarto do paciente 19	N/A
A06	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	chuveiro – quarto do paciente 19	N/A
A08	<i>Fusarium</i> spp.	mar/14	parede da pia - posto de medicamentos do Cemo	N/A

ATCC 01	<i>Fusarium solani</i> ATCC36031 INCQS 40099	N/A	Setor de Fungos de Referência do INCQS/ Fiocruz	N/A
ATCC 02	<i>Fusarium oxysporum</i> ATCC48112 INCQS 40144	N/A	Setor de Fungos de Referência do INCQS/ Fiocruz	N/A
ATCC 03	<i>Fusarium verticillioides</i> ATCC38159 INCQS 40151	N/A	Setor de Fungos de Referência do INCQS/ Fiocruz	N/A
ATCC 04	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC204304 INCQS 40182	N/A	Setor de Fungos de Referência do INCQS/ Fiocruz	N/A
ATCC 05	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC204305 INCQS 40248	N/A	Setor de Fungos de Referência do INCQS/ Fiocruz	N/A

N/A, não se aplica.

Todos os isolados de *Fusarium* spp. foram armazenados no Laboratório de Micologia do Inca em água destilada estéril, sob temperatura ambiente de 25°C, e ainda em glicerol 15% (Sigma), sob refrigeração a -20°C, e foram submetidos a repiques sucessivos a partir da técnica de esgotamento. Desta forma, com o objetivo de isolar colônias puras, a suspensão fúngica armazenada foi inoculada em placas de petri contendo meio de cultivo agar sabouraud 2% de glicose com cloranfenicol (Difco). Estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 30°C, por cinco dias e passaram por observações diárias durante este período para verificar possíveis contaminações em aspecto macro e micromorfológico. A temperatura de 30°C foi utilizada como controle positivo para avaliação da viabilidade dos isolados. Todos os isolados se apresentaram viáveis e foram repicados e mantidos em PDA (Difco), e posteriormente submetidos às análises microbiológicas.

Novos lotes foram preparados após recuperação e obtenção de colônias puras. As cepas de *Fusarium* spp. foram repicadas em PDA (Difco) e incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 30°C por sete dias para obtenção de massa celular. Posteriormente, foram preservadas novamente em glicerol 15% (Sigma), sob refrigeração a -20°C, em triplicata, e encontram-se arquivadas no Laboratório de

Micologia do Inca, também foram depositadas no Laboratório de Micologia do INI/ Fiocruz e ainda na Coleção de Fungos Patogênicos do INI/ Fiocruz (WDCM951), onde encontram-se liofilizados.

4.3 MARCADORES CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES COM FUSARIOSE

Os principais marcadores epidemiológicos dos 19 pacientes que apresentaram cultura positiva para *Fusarium* spp. no período estudado foram coletados a partir da revisão de seus prontuários e inseridos em ficha de investigação (**Apêndice A**). Não foram citados nomes, números de prontuário ou similares. Os dados coletados foram analisados epidemiologicamente frente aos marcadores pré-estabelecidos nos 30 dias anteriores à infecção: gênero, idade, doença de base, presença de neutropenia profunda (<500 células / mm^3), presença de galactomanana plasmática $> 0,5$ ng/mL, exposição à quimioterapia, uso de corticoides, uso de antifúngicos (anfotericina B, posaconazol ou voriconazol) e coinfeção por outros fungos, transplante de medula óssea prévio, presença de dispositivos vasculares antes do diagnóstico, presença de colonização/ infecção prévia por *Fusarium* spp., localização do paciente no hospital no momento da infecção. O óbito foi analisado 30 dias após a infecção.

No ano de 2014, no período de janeiro a setembro, 19 pacientes apresentaram cultura positiva para *Fusarium* spp. Dezesete destes pacientes apresentaram fusariose, com amostras de hemoculturas positivas. Apenas dois pacientes não participaram das análises devido não apresentarem doença disseminada. Destes pacientes, um apresentou infecção localizada de pele e o outro, colonização em lavado brônquico alveolar.

A fim de caracterizar a população no período estudado, após as análises, foram calculadas as frequências absolutas e relativas dos principais marcadores clínicos e epidemiológicos encontrados nos 17 pacientes com fusariose e dos complexos de espécies identificados.

4.4 TERMOTOLERÂNCIA

A termotolerância dos 42 isolados foi verificada por semeadura em meio de cultivo PDA (Difco) e incubação em estufa bacteriológica por 7 dias, sob temperaturas de 35°C e 37°C.

4.5 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

A identificação morfológica das espécies nesse estudo foi baseada em três meios de cultivo: CLA – *carnation leaf-piece agar médium*, SNA – *Spezzieller Nährstoffarmer agar* e PDA – *potato dextrose agar* (LESLIE *et al.*, 2006). Para avaliação das características primárias, os isolados foram semeados em duplicata em placas contendo meio de cultivo CLA, produzido com folhas de *Dianthus caryophyllus* (FISHER *et al.*, 1981) e também em placas de meio de cultivo SNA. O CLA foi preparado assepticamente com folhas de craveiro frescas. As folhas foram previamente lavadas e cortadas em pedaços de 1-2 cm. Em seguida, foram desidratadas em estufa bacteriológica a 70°C por 3-4 horas, até ficarem quebradiças. Posteriormente os fragmentos de folhas de craveiro foram esterilizados com luz ultravioleta por 30 minutos de cada lado da folha. Após este procedimento, foi adicionado 2% de agar água estéril em placas de petri de 60 cm contendo 6-8 fragmentos de folhas de craveiro (**Figura 3**).

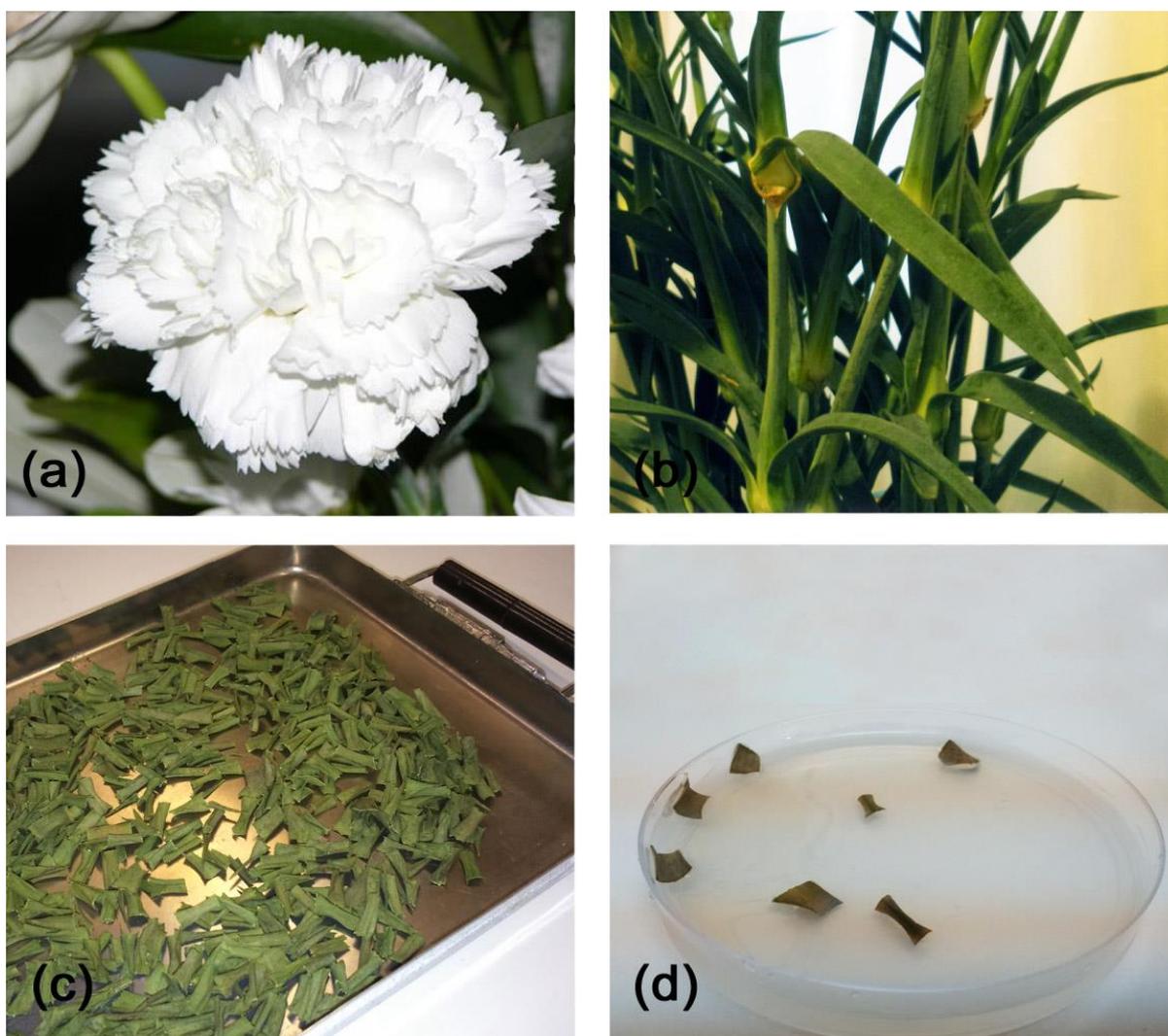


Figura 3: (a) Flor de craveiro branco - *Dianthus caryophyllus*; (b) Folhas de craveiro branco; (c) Folhas de craveiro fragmentadas e desidratadas; (d) Meio de cultivo CLA.

Após inoculação em meio de cultivo CLA os isolados foram incubados em estufa bacteriológica a 30°C por 14 dias. Neste meio de cultivo os isolados foram avaliados, microscopicamente, quanto à forma e o tamanho dos macroconídios e microconídios.

O meio de cultivo SNA foi produzido assepticamente com 1 g K_2PO_4 , 1 g KNO_3 , 0,5 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,5 g KCl, 0,2 g glicose, 0,2 g sacarose, adicionados a 2% de agar água, e distribuídos em placas de petri de 60mm. Após inoculação neste meio de cultivo, os isolados foram incubados em estufa bacteriológica a 30°C por 14-60 dias. No meio de cultivo SNA foram investigados microscopicamente quanto à

forma, o tamanho, a formação dos microconídios e de suas células conidiogênicas, e ainda a produção de clamidósporos.

Para avaliação das características secundárias, os isolados foram semeados em duplicata em placas com meio PDA (Sigma), incubadas a 30°C por 7 dias (LESLIE *et al.*, 2006). Neste meio de cultivo foram observadas a macromorfologia da colônia, incluindo a taxa de crescimento (diâmetro da colônia), a textura, a coloração do anverso e reverso da colônia e a produção de pigmento difusível no meio. As análises das taxas de crescimento foram realizadas em uma placa de petri conforme descrito por Burgess *et al.* (1994).

Os dados obtidos nas análises foram descritos em ficha de identificação fenotípica de *Fusarium* spp. elaborada para este estudo (**Apêndice B**) e posteriormente organizados em planilha de Excel para confecção do dendrograma. As características primárias quanto aos aspectos macromorfológico e micromorfológico foram:

- Abundância e coloração do micélio aéreo;
- Pigmentação do meio;
- Macroconídios: tamanho, forma, número de septos, forma da célula apical e basal;
- Microconídios: tamanho, forma, número de células, formação, natureza das células conidiogênicas e conidióforos;
- Clamidósporos: presença ou ausência e tipo de formação.

A identificação das espécies deste estudo foi realizada pela chave de identificação para o gênero *Fusarium* (**Tabela 2**) proposta por De Hoog *et al.*, (2001).

Para melhor entendimento e classificação das espécies, pelos dados micromorfológicos e macromorfológicos gerados a partir de 34 variáveis dos isolados e cepas de referência descritos nas análises fenotípicas, foi possível gerar um dendrograma. Foi utilizado o software DendroUPGMA (2002) disponível em <http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.phpD-UPGMA>.

Tabela 2: Chave de identificação para espécies de *Fusarium*

1a	Colônias que atingem menos que 2 cm de diâmetro em 7–10 dias; macroconídio geralmente com 1–2 septos	2
1b	Colônias que atingem mais que 2 cm de diâmetro em 7-10 dias	4
2a	Macroconídeo, maior que 55 µm; clamidósporos ausentes	<i>F.aquaeductum</i>
2b	Macroconídeo curto, geralmente menor que 25 µm; clamidósporos presentes ou ausentes	3
3a	Macroconídeo extremamente curvo e com ápice pontiagudo; clamidósporos presentes	<i>F.dimerum</i>
3b	Macroconídeo ligeiramente curvo e com ápice menos pontiagudo; clamidósporos ausentes	<i>F.tabacinum</i>
4a	Micoconídeos raros ou ausentes; colônias “cor de bronze” a marrom; célula conidiogênica poliblastica abundante	<i>F.incarnatum</i> <i>equiseti</i>
4b	Microconídeos numerosos	5
5a	Microconídeos dispostos em cadeias	6
5b	Microconídeos não dispostos em cadeia	8
6a	Microconídeos apenas em monofiálides	7
6b	Microconídeos principalmente em polifiálides	<i>F.proliferatum</i>
7a	Microconídeos napiformes e em forma de limão	<i>F.napiforme</i>
7b	Microconídeos com outras formas	<i>F.fujikuroi</i>
8a	Célula conidiogênica poliblastica freqüente	9
8b	Célula conidiogênica poliblastica ausente	10
9a	Colônia rosa a violeta; blastoconídeo fusiforme a lanceolado, com 1-2 célula conidiogênica cada; clamidósporos ausentes	<i>F.sacchari</i>
9b	Colônia vermelha; blastoconídeo elipsóide, com 2-10 células conidiogênicas próximas; clamidósporos presentes	<i>F.clamydosporum</i>
10a	Microconídeos em fiálides curtas e usualmente laterais; macroconídeo com célula basal distinta; colônia branca a roxa	<i>F.oxysporum</i>
10b	Microconídeos em fiálides longas; macroconídeo com célula basal indistinta; colônia branca, creme ou azulada	<i>F.solani</i>

Fonte: De Hoog *et al.* (2001, p. 173-4)

4.6 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

4.6.1 Extração do DNA fúngico

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) dos isolados de *Fusarium* spp. foi realizada a partir da obtenção do micélio fúngico em meio de cultivo PDA, após incubação a 30°C por 10 dias utilizando o protocolo de Woods e colaboradores (1993) modificado.

Após raspagem do micélio, com o auxílio de uma alça de platina em “L” estéril, foram adicionados 500 µL de massa fúngica em tubo Eppendorf de 1,5 mL. A fim de romper a parede e membrana das células fúngicas, foi realizada uma etapa inicial de resfriamento, em que este tubo foi imerso em banho de nitrogênio líquido até o congelamento das células. Em seguida, foi realizado o processo de lise mecânica, no qual estas células foram maceradas com auxílio mecânico de pistilo até obtenção de uma forma pastosa, liberando assim o material nuclear do microrganismo. Após maceração foi adicionado 200 µL de tampão de lise TES (EDTA 50 mM, sorbitol, Tris HCl 10 mM) ao material que foi novamente macerado até obtenção de uma suspensão homogênea. Esta etapa foi repetida três vezes totalizando 600 µL de TES. A suspensão foi homogeneizada em *vórtex* por 30 segundos e posteriormente o tubo foi imerso em banho maria sob temperatura de 100°C por 5 minutos.

Transcorrido o aquecimento, a suspensão foi novamente homogeneizada em *vórtex* por 1 minuto e resfriada em temperatura ambiente. Na etapa seguinte, o material foi centrifugado por 10 minutos a 14000 RPM com recuperação e transferência do sobrenadante para outro microtubo, descartando o sedimento celular. Para obter melhor rendimento, a fim de retirar restos de debris celulares, este sobrenadante foi novamente centrifugado por 3 minutos a 14000 RPM. Assim, o sobrenadante recuperado foi transferido para novo microtubo e o sedimento celular novamente desprezado.

O volume da suspensão (sobrenadante) recuperado foi aferido e iniciado o processo de lavagem, com uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico

(25:24:1) na relação 1/1 do volume aferido. A suspensão foi homogeneizada em *vórtex* por 30 segundos e posteriormente o material foi centrifugado em por 10 minutos a 14000 RPM. Este processo foi repetido três vezes até a obtenção de limpeza do material com a retirada dos debrís celulares e proteínas.

Para precipitação do DNA, após a etapa de lavagem, adicionamos à suspensão 10% do volume de sobrenadante recuperado de solução de acetato de sódio 3 M, seguida de 5 partes do volume de sobrenadante recuperado de etanol PA (100%). A solução foi homogeneizada repetidas vezes por inversão do tubo e centrifugada por 30 minutos a 14000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e finalmente o *pellet* formado. Este foi lavado com álcool 70% para dessalinizar o DNA e remover resíduos de etanol 100% e acetato de sódio 3 M. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 14000 RPM e o sobrenadante novamente dispensado.

A última etapa da extração de DNA foi a secagem do *pellet* para remoção do etanol 70%, realizada em microcentrífuga a vácuo sem uso de calor. Em seguida, este *pellet* foi hidratado em 50 µL de água destilada Milli-Q e homogeneizado para sua dissolução. As amostras diluídas foram armazenadas a 4°C *overnight* para a hidratação completa do *pellet*. A amostra de DNA obtida foi quantificada em espectrofotômetro e diluída para a concentração de 25 ng para uso futuro. Posteriormente, as soluções foram estocadas a -20°C.

4.6.2 Identificação molecular dos complexos de espécies

A identificação genotípica dos complexos de espécies foi realizada pela amplificação e sequenciamento da região ITS, com os primers ITS1 e ITS2 (Sigma), e do gene *ef-1α*, com os primers EF1 e EF2 (Sigma) do DNA-r. Durante as análises dos produtos da PCR foram utilizadas as seguintes cepas como referência dos complexos: *Fusarium solani* (ATCC36031) INCQS 40099, *Fusarium oxysporum* (ATCC48112) INCQS 40144 e *Fusarium fujikuroi* (ATCC38159) INCQS 40151.

Os complexos de espécies de *Fusarium* foram identificados com os *primers* citados por Oechsler *et al.*, (2009) para a porção final 18A do DNA-r F18A (5' – GCG GAG GGA TCA TTA CCG AGT T – 3') e para a porção inicial 28S do RNA-r – ácido

ribonucleico ribossômico F28S (5' – CAG CGG GTA TTC CTA CCT GATC – 3') que amplificou a região ITS compreendendo as regiões ITS1 e ITS2.

O preparo do mix da reação da PCR para ITS foi realizado seguindo o protocolo de Liu (2011): 5 µL de buffer 10x PCR (Sigma-Aldrich, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (Sigma-Aldrich, EUA), 1 µL de dNTP 200 µM (QIAGEN, Netherlands), 0,5 µL de TAQ DNA polimerase (Sigma-Aldrich, EUA), 1 µL de primer ITS1 10 µM (Sigma-Aldrich, EUA), 1 µL de primer ITS2 10 µM (Sigma-Aldrich, EUA), 25 µL de água Milli-Q por reação. Ao volume final de mix foram adicionados 200 ng de DNA completando o volume final de 50 µL por reação. As condições utilizadas para a amplificação foram: 95°C por 3 minutos; 45 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, e 68°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR obtidos possuíam aproximadamente 700 bp.

Os complexos de espécies de *Fusarium* spp. também foram identificados com o sequenciamento parcial do gene EF. Esta região foi amplificada com os primers descritos por Geiser *et al.* (2004), EF1 (5' – ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC – 3') e EF2 (5' – GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT – 3').

O preparo do mix e amplificação da reação de PCR foi realizado segundo o protocolo de Alastruey-Izquierdo *et al.* (2008) adaptado: 5 µL de buffer 10x PCR (Sigma-Aldrich, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (Sigma-Aldrich, EUA), 1,0 µL de dNTP 200 µM (QIAGEN, Netherlands), 1,0 µL de TAQ DNA polimerase (Sigma-Aldrich, EUA), 1 µL de primer EF1 10 µM (Sigma-Aldrich, EUA), 1 µL de primer EF2 10 µM (Sigma-Aldrich, EUA) e 19,5 µL de água Milli-Q por reação. Ao volume final de mix foram adicionados 200 ng de DNA completando o volume final de 50 µL por reação. As condições para a amplificação foram: ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 47°C, e 2 minutos a 72°C, e ciclo final de 10 minutos a 72°C.

Após o término da reação para cada gene, foi realizado eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e tampão TBE1x (Tris, ácido bórico, EDTA).

Todos os produtos da PCR foram purificados com o kit comercial *PureLink PCR Purification* (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para posterior envio a plataforma de sequenciamento. O sequenciamento dos produtos

da PCR foi realizado de acordo com o método de Sanger e colaboradores (1977) no laboratório de sequenciamento da Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz – PDTIS/Fiocruz. As sequências de DNA dos isolados foram editadas no *software* Sequencher versão 4.9 (Gene Codes Corporation), seguindo-se o alinhamento no *software* Mega versão 6.0.

Comparando-se as sequências obtidas dos dois genes para os 42 isolados com 98 - 100% de similaridade quando comparados com as sequências disponíveis no banco de dados NCBI - *National Center for Biotechnology Information, GenBank*, com a ferramenta de busca BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* e pelo agrupamento utilizando o *software* Mega versão 6.0, foi possível realizar as análises filogenéticas e identificar os complexos de espécies.

4.7 TSA - TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

O TSA foi realizado de acordo com o protocolo descrito no documento de referência CLSI M38-A2 (2008) que descreve um método para verificar a susceptibilidade dos fungos filamentosos, oportunistas e não dermatófitos, que causam infecções invasivas, incluindo espécies de *Fusarium*, assim como outros fungos oportunistas. Todos os isolados foram testados frente aos antifúngicos anfotericina B, voriconazol e posaconazol.

Todos os 42 isolados, 35 isolados clínicos e 7 isolados ambientais, foram testados em triplicata e com a utilização de 2 cepas de referência, *Aspergillus flavus* (ATCC204304) INCQS 40182 e *Aspergillus fumigatus* (ATCC204305) INCQS 40248, em cada ensaio realizado. Os resultados foram validados após a confirmação das CIM encontradas para as cepas de referência em cada ensaio, cujos valores estavam dentro da faixa recomendada e citada pelo documento CLSI, 2008.

Os agentes antifúngicos foram preparados conforme descrito pelo CLSI e colocados em microplacas de 96 poços com fundo em “U” distintas, estéreis, com tampa. Foram preparadas 10 concentrações dos antifúngicos (0,03 a 16 µg/mL) realizando diluições seriadas de uma solução estoque dos fármacos, inicialmente em dimetil sulfoxido e posteriormente em meio de cultura RPMI 1640. Um volume de

100 μL de cada concentração foi colocado em uma coluna da placa de 96 poços, começando da menor concentração aplicada na coluna 11 até a maior concentração, que foi aplicada na coluna 2.

Após este procedimento, a placa conteve as seguintes concentrações dos fármacos: coluna 11: 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 10: 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 9: 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 8: 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 7: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 6: 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 5: 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 4: 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 3: 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coluna 2: 16,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ As colunas 1 e 12, por se tratarem de controles foram deixadas sem solução de antifúngico. As placas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso por um período máximo de 30 dias. No momento do uso, na coluna 1 foram colocados 200 μL de meio RPMI 1640 (controle de esterilidade). Na coluna 12 foram adicionados 100 μL de meio RPMI 1640 e 100 μL do inóculo fúngico (controle de crescimento), (**Figura 4**).

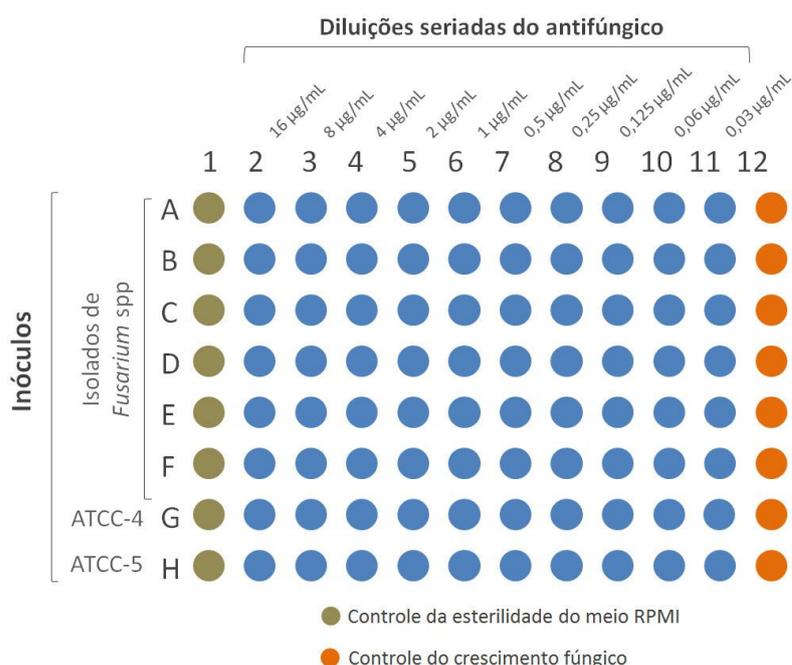


Figura 4: representação gráfica de placa de 96 poços com fundo em “U” - diferentes concentrações de antifúngico, em azul.

Para preparar o inóculo fúngico padrão, conforme descrito pelo CLSI, as colônias de *Fusarium* spp. foram incubadas durante 3 dias em estufa a uma temperatura de 35°C em meio PDA (Difco), e depois, até o sétimo dia, foram

incubadas a uma temperatura de 25°C. As cepas controle, *Aspergillus flavus* ATCC204304 (ATCC 05) e *Aspergillus fumigatus* ATCC204305 (ATCC 06) foram cultivadas em meio PDA durante 7 dias, a 35°C. Após o período de incubação as amostras foram ressuspensas em 2 mL de solução salina fisiológica estéril.

Após colocar uma tampa no frasco da suspensão a mesma foi homogeneizada em vórtex (Biomixer QL-901) durante 15 segundos. A turbidez da suspensão resultante foi ajustada de acordo com tubo 2,0 da escala de McFarland para *Fusarium* spp. e de acordo com tubo 0,5 da escala de McFarland para as cepas controle *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*, sendo corrigidas com solução fisiológica quando necessário.

Logo após o preparo, os diferentes inóculos foram colocados em dispensadores descartáveis estéreis e, com auxílio de pipeta multicanal com 11 ponteiros, foram colocados 100 µL da suspensão final de células fúngicas em uma das linhas da placa, dos poços 2 a 12. Nas linhas G e H de cada placa foram inoculadas as cepas-padrão *Aspergillus flavus* ATCC 204304 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, sendo então as amostras aplicadas da linha A até a linha F da placa.

A incubação foi realizada em estufa a 35°C por 48 - 72 horas. A leitura dos testes foi feita visualmente. Com a visualização do fundo da placa contra fonte luminosa, foi possível comparar a turvação em cada concentração dos fármacos em relação ao controle de crescimento (coluna 12) podendo com isso verificar os poços onde houve crescimento do fungo. O valor da CIM para anfotericina B, voriconazol e posaconazol foi determinado como a menor concentração que previne qualquer grau de crescimento fúngico discernível (100% de inibição).

A CIM₅₀, CIM₉₀ e a MG foram obtidas pelos programas estatísticos Microsoft Excel e SPSS 17.0.

A relação entre as CIMs dos diferentes fármacos testados entre as espécies identificadas foi avaliada com o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* realizado com intervalo de confiança de 95%. Para as análises, as espécies identificadas foram divididas em dois grupos: FOSC e Não-FOSC, a fim de avaliar o perfil de susceptibilidade entre estes grupos. O mesmo teste foi realizado, com a mesma

finalidade, para avaliar a relação entre as CIMs dos fármacos testados entre os grupos, amostras clínicas e amostras ambientais. A relação entre a eficácia *in vitro* dos fármacos testados foi avaliada utilizando o teste não paramétrico de *Wilcoxon* realizado com intervalo de confiança de 95%,

5 ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1 MARCADORES CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES COM FUSARIOSE

No ano de 2014, no período de janeiro a setembro, foram identificados 35 isolados clínicos de *Fusarium* spp. no Laboratório de Micologia do Inca, correspondentes a 19 pacientes com cultura positiva para *Fusarium* spp. Dezesete destes pacientes apresentaram fusariose, com amostras de hemoculturas positivas (**Gráfico 1**). Apenas dois pacientes não apresentaram doença disseminada. Destes pacientes, um apresentou infecção localizada de pele e o outro, colonização detectada em lavado brônquico alveolar.

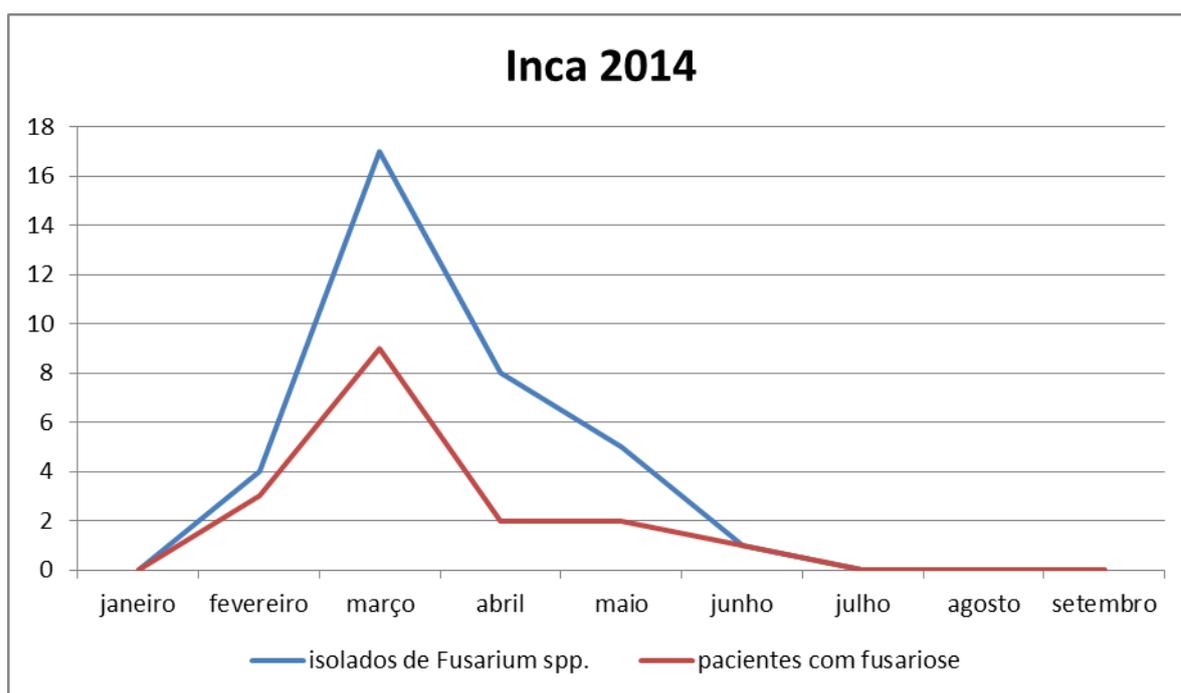


Gráfico 1 – Perfil epidemiológico de fusariose no INCA em 2014.

Foram calculadas as frequências absolutas e relativas dos principais marcadores epidemiológicos encontrados nos 17 pacientes com fusariose e dos

complexos de espécies identificados. Os dados encontram-se descritos no **apêndice C**.

A maioria é representada por pacientes pediátricos (10 - 58,8%), do gênero masculino, neutropênicos, sem galactomana alterada, com doença de base hematológica, internados no hospital e submetidos à quimioterapia e à terapia corticosteroide. Apenas um paciente foi submetido à terapia prévia com voriconazol nos 30 dias antecedentes à fusariose. Todos os pacientes com fusariose utilizaram cateter de longa duração. Apenas quatro pacientes (24%) evoluíram com desfecho fatal pela doença após 30 dias da infecção. Destes, um paciente teve neutropenia e uso de corticoides como fatores de risco para desfecho fatal. Outro teve apenas neutropenia como fator de risco para óbito e dois pacientes não apresentaram neutropenia e também não utilizaram corticoides. Os microrganismos identificados nestes pacientes que evoluíram para óbito foram, FSSC (dois pacientes) e FO SC (dois pacientes).

Dois pacientes apresentaram coinfeção por outros fungos, um com história prévia de *Aspergillus* spp., e outro paciente com infecção localizada de pele por *Sporothrix brasiliensis*. A espécie mais frequentemente identificada entre os pacientes com fusariose foi FO SC correspondendo a 15 pacientes (88,2%). FSSC foi identificado em dois pacientes com fusariose (11,8%). A doença de base hematológica prevalente foi a LLA (leucemia linfoide aguda) com quatro casos, seguida de LMA (leucemia mieloide aguda) com três casos, LH (Linfoma de Hodgkin) com três casos e LB (Linfoma de Burkitt) com dois casos. Os dados encontram-se ilustrados nos **gráficos 2 – 14**.

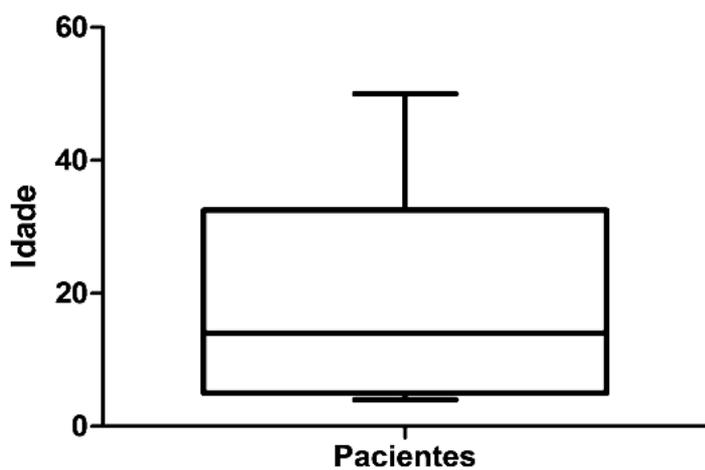


Gráfico 2 – Mediana da idade dos pacientes com fusariose.

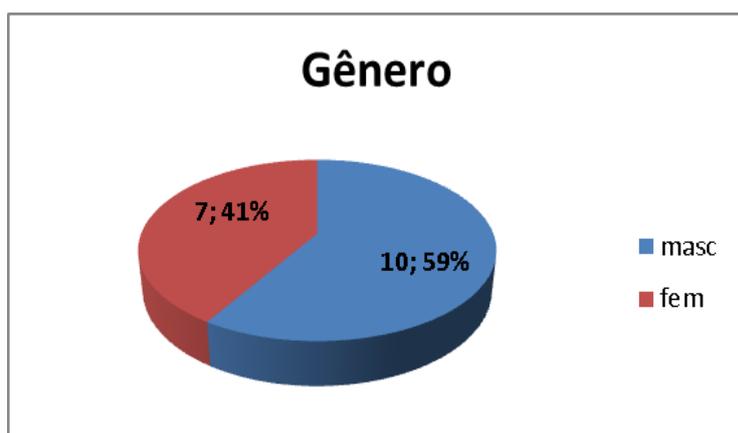


Gráfico 3 – Gênero dos pacientes com fusariose.

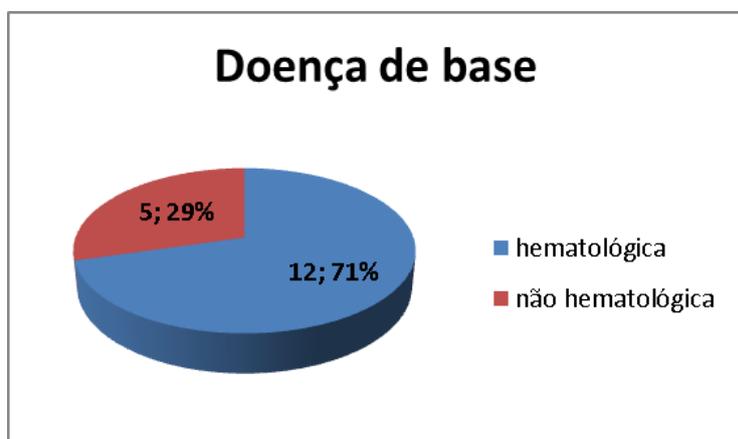


Gráfico 4 – Doença de base dos pacientes com fusariose.

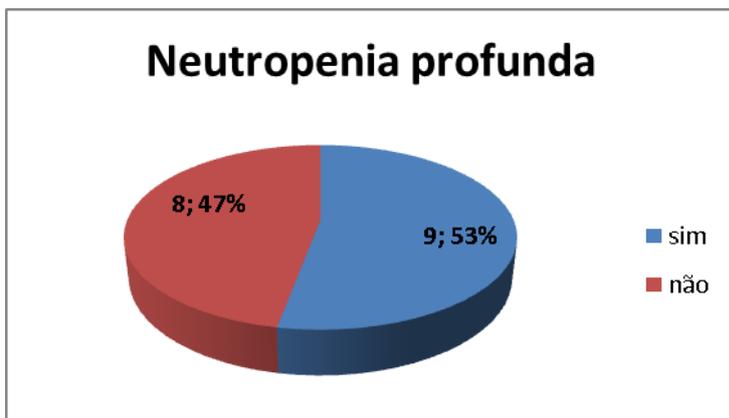


Gráfico 5 – Neutropenia nos pacientes com fusariose (< 500 células/ mm³).

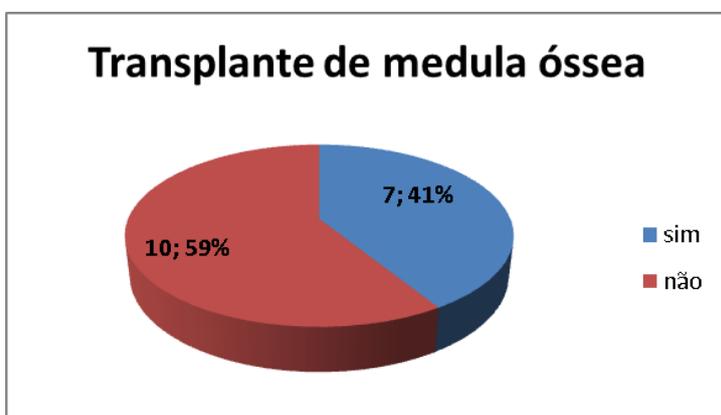


Gráfico 6 – Transplante de medula óssea nos pacientes com fusariose.



Gráfico 7 – Exposição à quimioterapia nos pacientes com fusariose.

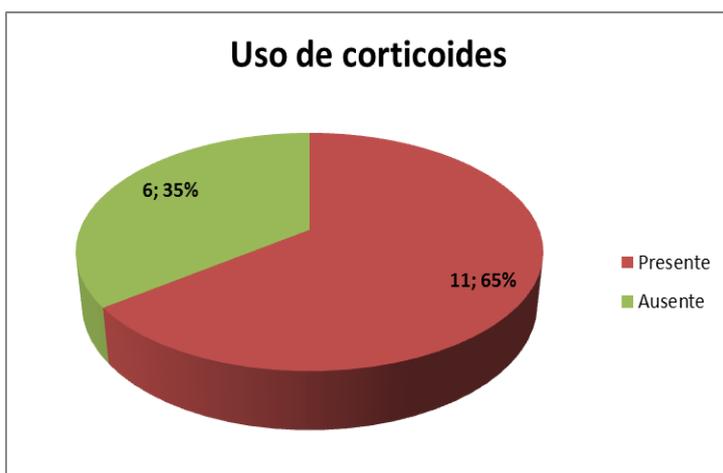


Gráfico 8 – Uso de corticoides nos 30 dias anteriores à infecção nos pacientes com fusariose.

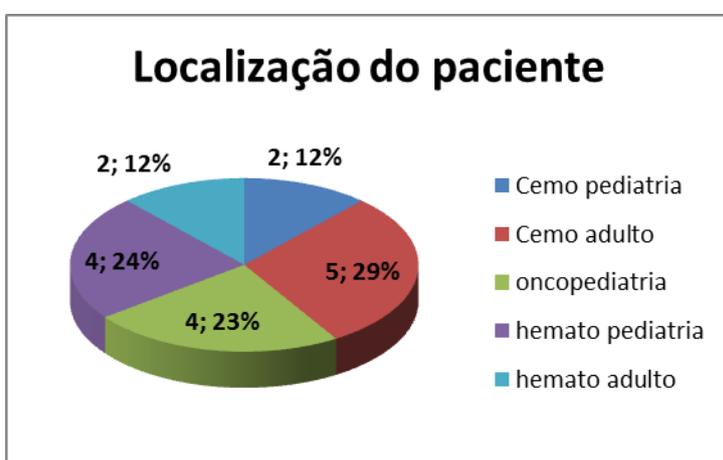


Gráfico 9 – Localização dos pacientes com fusariose.

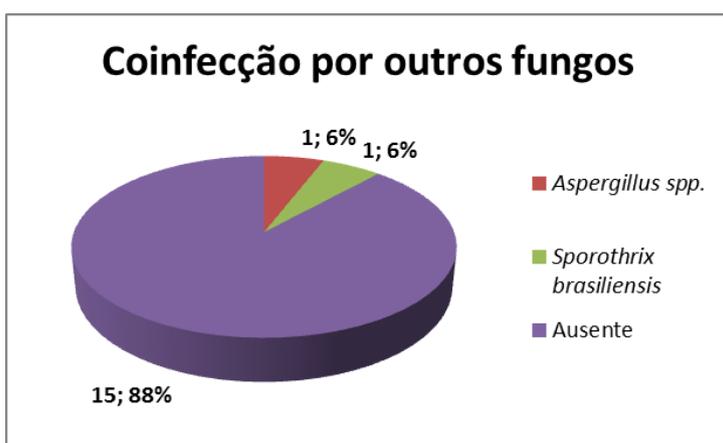


Gráfico 10 – Coinfecção por outros fungos nos pacientes com fusariose.

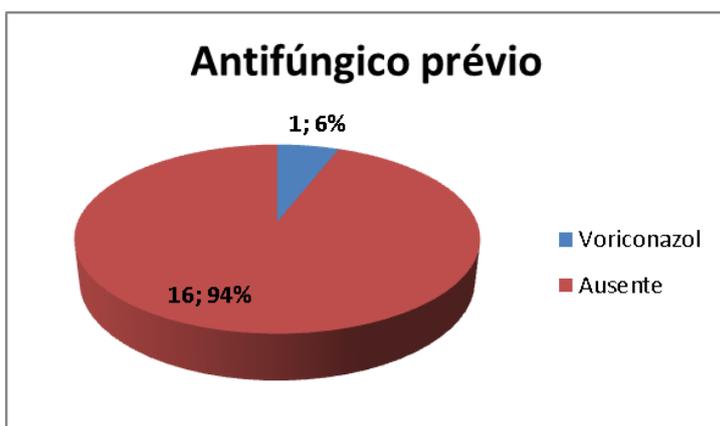


Gráfico 11 –Terapia antifúngica prévia nos pacientes com fusariose.

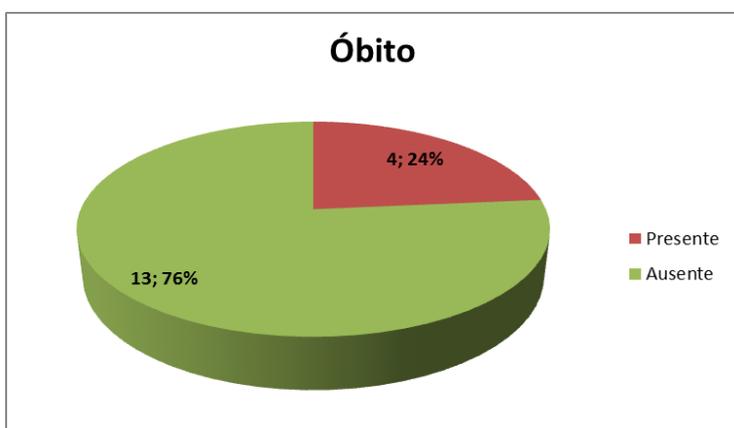


Gráfico 12 – Óbito após 30 dias à infecção nos pacientes com fusariose.

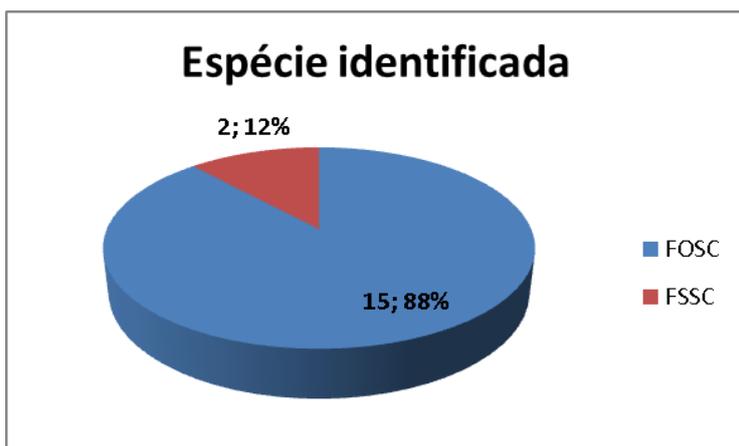


Gráfico 13 – Espécies de *Fusarium* identificadas nos pacientes com fusariose.

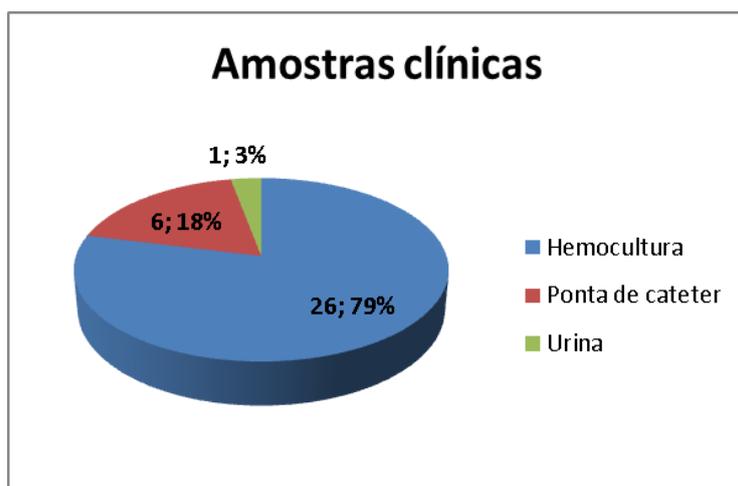


Gráfico 14 – Amostras clínicas dos pacientes com fusariose.

Um dos dois pacientes citados anteriormente que não apresentaram doença disseminada, apresentou infecção localizada de pele por FSSC, detectada por amostra de raspado de lesão cutânea. Este paciente era do gênero masculino, com 47 anos de idade, portador de doença de base hematológica (LMA), sem neutropenia profunda (< 500 céls/ mm^3), sem galactomanana $> 0,5$ ng/mL, submetido a transplante de medula óssea, exposto a quimioterapia e à terapia com corticoides, portador de cateter de longa duração.

O segundo paciente apresentou apenas colonização por FSSC detectada em amostra de lavado brônquico alveolar. Este paciente era do gênero masculino, portador de doença de base não hematológica (carcinoma epidermoide de pele), sem neutropenia profunda (< 500 céls/ mm^3), sem galactomanana $> 0,5$ ng/mL, não submetido a transplante de medula óssea, não exposto a quimioterapia, não submetido à terapia corticosteroide e não portador de cateter de longa duração. Ambos não apresentaram colonização/ infecção prévia por *Fusarium* spp., portanto sem história de antifúngico prévio para *Fusarium* spp., sem história de coinfeção por outros fungos e faziam apenas acompanhamento ambulatorial no INCA.

5.2 TERMOTOLERÂNCIA

A termotolerância foi confirmada para os 42 isolados fúngicos. Não houve diferença no crescimento dos isolados de *Fusarium* spp. sob as temperaturas testadas. Os 35 isolados clínicos e 7 isolados ambientais apresentaram crescimento em agar PDA (Difco) sob as temperaturas de 30°C, 35°C e 37°C.

5.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

5.3.1 Avaliação em meio de cultivo CLA

5.3.1.1 Micromorfologia

Após dez dias de incubação em meio de cultivo CLA todos os isolados apresentaram esporulação, com presença uniforme de macroconídios e microconídios. Após montagem de um bloco do meio de cultivo com lâmina e lamínula, foi possível observar que os macroconídios estavam próximos às folhas de craveiro e os microconídios distantes das folhas. Foram observados quatro padrões micromorfológicos para os isolados testados:

Micromorfologia 1 – Encontrada na cepa de referência ATCC 01 (*F. solani*), quatro isolados clínicos (F01, F19, F24, F51) e cinco isolados ambientais (A03, A04, A05, A06, A08). Macroconídios presentes porém escassos, com 1-3 septos, apresentando curvatura dorsal mais acentuada que a ventral, célula apical e basal indefinidas; Microconídios presentes e numerosos, com 0-1 septo, de formas oval e reniforme, dispostos em falsa cabeça, em monofiálides longas; Clamidósporos não foram observados. Sugestivo de FSSC (**Figura 5a**);

Micromorfologia 2 – Encontrada na cepa de referência ATCC 02 (*F. oxysporum*), 31 isolados clínicos e 1 isolado ambiental (A01). Macroconídios presentes porém

escassos, com 1-2 septos, apresentando curvatura dorsal mais acentuada que a ventral, célula apical embotada (forma de bota) e célula basal entalhada; Microconídios presentes e numerosos, não septados, de formas oval, reniforme e “forma de charuto”, dispostos em falsa cabeça, em monofiálides curtas; Clamidósporos não foram observados. Sugestivo de FOOSC (**Figura 5b**);

Micromorfologia 3 – Encontrada em uma amostra ambiental (A02). Macroconídios presentes e abundantes, com 4-7 septos, em “forma de agulha”, célula apical papilar e célula basal em “forma de pé”; Microconídios ausentes; Mesoconídios presentes, fusiformes, com 3-5 septos; Clamidósporos não foram observados. Sugestivo de FIESC (**Figura 6a**);

Micromorfologia 4 – Encontrada na cepa de referência ATCC 03 (*F. fujikuroi*). Macroconídios ausentes; Microconídios presentes e numerosos, não septados, de formas oval e fusiforme, dispostos em monofiálides curtas; Clamidósporos não foram observados. Sugestivo de FFSC (**Figura 6b**);

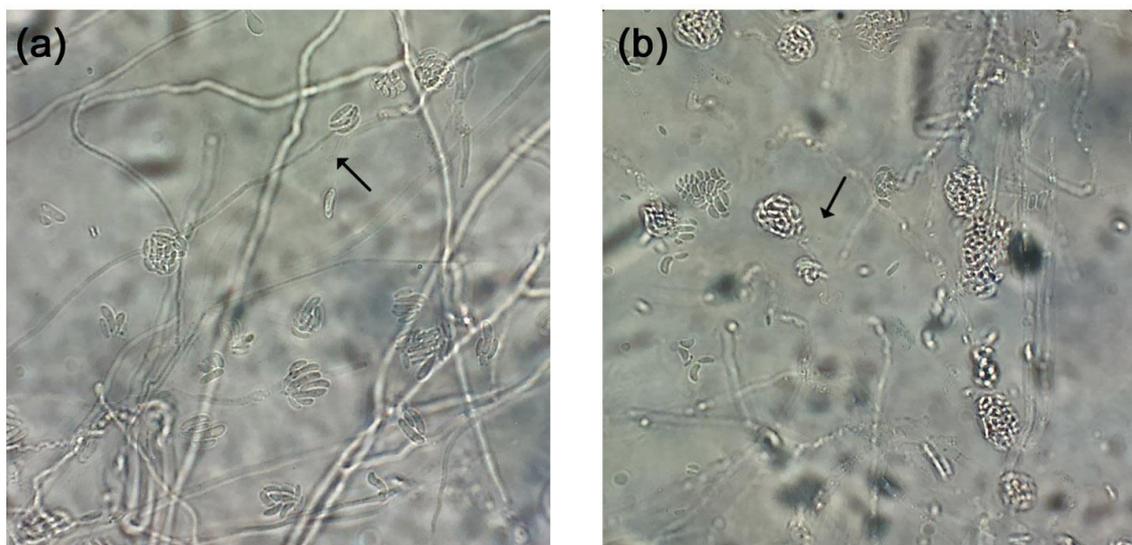


Figura 5. (a) Micromorfologia 1 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FSSC - montagem com lactofenol - conidióforo alongado e macroconídios dispostos em falsas cabeças, indicados pela seta.; **(b)** Micromorfologia 2 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FOSC - conidióforo curto e macroconídios dispostos em falsas cabeças, indicados pela seta.

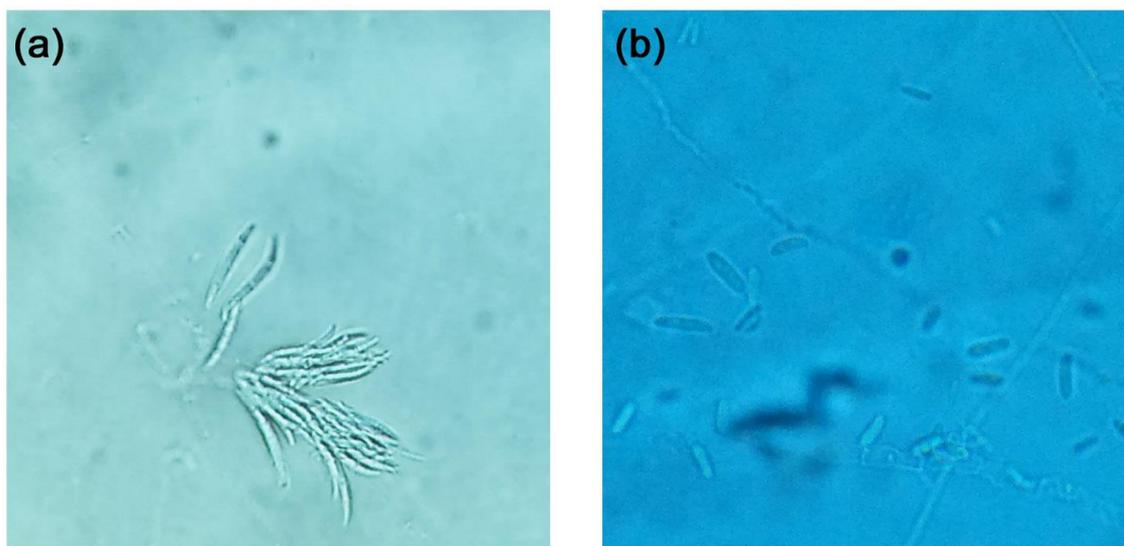


Figura 6. (a) Micromorfologia 3 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FIESC - montagem com lactofenol de algodão - numerosos macroconídios em "forma de agulha" com 3-5 septos; **(b)** Micromorfologia 4 em meio de cultivo CLA: sugestivo de FFSC - numerosos microconídios ovais e fusiformes.

5.3.2 Avaliação em meio de cultivo SNA

5.3.2.1 Micromorfologia

Todos os isolados foram avaliados quanto à produção de clamidósporos após 15 e 60 dias de incubação em SNA. Foi possível observar a presença de esporulação em agar SNA após 15 dias de incubação para a maioria dos isolados; aqueles que não apresentaram clamidósporos dentro deste período, foram incubados novamente por mais 45 dias para confirmar a ausência desta estrutura de sua micromorfologia. Após o período total de 60 dias de incubação não houve diferença na produção de clamidósporos, ou seja, os isolados que não apresentaram a estrutura após 15 dias de incubação permaneceram sem apresentá-la após 60 dias de incubação. Foram observados dois padrões micromorfológicos para os isolados testados:

Micromorfologia 1 – Clamidósporos presentes, isolados e aos pares, terminais e intercalares, de parede lisa. Morfologia encontrada em 35 isolados clínicos, 6 isolados ambientais e 2 cepas de referência ATCC 01 (*F. solani*) e ATCC 02 (*F. oxysporum*) (**Figura 7**);

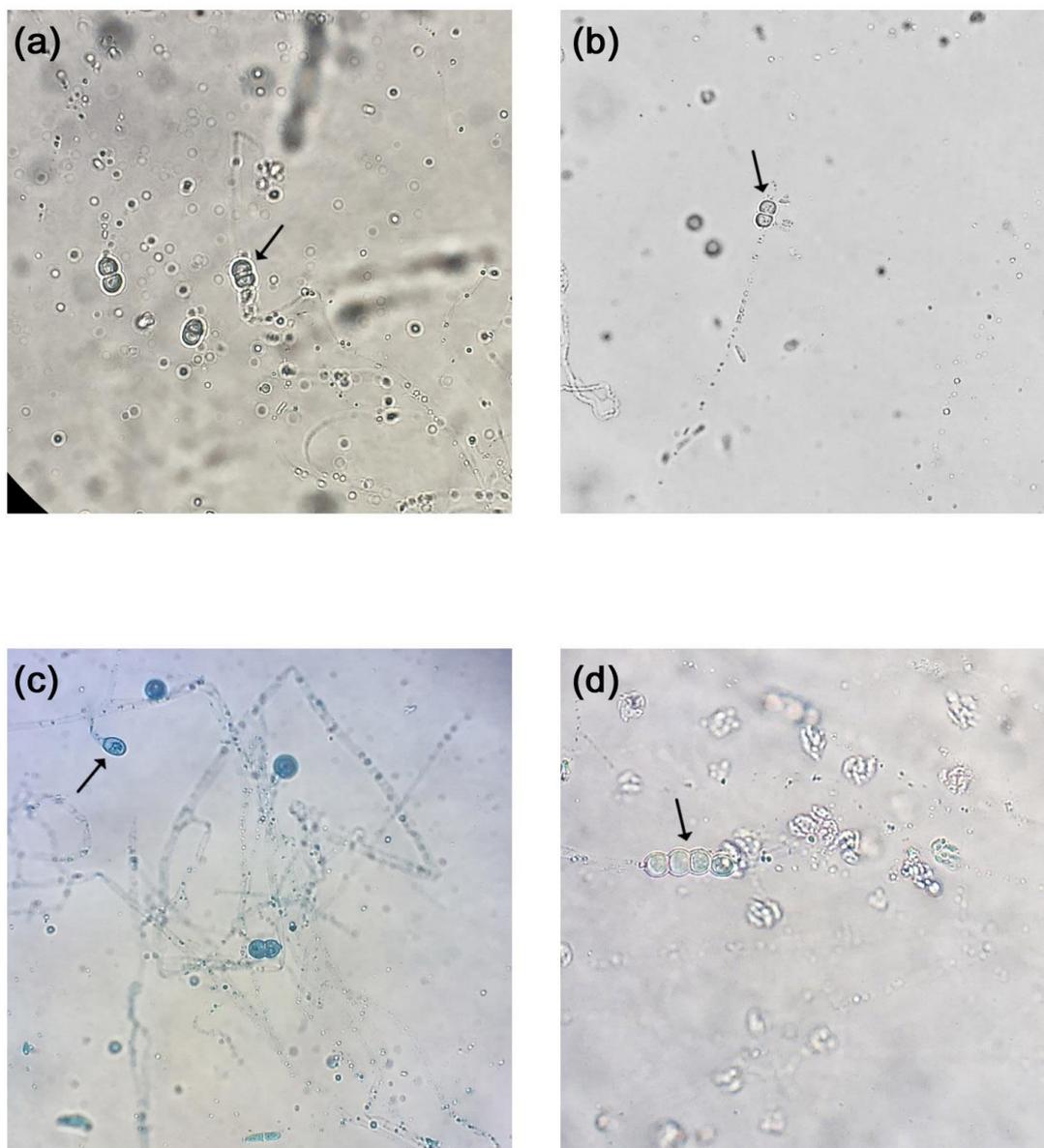


Figura 7. Micromorfologia 1 em meio de cultivo SNA: montagem com lactofenol de algodão - produção de clamidósporos, indicados pelas setas, **(a)** aos pares e intercalares; **(b)** aos pares e terminais; **(c)** isolados e terminais; **(d)** agrupados e intercalares.

Micromorfologia 2 – Ausência de clamidósporos. Encontrado na amostra ambiental A02 e cepa de referência ATCC 03 (*F. fujikuroi*);

5.3.3 Avaliação em meio de cultivo PDA

5.3.3.1 Macromorfologia

A fim de avaliar as características morfológicas secundárias dos complexos de espécies, todos os 42 isolados fúngicos e as 3 cepas de referência, ATCC 01, ATCC 02 e ATCC 03, foram reisolados em meio de cultivo PDA (Difco) para avaliação macromorfológica das colônias. Após sete dias de incubação a 30°C todos os isolados apresentaram esporulação em meio PDA com formação de micélio abundante. Assim foi possível observar as características secundárias para a identificação dos isolados: textura do micélio, coloração de anverso e reverso e taxa de crescimento. Não houve formação de pigmento difundível no meio para os isolados. Foram observados seis padrões macromorfológicos:

Macromorfologia 1 - ATCC 02 (*F. oxysporum*), 31 isolados clínicos e 1 isolado ambiental (A01) apresentaram textura penugenta, coloração do anverso branca e reverso rosado, com diâmetro médio da colônia de 71,5 mm. Sugestivos de FOOSC. **(Figura 8)**;

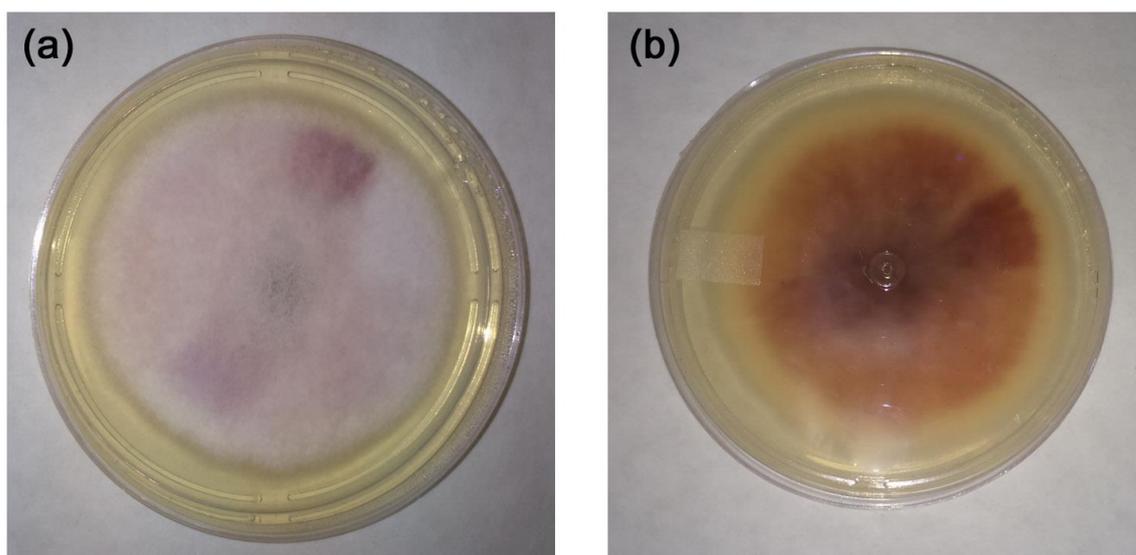


Figura 8. Macromorfologia 1 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FOOSC - colônia de 31 isolados clínicos, 1 isolado ambiental e ATCC01 após sete dias de incubação em PDA. **(a)** anverso com coloração branca; **(b)** e reverso com coloração rosada.

Macromorfologia 2 - ATCC 01 (*F. solani*), dois isolados clínicos (F01, F51), três isolados ambientais (A03, A04, A06) apresentaram textura penugenta, coloração do anverso branco e reverso creme, com diâmetro médio da colônia de 53,8 mm. Sugestivos de FSSC (**Figura 9**).

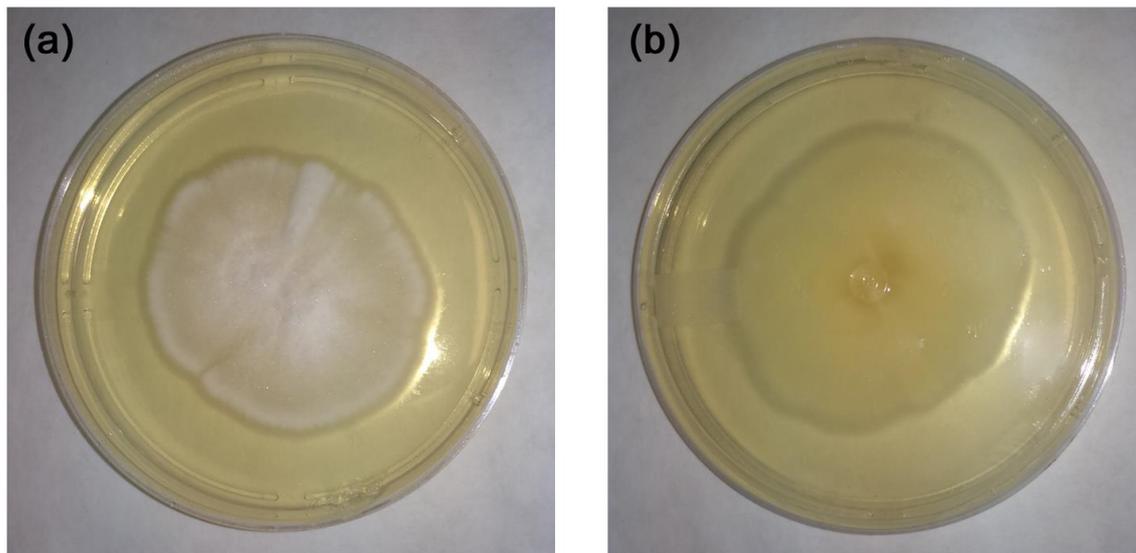


Figura 9. Macromorfologia 2 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FSSC - Macromorfologia da colônia de dois isolados clínicos e 3 isolados ambientais após sete dias de incubação em PDA. **(a)** anverso com coloração branca; **(b)** reverso com coloração creme.

Macromorfologia 3 - Um isolado clínico (F19) e dois isolados ambientais (A05, A08) apresentaram textura penugenta, coloração do anverso branco e reverso acastanhado, com diâmetro médio da colônia de 45,8 mm. Sugestivo de FSSC (**Figura 10**).

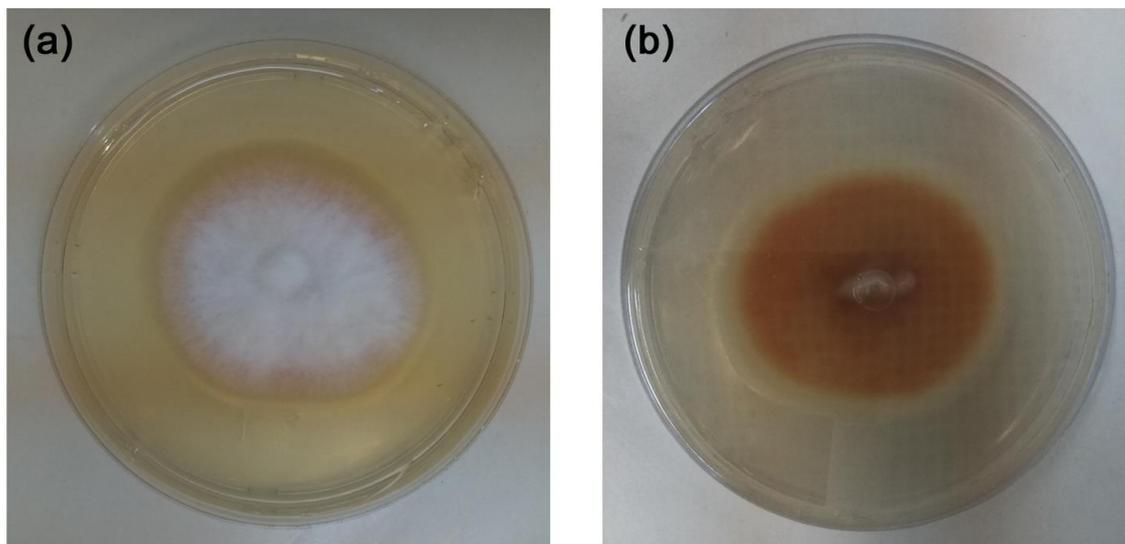


Figura 10. Macromorfologia 3 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FSSC - Macromorfologia da colônia de 1 isolado clínico e 2 isolados ambientais após sete dias de incubação em PDA. **(a)** anverso com coloração branca; **(b)** reverso com coloração acastanhada.

Macromorfologia 4 - Um isolado (F24) apresentou textura penugenta, coloração do anverso branco e reverso amarelado, com diâmetro da colônia de 58 mm. Sugestivo de FSSC (**Figura 11**).

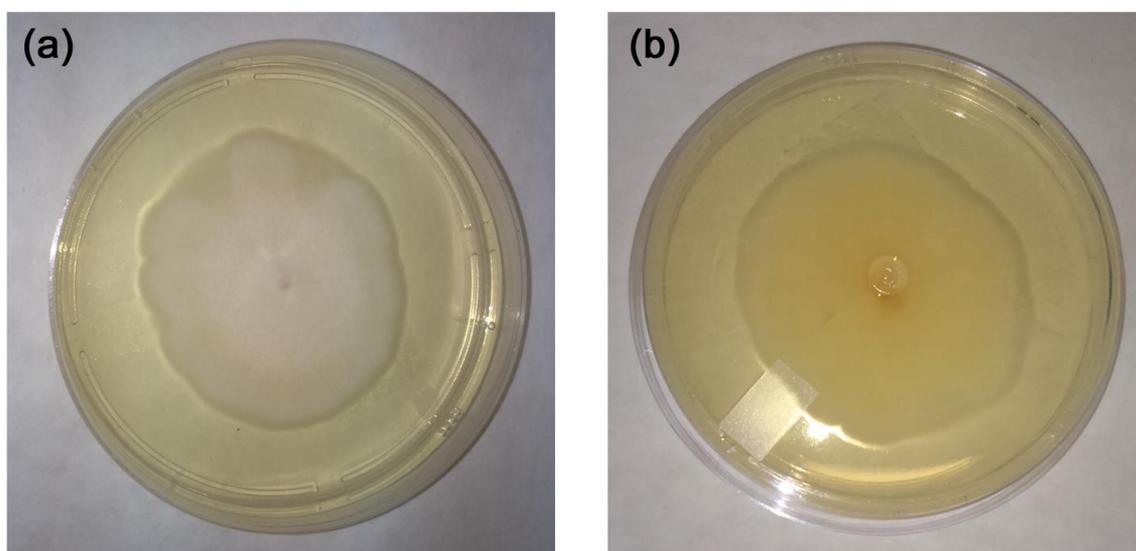


Figura 11. Macromorfologia 4 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FSSC - Macromorfologia da colônia de um isolado clínico após sete dias de incubação em PDA. **(a)** anverso com coloração branca; **(b)** reverso com coloração amarelada.

Macromorfologia 5 - Um isolado ambiental (A02) apresentou textura penugenta, coloração do anverso branco e reverso salmão, com diâmetro da colônia de 68 mm. Sugestivo de FIESC (**Figura 12**);

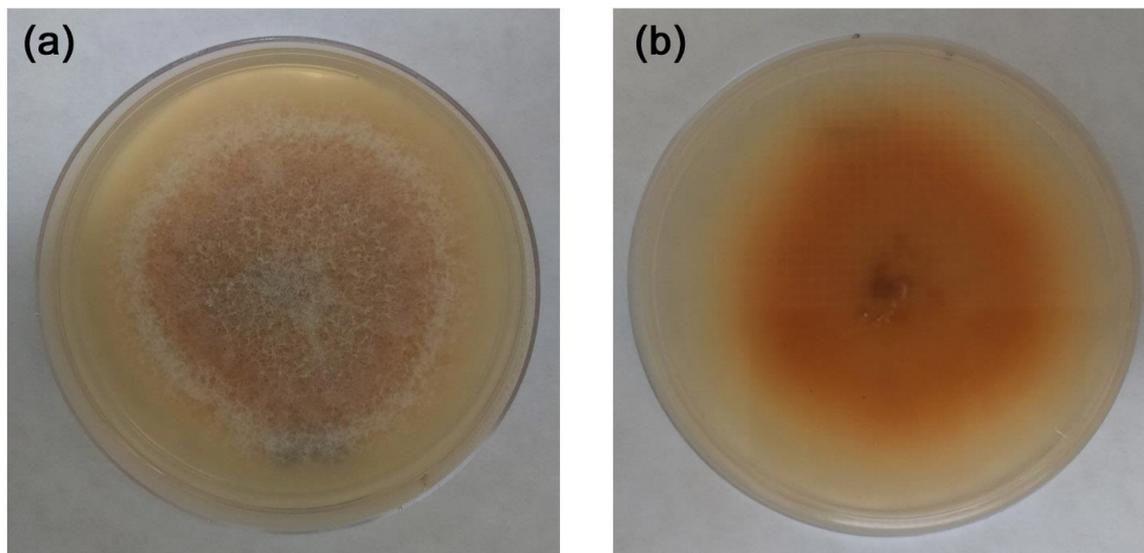


Figura 12. Macromorfologia 5 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FIESC - Macromorfologia da colônia de um isolado clínico após sete dias de incubação em PDA. **(a)** anverso com coloração branca; **(b)** reverso com coloração salmão.

Macromorfologia 6 - ATCC 03 (*F. fujikuroi*) apresentou textura penugenta, coloração do anverso branco e reverso lilás, com diâmetro médio da colônia de 67 mm. FFSC (**Figura 13**);

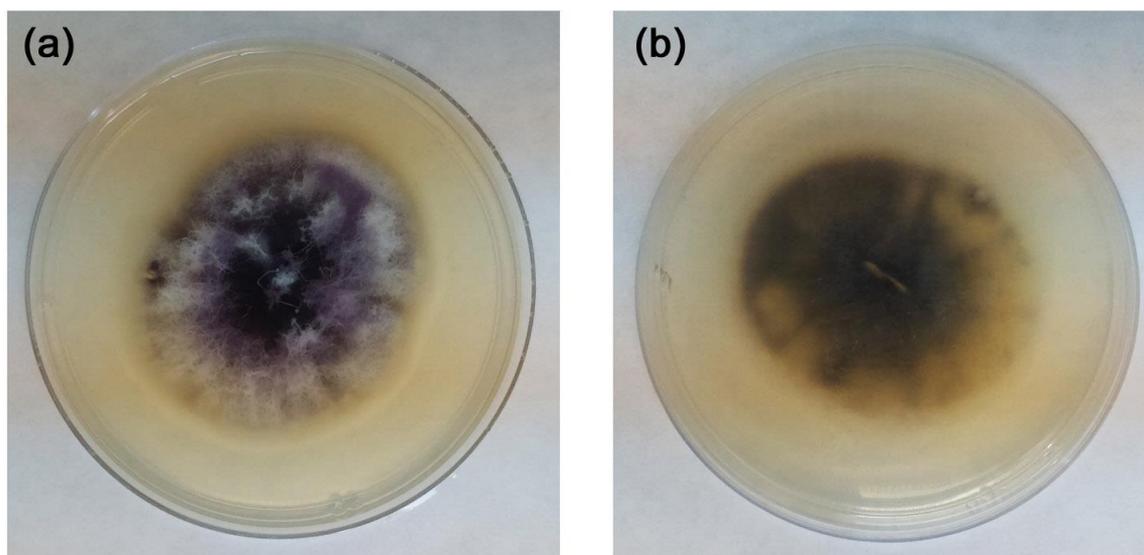


Figura 13. Macromorfologia 6 em meio de cultivo PDA: sugestivo de FFSC - Macromorfologia da colônia de um isolado clínico após sete dias de incubação em PDA. **(a)** anverso com coloração branca; **(b)** reverso com coloração lilás.

5.3.4 Classificação fenotípica dos complexos de espécies

Após análise do dendrograma foi possível identificar quatro padrões morfológicos de complexos de espécies distintos (**Figura 14**):

Padrão 1 – isolado A02;

Padrão 2 – ATCC 03 – *F. fujikuroi*;

Padrão 3 – 3a - isolado F24;

3b - ATCC 01 – *F. solani*, e isolados F01, F19, F51;

3c - isolados A03, A04, A05, A06, A08;

Padrão 4 – ATCC 02 – *F. oxysporum*, isolados A01 e as demais amostras clínicas.

Após análise do dendrograma, percebemos que o padrão 1 não apresenta similaridade com as cepas de referência utilizadas no estudo, sendo considerado um complexo de espécie não identificado apenas com as análises fenotípicas. O padrão 2 refere-se a cepa de referência ATCC 03 – *Fusarium fujikuroi*. Podemos identificar que o padrão 3 contém três subpadrões 3a, 3b e 3c, e que estes, se encontram dentro da mesma chave fenotípica, onde está a cepa de referência ATCC 01 – *Fusarium solani*. Apesar de apresentarem diferenças entre si, que estão relacionadas à macroscopia expressa em meio de cultivo PDA, podemos sugerir que os isolados descritos nestes padrões são FSSC. Conforme demonstrado no estudo, este é um complexo de espécies com grande variabilidade macroscópica sendo difícil a sua identificação apenas por análise morfológica. Na chave descrita como padrão 4 encontram-se a cepa de referência ATCC 02 – *F. oxysporum*, 31 isolados clínicos e um isolado ambiental. Logo podemos afirmar que não houve diferença fenotípica entre elas e que os isolados descritos neste padrão são FOSSC. Este foi o único complexo de espécies facilmente identificado durante as análises fenotípicas.

Além disso, ao analisar os padrões 3 e 4, podemos perceber que FSSC e FOSSC são semelhantes entre si. Durante as análises fenotípicas em meio de cultivo CLA percebemos que estes são complexos de espécies muito parecidos microscopicamente.

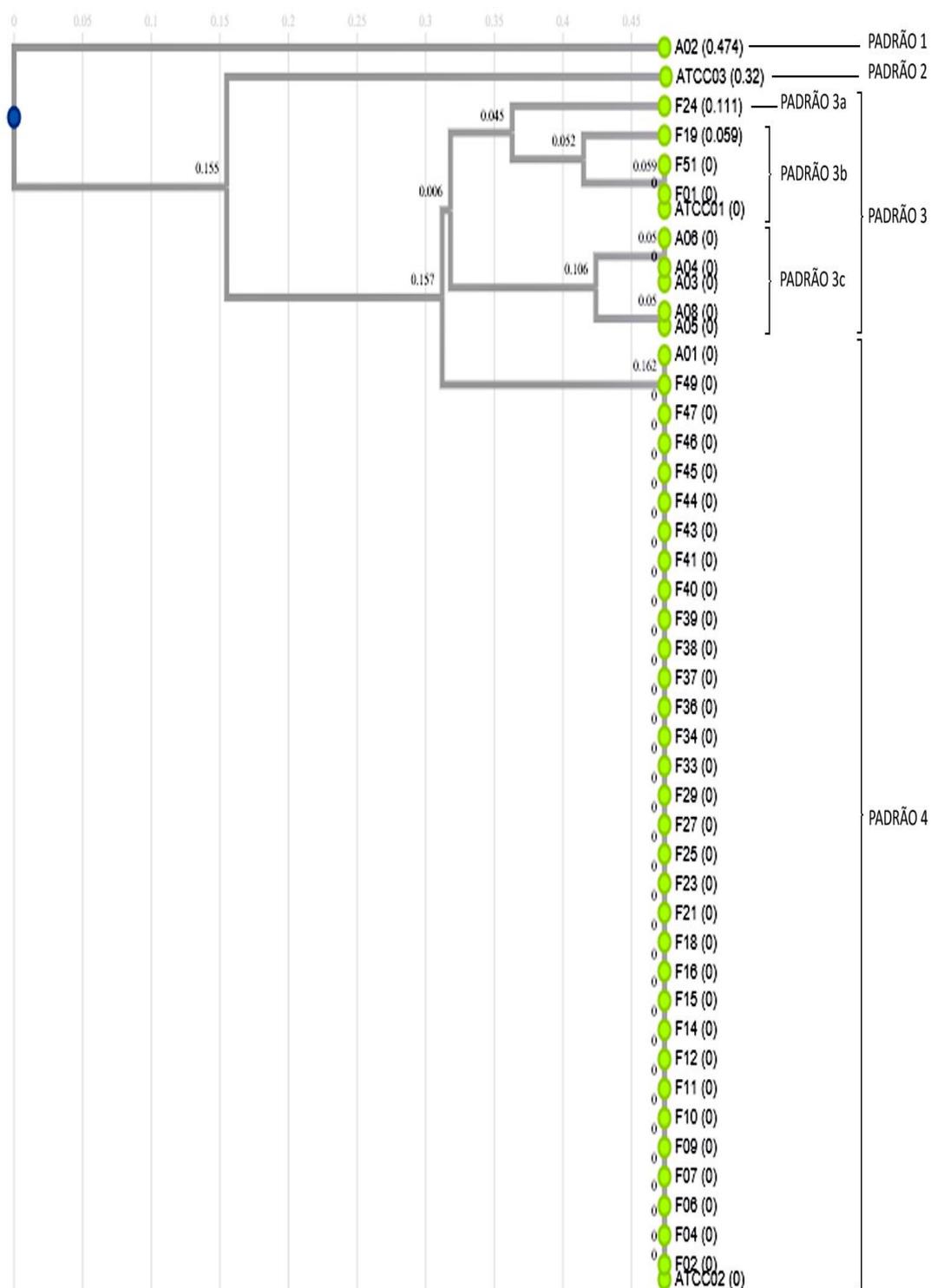


Figura 14. Dendrograma representando 45 isolados de *Fusarium* spp. após análise de 34 variáveis morfológicas. Foi usado o coeficiente de Jaccard para comparação entre o conjunto de variáveis e geradas 100 réplicas de *bootstrap*, DendroUPGMA (2002). As cepas de referência ATCC 01 *Fusarium solani* (ATCC36031), ATCC 02 *Fusarium oxysporum* (ATCC48112) e ATCC 03 *Fusarium fujikuroi* (ATCC38159) foram utilizadas para comparação.

5.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

Todos os 42 isolados e 3 cepas de referência, totalizando 45 amostras, foram caracterizados molecularmente para os dois genes. Após análise os dois genes apresentaram resultados equivalentes nas identificações. Foi realizada a análise combinada entre os dois genes e os resultados mantiveram-se equivalentes. As três cepas de referência foram confirmadas: ATCC 01 - *F. solani* como complexo de espécies *Fusarium solani*, ATCC 02 *F. oxysporum* como complexo de espécies *Fusarium oxysporum* e ATCC 03 *F. fujikuroi* como complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Do total de 35 isolados clínicos, 31 isolados foram identificados como FOSSC (88,6%) e quatro isolados identificados como FSSC (11,4%). Do total de sete isolados ambientais, cinco foram caracterizados como FSSC (71,4%), um isolado identificado como FOSSC (14,3%), e um isolado identificado como FIESC – complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti* (14,3%) (**Figuras 15, 16 e 17**). As frequências das espécies que caracterizam a população estudada estão descritas na **tabela 3**.

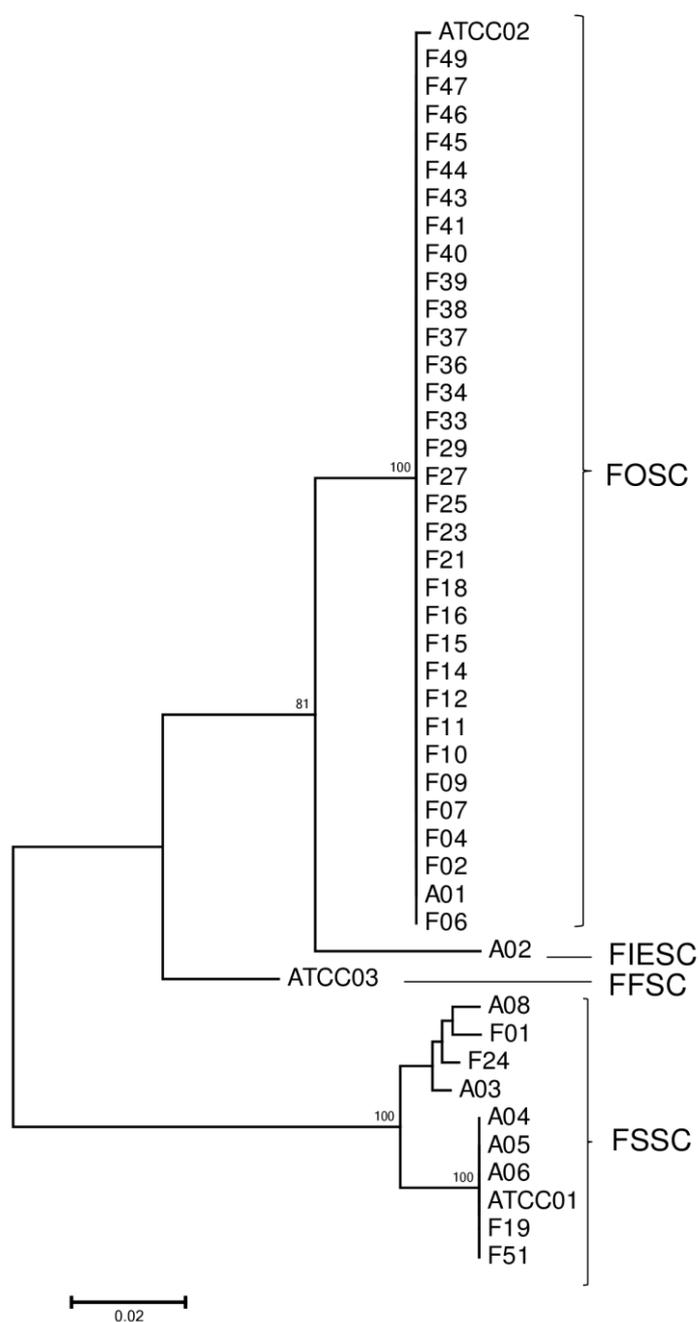


Figura 15. Árvore filogenética *Neighbor Joining* a partir da sequência da região ITS para os 45 isolados (35 isolados clínicos, 7 isolados ambientais, e 3 cepas de referência) analisados neste estudo. Os números sobre os ramos são valores de suporte de *bootstrap* obtidos a partir de 500 pseudo-repetições. As cepas de referência ATCC 01 *Fusarium solani* (ATCC36031), ATCC 02 *Fusarium oxysporum* (ATCC48112) e ATCC 03 *Fusarium fujikuroi* (ATCC38159) foram utilizadas para comparação. FOSC, complexo de espécies *Fusarium oxysporum*; FIESC, complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti*; FFSC, complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*; FSSC, complexo de espécies *Fusarium solani*.

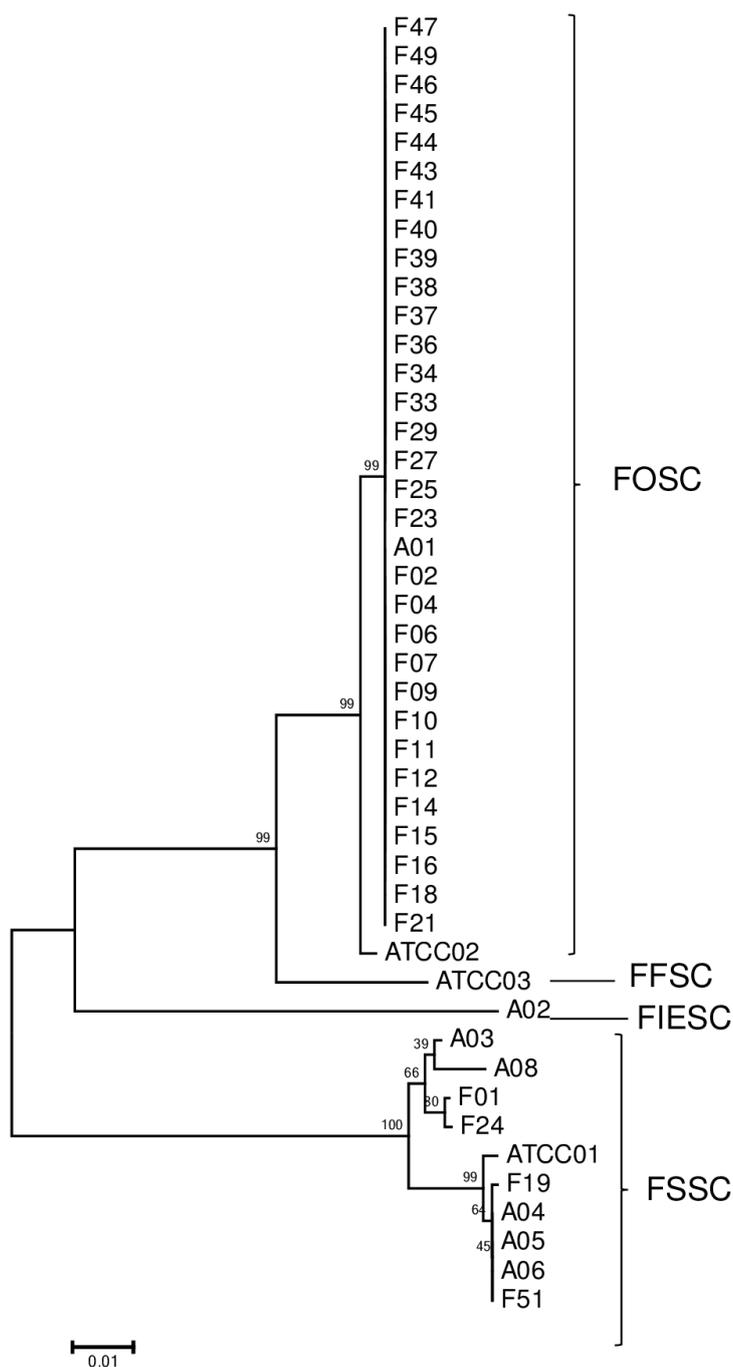


Figura 16. Árvore filogenética *Neighbor Joining* a partir da sequência do gene *ef-1 α* para os 45 isolados (35 isolados clínicos, 7 isolados ambientais, e 3 cepas de referência) analisados neste estudo. Os números sobre os ramos são valores de suporte de *bootstrap* obtidos a partir de 500 pseudo-repetições. As cepas de referência ATCC 01 *Fusarium solani* (ATCC36031), ATCC 02 *Fusarium oxysporum* (ATCC48112) e ATCC 03 *Fusarium fujikuroi* (ATCC38159) foram utilizadas para comparação. FOSC, complexo de espécies *Fusarium oxysporum*; FIESC, complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti*; FFSC, complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*; FSSC, complexo de espécies *Fusarium solani*.

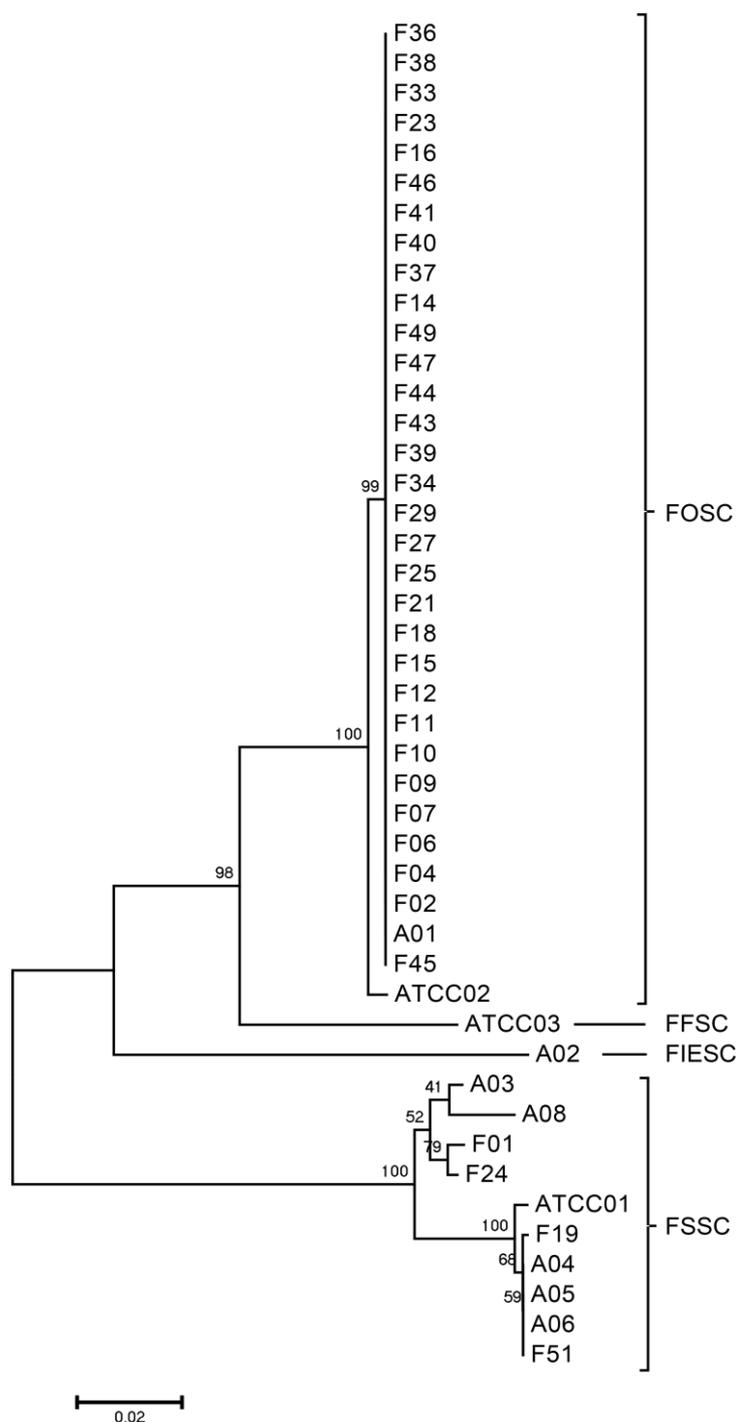


Figura 17. Árvore filogenética *Neighbor Joining* combinada a partir da sequência da região ITS e gene *ef-1 α* para os 45 isolados (35 isolados clínicos, 7 isolados ambientais, e 3 cepas de referência) analisados neste estudo. Os números sobre os ramos são valores de suporte de *bootstrap* obtidos a partir de 500 pseudo-repetições. As cepas de referência ATCC 01 *Fusarium solani* (ATCC36031), ATCC 02 *Fusarium oxysporum* (ATCC48112) e ATCC 03 *Fusarium fujikuroi* (ATCC38159) foram utilizadas para comparação. FOSC, complexo de espécies *Fusarium oxysporum*; FIESC, complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti*; FFSC, complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*; FSSC, complexo de espécies *Fusarium solani*.

Tabela 3. Frequências absolutas e relativas das espécies de *Fusarium* spp. por tipo de isolado encontradas no Inca entre janeiro e setembro de 2014

COMPLEXO	ISOLADOS CLÍNICOS n = 35 (%)	ISOLADOS AMBIENTAIS n = 7 (%)	TOTAL n = 42 (%)
FOSC	31 (88,6)	1 (14,3)	32 (76,2)
FSSC	4 (11,4)	5 (71,4)	9 (21,4)
FIESC	-	1 (14,3)	1 (2,4)

5.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os valores de CIM₅₀, CIM₉₀, MG e variação, correspondentes ao perfil de susceptibilidade antifúngica dos 42 isolados de *Fusarium* spp. estão apresentados nas **tabelas 4 e 5**.

Para os isolados clínicos, as menores CIM foram detectadas para a anfotericina B, com MG de 3,1 µg/ml para FOSC e 4 µg/ml para FSSC, sugerindo resistência. Não foi observada diferença significativa entre as médias geométricas encontradas para anfotericina B para as duas espécies identificadas. Posaconazol não demonstrou inibição do crescimento para as duas espécies, enquanto voriconazol demonstrou valores mais elevados de CIMs para FOSC, com MG 10,7 µg/ml, quando comparado a FSSC, MG de 8 µg/ml (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores de concentrações inibitórias mínimas e média geométrica do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de 35 isolados clínicos de *Fusarium* spp. no Inca entre janeiro e setembro de 2014 de acordo com o documento CLSI M38-A2, 2008

ANTIFÚNGICO	ESPÉCIE	CIM (µg/ml)			
		VARIAÇÃO	CIM 50	CIM 90	MG
ANFOTERICINA B	FOSC	2 – 8	4	4	3,1
	FSSC	2 – 8	4	8	4
POSACONAZOL	FOSC	16	≥16	≥16	≥16
	FSSC	16	≥16	≥16	≥16
VORICONAZOL	FOSC	4 – 16	≥16	≥16	10,7
	FSSC	4 – 16	8	10	8

CIM 50, CIM 90: concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados fúngicos, respectivamente; MG: média geométrica dos valores das concentrações inibitórias mínimas (µg/ml); FOSC: complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (n=31 isolados); FSSC; complexo de espécies *Fusarium solani* (n=4 isolados)

Entre os isolados ambientais não foi calculada a MG devido haver apenas um isolado identificado como FOSC e FIESC. Para FOSC, as CIMs encontradas para anfotericina B, voriconazol e posaconazol, foram 2 µg/ml, 16 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados para a mesma espécie identificada entre os espécimes clínicos. Para FIESC, as CIMs encontradas para anfotericina B, voriconazol e posaconazol, foram 1 µg/ml, 16 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente, o que sugere que essa espécie é sensível à anfotericina B. Enquanto que para FSSC, as CIMs encontradas para anfotericina B, variaram entre 2 - 4 µg/ml, e para voriconazol e posaconazol os resultados foram iguais, 16 µg/ml (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de concentrações inibitórias mínimas do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de 7 isolados ambientais de *Fusarium* spp. isolados no Inca entre janeiro e setembro de 2014 de acordo com o documento CLSI M38-A2, 2008.

ISOLADO	ESPÉCIE	CIM (µg/ml)		
		ANFOTERICINA B	POSACONAZOL	VORICONAZOL
A01	FOSC	2	16	16
A02	FIESC	1	16	16
A03	FSSC	2	16	16
A04	FSSC	4	16	16
A05	FSSC	4	16	16
A06	FSSC	4	16	16
A08	FSSC	4	16	16

CIM: concentração inibitória mínima; FSSC: complexo de espécies *Fusarium solani*, 5 isolados; FIESC: complexo de espécies *Fusarium incarnatum equiseti*, 1 isolado; FOSC: complexo de espécies *Fusarium oxysporum*, 1 isolado.

O teste de *Mann-Whitney* mostrou que a sensibilidade do grupo FOSC é similar à sensibilidade do grupo Não-FOSC para os três antifúngicos testados: anfotericina B (p-valor = 0,5912), voriconazol (p-valor = 0,3911) e posaconazol (p-valor = 1).

O mesmo teste mostrou que entre os grupos amostras clínicas e ambientais, para anfotericina B não houve diferença na sensibilidade (p-valor = 0,4759). Não foi possível realizar o teste para voriconazol e posaconazol devido os resultados não terem variado para posaconazol nas amostras clínicas, e para as duas drogas nas amostras ambientais.

O teste de *Wilcoxon* mostrou que anfotericina B apresentou melhor atividade *in vitro* em relação ao voriconazol (p-valor < 0,0001). Comparando anfotericina B e posaconazol, foi encontrado resultado semelhante, ou seja, anfotericina B apresentou melhor atividade *in vitro* em relação ao posaconazol (p-valor < 0,0001). Não foi possível realizar o teste para avaliar associação entre as drogas voriconazol e posaconazol devido os resultados deste último não terem variado para todas as amostras.

6 DISCUSSÃO

As espécies mais frequentes, identificadas em amostras clínicas, no Inca, no período de janeiro a setembro de 2014, foram FOOSC e FSSC. Para as amostras ambientais, a frequência encontrada foi FSSC, FOOSC e FIESC, respectivamente. O presente estudo confirma a existência de diferenças regionais na epidemiologia das espécies de *Fusarium*, pois difere da distribuição das espécies reportadas na literatura. Há relatos que FSSC é mais prevalente na América Latina e Ásia, enquanto FOOSC é mais prevalente na Europa (MIGHELI *et al.*, 2010; VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015a). Em estudo multicêntrico recente, relatado como a maior série de casos de fusariose até o momento, com a contribuição de 11 países, incluindo 124 casos do Brasil, Nucci e colaboradores (2014a) identificaram como agentes mais frequentes, a partir de 49 isolados clínicos provenientes de 233 casos de fusariose, FSSC (29 casos), seguido de FOOSC (7 casos) e FIESC (3 casos). Em estudo realizado na Itália, relatou-se que infecção invasiva é mais frequente por *Fusarium verticillioides* (TORTORANO *et al.*, 2008). Em série de casos retrospectiva realizada no Qatar a partir da análise de isolados no período de 10 anos, provou-se que a espécie predominante causadora de fusariose foi FSSC e que a prevalência para FOOSC foi relativamente baixa (SALAH *et al.*, 2015).

Esta diferença epidemiológica sobre a espécie mais prevalente em isolados clínicos encontrada em nosso estudo, com predominância de FOOSC, pode estar relacionada à ocorrência de surto devido à fonte de contaminação ambiental no período estudado por esta espécie. Em 2013 Scheel e colaboradores, após análise de isolados de *Fusarium* a partir de amostras clínicas e ambientais em um hospital no Rio de Janeiro, Brasil, relataram que FOOSC foi a espécie mais frequente identificada em fontes ambientais de água coletadas no hospital, seguida de FIESC, a partir de amostras coletadas de ar, e FSSC. Nas amostras clínicas hematológicas e dermatológicas, a espécie mais frequente foi FSSC. Assim, pode-se sugerir que a frequência de espécies em isolados clínicos encontrada neste estudo foi influenciada por surto identificado no período das análises. Durante o estudo foi identificado surto por FOOSC, onde 14 pacientes adquiriram fusariose, provavelmente devido a

inoculação do agente em cateter contaminado. A fonte de contaminação ambiental foi identificada na sala de manutenção do cateter. E ainda, foi identificado FSSC em 3 pacientes (pacientes 1, 11, 19), não procedentes do surto, com fusariose. As espécies encontradas nos pacientes que não apresentaram fusariose, pacientes 9 e 15, foram FSSC e FOSSC, respectivamente. A amostra F51, identificada como FSSC, correspondente ao paciente 19, teve 100% de similaridade quando comparada com as amostras ambientais A04, A05 e A06, também identificadas como FSSC, correspondentes a parede da pia da sala da emergência pediátrica, piso do chuveiro e chuveiro do quarto do paciente 19, respectivamente. Este era o local de internação deste paciente. É provável que, neste caso, a via de contaminação do paciente tenha sido através da aerossolização de partículas de água contaminadas, por inalação de conídios de FSSC durante o banho. *Fusarium* spp. tem sido identificado em reservatórios de água de hospitais, onde os chuveiros e torneiras podem contribuir através da dispersão de aerossóis facilitando a inalação de conídios (ANAISSE *et al.*, 2001).

Houveram limitações relacionadas à investigação ambiental, incluindo a análise direta da água proveniente da central de abastecimento e amostras de ar de diferentes localidades do instituto, que não permitiram identificar outras possíveis fontes de contaminação para melhor determinação da frequência das espécies ambientais no período. Portanto, resultados epidemiológicos divergentes podem ser encontrados no Inca por análise retrospectiva realizada a partir de maior número de isolados clínicos e ambientais de *Fusarium*.

Foram identificados 17 casos de pacientes com fusariose no período estudado. Todos os pacientes apresentaram pelo menos uma amostra de hemocultura positiva. Infecção invasiva por *Fusarium* é estabelecida a partir do isolamento do agente em no mínimo uma amostra de hemocultura positiva no paciente ou por cultura positiva a partir do isolamento do agente em dois ou mais espécimes clínicos diferentes (SALAH *et al.*, 2015). Nucci e colaboradores (2014a) afirmaram que a fungemia é a apresentação clínica mais comum da fusariose, que pode estar relacionada à melhora nos sistemas automatizados de hemocultura. Segundo este autor, os principais fatores de risco para o hospedeiro são

recebimento de terapia com corticosteroides e neutropenia profunda e persistente. Quanto ao uso de corticosteroides, foi possível identificar que 65% dos pacientes utilizaram esta terapia. Contrariamente aos dados da literatura, no presente estudo a neutropenia profunda foi presente em apenas 52,9% dos pacientes com fusariose. Apenas 24% dos pacientes tiveram desfecho fatal pela fusariose. Destes apenas um paciente tinha neutropenia associada ao uso de corticoides como fator de risco. Isto pode estar relacionado à presença de surto no período das análises clínico epidemiológicas, que ocorreu pela inoculação do patógeno a partir de cateter venoso contaminado com o microrganismo, visto que todos os pacientes utilizaram este dispositivo. Colombo e colaboradores (2013) relataram um caso de colonização de cateter venoso central em um paciente com leucemia linfoblástica aguda, a partir do qual foi isolado FSSC. Após análise de porções do dispositivo por microscopia eletrônica foi visualizado micélio fúngico evidente no lúmen, comprovando que estes dispositivos estão propensos à contaminação por fungos oportunistas.

Assim, os fatores de risco para a fusariose no Inca em 2014 incluem presença de cateter venoso (100%), quimioterapia (82,2%), doença de base hematológica (70,6%), uso de corticoides (65%) e pacientes pediátricos (58,8%). Estes resultados são compatíveis com a literatura consultada que afirma que *Fusarium spp.* pode causar doença disseminada em pacientes gravemente imunocomprometidos, pediátricos, com doença de base hematológica, que receberam transplante de medula óssea ou órgão sólido e receberam quimioterapia e corticoides (SCHWARTZ *et al.*, 2013, LIU *et al.*, 2014, GARNICA *et al.*, 2014). A recuperação neutropênica é determinante na recuperação dos pacientes com fusariose (GUARRO *et al.*, 2013; OCAMPO-GARZA *et al.*, 2015).

Apesar de encontrarmos apenas um isolado (FSSC) proveniente de raspado de pele no período estudado, avaliação dermatológica com coleta de amostras de raspados de pele e unhas deve ser realizada como prevenção de porta de entrada do microrganismo em pacientes imunocomprometidos. A pele é afetada em mais de 70% dos pacientes com fusariose, que apresentam múltiplas lesões eritematosas, violáceas, com pápulas ou nódulos, podendo apresentar centro necrótico, e serem encontradas em qualquer local do corpo. Ao exame histopatológico os achados

podem ser confundidos com o gênero *Aspergillus*. Então, o diagnóstico requer o isolamento do agente a partir de amostras de tecidos obtidos por biópsia (LIU *et al.*, 2013). Espécies do complexo FSSC são encontradas frequentemente em isolados dermatológicos de pacientes neutropênicos (SALAH *et al.*, 2015). Há relatos de casos em que onicomicose é a fonte de uma infecção disseminada secundária nesses pacientes (BOURGEOIS *et al.*, 2010). De acordo com os critérios de Gupta e colaboradores (2014), considera-se infecção provada quando se obtém isolados de *Fusarium* a partir de amostras dermatológicas após dois isolamentos consecutivos do agente no mesmo paciente, exame direto demonstrando estruturas fúngicas compatíveis com o agente isolado e ainda ausência de dermatófitos na cultura do espécime clínico. Portanto, avaliação cuidadosa para onicomicose e remoção do foco primário é obrigatória em pacientes sabidamente imunocomprometidos e ainda naqueles pacientes que podem tornar-se potencialmente imunocomprometidos. Todo paciente deve ser avaliado dermatologicamente antes de iniciar tratamento em unidades de atendimento oncológico como medida preventiva para fusariose disseminada.

A investigação epidemiológica ambiental demonstrou que medidas de prevenção de infecção hospitalar devem ser adotadas nos centros de atendimento oncológico a fim de proteger o paciente susceptível contra a exposição a agentes patogênicos. Além da inoculação traumática, a fusariose é adquirida pela inalação de conídios transportados por via aérea (RAAD *et al.*, 2002). Após a detecção dos isolados ambientais de *Fusarium* spp. no Inca no período do surto foram adotadas medidas de intervenção, limpeza e reforma, nas áreas correspondentes onde os pacientes estavam internados. Medidas eficazes de controle de infecção são necessárias, antes, durante e após as atividades de demolição e construção em serviços de saúde (GEORGIADOU *et al.*, 2014). Os possíveis reservatórios de *Fusarium* que devem ser monitorados no ambiente hospitalar incluem água da torneira, sumidouros, caixas d'água e outras áreas úmidas, tais como chuveiros, pias e pisos, e ainda o ar do ambiente (ANAISSE *et al.*, 2001 e 2002; SHORT *et al.*, 2011). Portanto, além do monitoramento do ar, a limpeza desses ambientes deve ser realizada com rigor. Foi observado crescente número de casos da doença

relacionado a surto no Inca no ano de 2014, indicando que medidas preventivas eficazes de controle de infecção hospitalar, incluindo treinamento e reciclagem de funcionários envolvidos na assistência e limpeza, devem ser adotadas nos centros de atendimento oncológico, principalmente antes de reformas nas unidades hospitalares. Deve ser realizado periodicamente monitoramento dos possíveis reservatórios do patógeno. Na suspeita de surto, para o controle da disseminação do microrganismo na unidade hospitalar deve-se proceder a investigação epidemiológica para que a fonte da infecção seja identificada. A correta determinação laboratorial do agente também é imprescindível.

Pouca diferença foi observada após as análises micromorfológicas entre os isolados de FSSC e FOSC. Morfologicamente as espécies de FSSC e FOSC são parecidas microscopicamente, mas diferem macroscopicamente. O parâmetro mais significativo para distinção entre estas espécies é o tamanho do conidióforo. FSSC apresenta conidióforo alongado, enquanto FOSC apresenta a estrutura encurtada. A produção de clamidósporos não foi significativa para classificação destas espécies. Quanto às análises macromorfológicas, a coloração produzida em meio de cultivo agar PDA é facilmente distinguida macroscopicamente. FSSC apresentou coloração de reverso creme, acastanhada ou amarelada; enquanto que FOSC apresentou reverso com coloração rosa. Esta é uma diferença significativa entre as espécies prevalentes no estudo (GUARRO *et al.*, 1992; GUARRO, 2013). Segundo Fischer e colaboradores os meios de cultivo ricos em carboidratos, como o agar PDA, produzem variações nas estruturas fúngicas. Sendo assim, podemos sugerir que os macroconídios, microconídios e a coloração do micélio fúngico foram as principais características observadas para a identificação das espécies de *Fusarium* spp. neste estudo. O macroconídio é a característica morfológica mais importante das espécies de *Fusarium*. É importante que os conídios sejam bem definidos quanto ao tamanho e forma para identificação morfológica (LESLIE *et al.*, 2006). O meio de cultivo CLA, com substrato natural, minimiza esse problema. O SNA é um meio de cultivo pobre em nutrientes, o que evita a degeneração das culturas, comum em meios sintéticos. É um meio de cultivo utilizado para rápida formação e avaliação de clamidósporos em relação ao CLA (LESLIE *et al.*, 2006). O agar PDA é um meio de cultivo rico em

carboidratos o que possibilita avaliação macroscópica das características secundárias para classificação morfológica. A taxa de crescimento (mm) a 30°C em agar PDA após 3 dias de incubação descrita por Burgess e colaboradores (1994) foi: *F. oxysporum* 25 - 40 mm, *F. solani* 26 - 36 mm, *F. incarnatum equiseti* 28 - 44 mm. FIESC pôde ser identificado em CLA pela micromorfologia de seus macroconídios em “forma de agulha” e ausência de microconídios com produção de mesoconídios, associado à coloração salmão produzida no agar PDA. FFSC foi identificado pela ausência de produção de macroconídios e numerosos microconídios com formas ovais e fusiformes, associada a coloração lilás característica produzida em PDA. Foi observado que todas as espécies identificadas no estudo esporularam no meio de cultivo agar CLA com produção uniforme de macroconídios e microconídios suficientes para caracterizá-las.

Após análise genotípica, podemos afirmar que houve boa correlação entre os resultados das identificações morfológica e molecular dos isolados em nível de complexo de espécies. Com a finalidade de obter uma identificação mais acurada dos isolados clínicos métodos moleculares devem ser usados para a identificação das espécies de *Fusarium*.

Após análise dos resultados, podemos afirmar que não houve diferença nos resultados apresentados entre a região ITS e o gene *ef-1 α* neste estudo. Ambos identificaram os isolados de *Fusarium* em complexos de espécies. As sequências analisadas obtiveram identificações que variaram entre 98 % e 100 % de similaridade quando comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados *GenBank*. Vários estudos têm demonstrado que a identificação baseada no sequenciamento da região ITS (ITS1, 5.8S rRNA, e ITS2) pode ser empregada para identificação de espécies em nível de complexo para *Fusarium*. Existe um consenso a respeito da utilização da região ITS para sequenciamento como o passo inicial na identificação filogenética (BALAJEE *et al.*, 2009). Em estudo retrospectivo realizado no Canadá, as espécies de *Fusarium* foram identificadas pela técnica de PCR através da região ITS e do gene *ef-1 α* . Foram identificados FOFC e FSSC, respectivamente (SCHWARTZ *et al.*, 2013). Porém há relatos a respeito que afirmam que o sequenciamento da região ITS apresenta baixa filogenia para

identificação de espécies de *Fusarium* devido à presença de alelos divergentes nesta região para espécies crípticas (GUARRO, 2013). Assim, não foi possível classificar as espécies dentro dos complexos identificados em razão da região ITS não permitir a distinção entre espécies semelhantes. Apesar de a região ITS ser conhecida como um “marcador molecular universal” por ser uma região conservada, que está presente no genoma da maioria dos fungos e poder ser amplificada de forma confiável, com grande número de sequências disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que permite uma comparação direta da sequência de um isolado desconhecido, existem algumas desvantagens no seu uso, que incluem a incapacidade de distinguir espécies estreitamente relacionadas e ainda problemas de confiabilidade das sequências depositadas nas bases de dados de referência (BALAJEE *et al.*, 2009). Um recente estudo de revisão sobre identificação laboratorial afirmou que o diagnóstico genotípico por amplificação e sequenciamento do gene *ef-1 α* apresenta melhor poder discriminatório para a identificação das espécies de *Fusarium* (VAN DIEPENINGEM *et al.*, 2015a, 2015b). Dentro dos complexos, as espécies podem ser distinguidas pela técnica de MLST – *Multilocus sequence typing*. (O’DONNELL *et al.*, 2010). MLST é o melhor método para identificação das espécies a partir da cultura de material biológico de um paciente (TORTORANO *et al.*, 2014a). Para a identificação molecular de *Fusarium* recomenda-se as regiões *ef-1 α* – fator de alongamento da tradução 1 α , RPB1 – a maior subunidade de RNA polimerase e RPB2 – a segunda maior subunidade de RNA polimerase. As sequências podem ser construídas baseadas nestas regiões que estão disponíveis nas bases de dados FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org/guide.php>) e CBS – KNAW (<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>) e podem ser utilizadas para identificação dos isolados clínicos (GUARRO, 2013; SCHEEL *et al.*, 2013). Muitos laboratórios de diagnóstico micológico dependem da identificação morfológica (fenotípica), mas as técnicas de biologia molecular demonstram melhor poder discriminatório para a identificação dos membros dos complexos de espécies envolvidas em infecções humanas (VAN DIEPENINGEM *et al.*, 2015a, 2015b).

Uma tecnologia promissora na identificação e classificação de patógenos emergentes oportunistas, incluindo *Fusarium*, é a espectrometria de massa, MALDI-TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*, com base no seu espectro de proteínas do microrganismo analisado. Diferentes empresas comerciais fornecem sistemas de MALDI-TOF MS: Sistemas como VITEK (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e Biotyper (BrukerDaltronicsInc, Billerica, MA) com *softwares* próprios para análise e banco de dados. Apesar dos bancos de dados estarem mais avançados para bactérias e leveduras, os estudos são promissores para os fungos filamentosos, especialmente para a identificação específica de *Fusarium*, com taxas de identificação em nível de espécie variando de 82 - 99% (MARINACH-PATRICE *et al.*, 2009; TRIEST *et al.*, 2015).

Os resultados expressos pela média geométrica do teste de susceptibilidade no período estudado sugerem que, entre os isolados clínicos, as espécies identificadas, FOSC e FSSC, não foram susceptíveis aos fármacos testados: anfotericina B, voriconazol e posaconazol. Para os isolados clínicos, as menores CIMs foram detectadas para a anfotericina B, com MG de 3,1 µg/ml para FOSC e 4 µg/ml para FSSC. Anfotericina B é o antifúngico que apresenta as menores CIMs (AZOR *et al.*, 2009a; TORTORANO *et al.*, 2008; ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2008, AZOR *et al.*, 2007). Posaconazol não demonstrou inibição do crescimento para as duas espécies identificadas com MG 16 µg/ml. Enquanto voriconazol demonstrou valores mais elevados de CIM para FOSC, com MG 10,7 µg/ml, quando comparado a FSSC, MG 8 µg/ml. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias geométricas encontradas para anfotericina B, voriconazol e posaconazol para as duas espécies identificadas nos isolados clínicos. Os resultados apresentados são contrários ao que foi relatado por Horn e colaboradores (2014), onde o autor afirmou que posaconazol e voriconazol foram as drogas mais frequentemente utilizadas associadas à melhor sobrevida em pacientes com fusariose. Entre os isolados ambientais não foi realizado a MG devido haver apenas um isolado para FOSC e FIESC. Para FOSC, as CIMs encontradas para anfotericina B, voriconazol e posaconazol, foram 2 µg/ml, 16 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados para a mesma espécie identificada entre os

espécimes clínicos. Para FIESC, as CIMs encontradas para anfotericina B, voriconazol e posaconazol, foram 1 µg/ml, 16 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente, o que sugere que essa espécie é sensível à anfotericina B.

Para FSSC, as CIMs encontradas para anfotericina B, voriconazol e posaconazol, foram 2 - 4 µg/ml, 16 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente. O atual estudo demonstra que apesar de serem drogas de escolha da terapia de infecções localizadas e disseminadas, algumas cepas de *Fusarium* apresentam elevada resistência intrínseca a estes fármacos. O resultado encontrado nos isolados clínicos é compatível com as análises publicadas na revisão de Guarro (2013), onde o autor demonstra que os pontos de corte não estão bem definidos para o agente e que no geral todas as drogas apresentam baixa atividade *in vitro* para o microrganismo. Foram analisados 28 isolados de FOSC que juntos apresentaram valores de CIM para anfotericina B, voriconazol e posaconazol de 2,32 µg/ml, 6,09 µg/ml e 28,98 µg/ml, respectivamente; e ainda 27 isolados de FSSC que apresentaram valores de CIM para anfotericina B, voriconazol e posaconazol de 2,39 µg/ml, 9,82 µg/ml e >16 µg/ml, respectivamente. Embora não tenham sido avaliados neste estudo, os antifúngicos da classe das equinocandinas, caspofungina e micafungina, também têm sido recomendados nos guias terapêuticos para tratamento de infecções por *Fusarium* (TORTORANO *et al.*, 2014b; VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015a). Portanto, a avaliação destes fármacos torna-se necessária em análises futuras. A terbinafina também não foi testada neste estudo, porém a avaliação da susceptibilidade deste fármaco é importante por ser utilizada no tratamento de onicomicoses. Esta é uma importante porta de entrada do microrganismo para infecções secundárias. Resultados para este fármaco demonstram que ele é o antifúngico mais efetivo para o gênero, com média geométrica de CIM 0,60 µg/ml para diferentes espécies. Uma exceção à regra é FIESC, com MG 10,08 µg/ml para terbinafina (AZOR *et al.*, 2009b). Foi publicado recentemente um caso incomum de paciente com fusariose secundária à lesão de pele, e posterior endoftalmite, por FSSC. O caso obteve sucesso terapêutico com a administração hospitalar de anfotericina B, seguida de voriconazol no tratamento ambulatorial, sem remissão durante acompanhamento por 8 meses (OCAMPO-GARZA *et al.*, 2015). Existe pouca informação sobre a eficácia

de terapia combinada de antifúngicos no tratamento da fusariose. A associação entre anfotericina B e voriconazol é a mais relatada na prática clínica. Guarro (2013) afirma que esta combinação apresenta baixa eficácia, enquanto Nucci e colaboradores (2014) afirmam que o antifúngico voriconazol apresenta boa resposta como tratamento de primeira linha, e que esta droga deveria ser adicionada a formulações lipídicas de anfotericina B como opção no tratamento primário da fusariose.

A técnica de microdiluição utilizada neste estudo apresentou boa reprodutibilidade para avaliação *in vitro* dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos, porém este é um método muito trabalhoso. Por ser operador dependente, exige além de mão de obra, habilidade técnica para realização e interpretação dos resultados. Métodos comerciais vêm sendo utilizados para leveduras a fim de minimizar este problema e podem representar uma alternativa para avaliação da susceptibilidade antifúngica de *Fusarium* spp. Dentre eles, tiras contendo diferentes gradientes de concentração de antifúngicos, como Etest® (bioMérieux AS, Marcy-l'Étoile, France) tem se mostrado uma alternativa ao teste de microdiluição. Estudos comparativos entre as técnicas de Etest e microdiluição têm sido publicados. Estudo multicêntrico realizado por Tortorano e colaboradores (2014a) pelo *European Confederation of Medical Mycology* (ECMM) demonstrou 100% e 96% de concordância, entre as técnicas de Etest e microdiluição, para voriconazol e anfotericina B, respectivamente, para isolados de *Fusarium* spp. Martos e colaboradores (2010) publicaram o primeiro estudo comparativo entre as duas técnicas para equinocandinas, onde demonstraram resultados equivalentes para caspofungina, micafungina e anidulafungina, com MG de 8 µg/ml para cada droga. Assim, puderam concluir que o método de Etest é capaz de detectar a resistência intrínseca do agente a estas drogas. Porém, é essencial que haja padronização para a execução da técnica. Em estudo recente durante surto de endoftalmite pós-operatória por FOSC, nove isolados tiveram suas CIMs determinadas frente às drogas antifúngicas através da técnica de Etest. Os resultados foram similares entre as drogas sugerindo resistência: Anfotericina B CIM

> 4 µg/ml, posaconazol CIM > 4 µg/ml, voriconazol CIM 1,5 – 3,0 µg/ml, anidulafungina e micafungina CIM > 8 µg/ml (BUCHTA *et al.*, 2015).

Apesar de haver controvérsias, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a identificação das espécies é mais importante nos estudos epidemiológicos, do que para a escolha da terapia adequada ao tratamento. Devido à resistência universal do gênero *Fusarium* a determinação da CIM é de pobre valor, visto que a maioria dos isolados identificados para FOSC e FSSC foram resistentes a praticamente todos os antifúngicos testados.

Devido às infecções por *Fusarium* apresentarem mortalidade elevada é necessário melhor entendimento sobre a epidemiologia do agente no Inca por análise de maior amostragem de isolados. Desta forma, será possível analisar as espécies clínicas e ambientais mais frequentes, e ainda identificar as possíveis fontes ambientais do microrganismo a fim de prevenir a ocorrência de novos casos de fusariose futuramente.

7 CONCLUSÃO

Os isolados clínicos identificados no Inca no período de janeiro a setembro de 2014 foram FOOSC e FSSC. Entre os isolados ambientais foram identificados FSSC, FOOSC e FIESC. Nosso estudo indica que ocorrem diferenças regionais na epidemiologia das espécies de *Fusarium*.

Podemos afirmar que FOOSC foi o agente predominante de fusariose no Inca em 2014, sendo este complexo responsável pelo surto no período estudado. A fonte de infecção foi localizada na sala de manutenção de cateter do Inca. O levantamento epidemiológico dos pacientes com fusariose identificou que todos os pacientes utilizaram cateter venoso de longa duração. Os fatores de risco para a fusariose na população estudada incluem presença de cateter venoso, quimioterapia, doença de base hematológica, uso de corticoides e pacientes pediátricos.

Foi demonstrado neste estudo que FOOSC, FSSC, FFSC e FIESC podem ser identificados por análise morfológica detalhada. Isto é extremamente válido para os laboratórios que não dispõem de facilidade no diagnóstico molecular. Os meios de cultivo CLA – *carnation leaf-piece agar medium* e PDA – *potato dextrose agar* demonstraram melhor rendimento. Para a identificação fenotípica dos demais complexos de espécies do gênero *Fusarium* é necessário analisar maior amostragem de isolados.

A identificação fenotípica dos complexos de espécies foi confirmada pela técnica de sequenciamento. Para a identificação interespecífica dos isolados, é necessário realizar a técnica molecular de MLST.

Não houve diferença significativa nos padrões de susceptibilidade *in vitro* entre os complexos de espécies, assim como entre as amostras clínicas e ambientais. Entre os fármacos testados, o antifúngico anfotericina B demonstrou melhor eficácia *in vitro* em relação aos fármacos voriconazol e posaconazol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. J Antimicrob Chemother. 2008 Apr 1;61(4):805–9.

Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Müller FM, et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. Clin Infect Dis. 2001 Dec 1;33(11):1871–8.

Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee C-K, Mahfouz TH, Rex JH, et al. Cleaning Patient Shower Facilities: A novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds. Clin Infect Dis. 2002 Oct 15;35(8):e86–e88.

Atalla A, Hallack Neto E, Ribeiro CCOS, Oliveira LRP, Riani LR, Soares GMT. Fusariose em transplante autólogo de medula óssea: relato de caso e considerações associadas. HU Revista, Juiz de Fora. 2010;36(3):245-9.

Azor M, Cano J, Gené J, Guarro J. High genetic diversity and poor in vitro response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*. J Antimicrob Chemother. 2009a Jun;63(6):1152–5.

Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkatapathy N, Guarro J. Less-Frequent *Fusarium* Species of Clinical Interest: Correlation between Morphological and Molecular Identification and Antifungal Susceptibility. J Clin Microbiol. 2009b May;47(5):1463–8.

Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr;51(4):1500–3.

Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-Based Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales Species in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are We and Where Should We Go from Here? *J Clin Microbiol*. 2009 Apr 1;47(4):877–84.

Bourgeois GP, Cafardi JA, Sellheyer K, Andea AA. Disseminated *Fusarium* infection originating from paronychia in a neutropenic patient: a case report and review of the literature. *Cutis*. 2010 Apr;85(4):191–4.

Buchta V, Feuermannová A, Váša M, Bašková L, Kutová R, Kubátová A, et al. Outbreak of fungal endophthalmitis due to *Fusarium oxysporum* following cataract surgery. *Mycopathologia*. 2014 Feb;177(1-2):115–21.

Burgess LW. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3. ed. Sydney: Libraries Australia; 1994.

Campo M, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009. *Journal of infection*. 2010;600(5):331-7.

Cilo BD, Al-Hatmi MAS, Seyedmouvasi S, Rijis AJMM, Verweij PE, Ener B et al. Emergence of fusariosis in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(8):1683-91.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Colombo A, Maccari G, Congiu T, Basso P, Baj A, Toniolo A. Colonization of a Central Venous Catheter by the Hyaline Fungus *Fusarium solani* Species Complex: A Case Report and SEM Imaging. Hindawi Publishing Corporation, Case Reports in Medicine. 2013: 4 pages.

Chai LYA, Kullberg BJ, Johnson EM, Teerenstra S, Khin LW, Vonk AG. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2012;50(7):2330–6.

Chung WH, Ishii H, Nishimura K, Ohshima M, Iwama T, Yoshimatsu H. Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. J. Gen Plant Pathol. 2008;74:364-74.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2.ed. ASM Press; 2001.

Dongyou L. Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. 1.ed. Florida: CRC press; 2011.

Emmons CW, Binford CH, Utz JP, Kwon-Chung KJ. Medical Mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 3rd ed. 1977.

Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA, Nelson PE, Carnation Leaves as a Substrate and for Preserving Cultures of *Fusarium* species. Phytopatology. 1981;72:151-3.

García-Ruiz JC, Olazábal I, Adán Pedroso RM, López-Soria L, Velasco-Benito V, Sánchez-Aparicio JA, et al. Disseminated fusariosis and hematologic malignancies, a still devastating association. Report of three new cases. *Rev Iberoam Micol.* 2015 Sep;32(3):190–6.

Garnica M, Cunha MO da, Portugal R, Maiolino A, Colombo AL, Nucci M. Risk Factors for Invasive Fusariosis in Patients With Acute Myeloid Leukemia and in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2014 Nov 25;ciu947.

Geiser DM, Jiménez-Gasco MDM, Kang S, et al. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 110, 473, 2004.

Geiser DM, Takayuki A, Bacon CW, Baker SE, Bhattacharyya MK, Brandt ME et al. One Fungus, One Name: Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use. *Phytopathology.* 2013;103(5):400-8.

Georgiadou SP, Velegaki A, Arabatzis M, Neonakis I, Chatzipanagiotou S, Dalekos GN et al. Cluster of *Fusarium verticillioides* bloodstream infections among immunocompetent patients in an internal medicine department after reconstruction works in Larissa, Central Greece. *Journal of Hospital Infection.* 2014;86(4):267-71.

Gerlach W, Nirenberg HI. *The Genus Fusarium - A Pictorial Atlas.* 1. ed. Berlin-Dahlen: Kommissionsverlag P Parey; 1982.

Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes, *Appl. Environ. Microbiol.* 1995;61(4):1323-30.

Guarro J, Gené J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses.* 1992 Jun;35(5-6):109–14.

Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J. Mixed infection caused by two species of *Fusarium* in a human immunodeficiency virus positive patient. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3460-2.

Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(12):1491-500.

Gupta AK, Cooper EA, MacDonald P, Summerbell RC. Utility of Inoculum Counting (Walshe and English Criteria) in Clinical Diagnosis of Onychomycosis Caused by Nondermatophytic Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2115–21.

Herbrecht R, Neuville S, Letscher-Bru V, Natarajan-Amé S, Lortholary O. Fungal infections in patients with neutropenia: challenges in prophylaxis and treatment. *Drugs Aging*. 2000;17(5):339-51.

Horn DL, Freifeld AG, Schuster MG, Azie NE, Franks B, Kauffman CA. Treatment and outcomes of invasive fusariosis: review of 65 cases from the PATH Alliance(®) registry. *Mycoses*. 2014 Nov;57(11):652–8.

<http://genomes.urv.cat/UPGMA/index.phpD-UPGMA>. DendroUPGMA. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, Spain; 2002.

Hue FX, Huerre M, Rouffault MA, de Bievre C. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2434-8.

Leslie JF, Summerell BA, Bullock S. The *Fusarium* Laboratory Manual. 1.ed. Austrália: Blackwell Publishing; 2006.

Liu D. Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. 1.ed. CRC press; 2011.

Liu YS, Wang NC, Ye RH, Kao WY. Disseminated *Fusarium* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia: A case report and review of the literature. *Oncol Lett*. 2014 Feb;7(2):334–6.

Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas J-Y, Gené J, Symoens F, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jul;15(7):634–42.

Martos AI, Romero A, González MT, González A, Serrano C, Castro C, et al. Evaluation of the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. *Med Mycol*. 2010 Sep 1;48(6):858–61.

Migheli Q, Balmas V, Harak H, Sanna S, Scherm B, Aoki T, et al. Molecular Phylogenetic Diversity of Dermatologic and Other Human Pathogenic Fusarial Isolates from Hospitals in Northern and Central Italy. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1076–84.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. 1.ed. Pennsylvania: Pennsylvania State Univ Pr; 1983.

Nucci F, Nouér SA, Capone D, Anaissie E, Nucci M. Fusariosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015 Oct;36(5):706–14.

Nucci M, Anaissie E, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C et al. Outcome predictor of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Câncer*. 2003;98(2):315-9.

Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):695-704.

Nucci M, Varon AG, Garnica M, Akiti T, Barreiros G, Trope BM et al. Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brasil. *Emerging Infectious Diseases*. 2013a;19(10):1567-72.

Nucci M, Garnica M, Gloria AB, Lehugeur DS, Dias VCH, Palma LC, et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2013b Aug;19(8):745–51.

Nucci M, Marr KA, Vehreschild MJGT, de Souza CA, Velasco E, et al. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. *Clin Microbiol Infect*. 2014a: 20(6):580-5.

Nucci M, Carlesse F, Cappellano P, Varon AG, Seber A, Garnica M et al. Earlier Diagnosis of Invasive Fusariosis with *Aspergillus* Serum Galactomannan Testing. *PLOS ONE*. 2014b;9(1):e87784.

Nucci M, Nouer SA, Graziutti M, Kumar NS, Barlogie B, Anaisse E. Probable invasive aspergillosis without prespecified radiologic findings: proposal for inclusion of a new category of aspergillosis and implications for studying novel therapies. *Clin Infect Dis*. 2010;51(11):1273–80.

O'Donnel K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BA, Balajee SA, Schroers HJ et al. Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying *Fusaria* from Human and animal infections. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3708-18.

Ocampo-Garza J, Herz-Ruelas M E, Chavez-Alvarez S, Gómez-Flores M, Vera-Cabrera L, Welsh-Lozano O, et al. Disseminated fusariosis with endophthalmitis after skin trauma in acute lymphoblastic leukaemia. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Sep 1;n/a–n/a.

Oechsler RA, Feilmeier MR, Ledee DR, Miller D, Diaz MR, Fini ME et al. Utility of molecular sequence analysis of the ITS rRNA region for identification of *Fusarium* spp. from ocular sources. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(5):2230-6.

Raad I, Tarrand J, Hanna H et al. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 532– 7.

Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkhah M, Gohari AM, Okhovvat SM, Bihamta MR et al. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *J Plant Pathol*. 2008;90(3):463-8.

Richardson MD, Warnock DW. *Fungal infections: diagnosis and management*. 4.ed. London: Blackwell Science; 2012.

Ryan FJ, Beadle GW, Tatum EL. The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. *Am J Bot*. 1943;30(10):784-99.

Salah H, Al-Hatmi AMS, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, van Diepeningen AD, et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *J Infect*. 2015 Dec;71(6):658–66.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74(12): 5463–7.

Scheel CM, Hurst SF, Barreiros G, Akiti T, Nucci M, Balajee SA. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13: 49.

Schwartz KL, Sheffield H, Richardson SE, Sung L, Morris SK. Invasive Fusariosis: A Single Pediatric Center 15-Year Experience. *J Ped Infect Dis*. 2013 Dec 8;pit080.

Segal BH, Bow EJ, Menichetti F. Fungal infections in nontransplant patients with hematologic malignancies. *Infect Dis Clin North Am.* 2012;16(4):935-64.

Short DP, O'Donnell K, Zhang N, Juba JH, Geiser DM. Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4264-72.

Short DPG, O'Donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH et al. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F.keratoplasticum* sp. nov. and *F.petrolipherum* stat. nov. . *Fungal Genet Biol.* 2013;53:59-70.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à Luz dos Autores Contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by Histone Gene Sequence Data. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65(8):3401-6.

Tortorano AM, Esposto MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanna C et al. Cross-Reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):1051-3.

Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jul;52(7):2683–5

Tortorano AM, Prigitano A, Esposto MC, Arsenijevic VA, Kolarovic J, Ivanovic D, et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014a May 3;33(9):1623–30.

Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, Van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect*. 2014b;3:27-46.

Triest D, Stubbe D, De Cremer K, Piérard D, Normand A-C, Piarroux R, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of molds of the *Fusarium* genus. *J Clin Microbiol*. 2015 Feb;53(2):465–76.

Van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B, de Hoog GS. Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand In 2014?. *Curr Clin Microbiol*. 2014;1(1):10-18.

Van Diepeningen AD, Bronkovics B, Iites J, Van Der Lee TA, Waalwijk C. Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Curr Fungal Infect*. 2015a;9(3):135-43.

Van Diepeningen AD, Feng P, Ahmed S, Sudhadham M, Bunyaratavej S, de Hoog GS. Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics. *Mycoses*. 2015b;58(1):48–57.

Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2): 463-4.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha de investigação de infecção por *Fusarium* spp.

Nº FICHA: _____

PREENCHIDO POR: _____

Nº CEPA: _____

ESPÉCIE: _____

1- IDENTIFICAÇÃO

SERVIÇO AO QUAL O PACIENTE

PERTENCE: _____

DT ATENDIMENTO: ____/____/____

2- DADOS DEMOGRÁFICOS

DT NASC: ____/____/____ IDADE: _____

GÊNERO: M () F ()

NÍVEL EDUCACIONAL: 1 GRAU () 2 GRAU () 3 GRAU ()

PROFISSÃO: _____

3- DADOS CLÍNICOS SOBRE A DOENÇA DE BASE

DOENÇA DE BASE: _____

STATUS DA DOENÇA DE BASE

 EM REGRESSÃO EM PROGRESSÃO ESTÁVEL SEM DEFINIÇÃO

4 - QUIMIOTERAPIA

 SIM () NÃO

5- TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

 SIM () NÃO

TIPO DE TRANSPLANTE: _____

DT DO TRANSPLANTE: ____/____/____

6- PRESENÇA DE DISPOSITIVOS VASCULARES ANTES DO DIAGNÓSTICO:

() SIM () NÃO

7- NEUTROPENIA NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO

() SIM () NÃO

DATA DO INÍCIO: ____/____/____

Nº DE NEUTRÓFILOS NA DATA DA FUSARIOSE: _____

8- GALACTOMANA: NO MÍNIMO DUAS AMOSTRAS > 0,5 NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO

() SIM () NÃO

DATA DO INÍCIO: ____/____/____

VALOR DE GALACTOMANANA NA DATA DA FUSARIOSE:

9- PRESENÇA DE COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO POR *Fusarium spp* PREVIAMENTE A INFECÇÃO ATUAL

() SIM () NÃO

DT DA COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO: ____/____/____

TIPO DE COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO: _____

FEZ TRATAMENTO: () SIM () NÃO

10- DADOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO ATUAL

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ____/____/____

TIPO DE INFECÇÃO/ COLONIZAÇÃO:

() APENAS COLONIZAÇÃO

() EXCLUSIVAMENTE SANGUÍNEO

SANGUÍNEO COM FOCO SECUNDÁRIO DETECTADO APÓS ICS*

SANGUÍNEO COM FOCO SECUNDÁRIO DETECTADO ANTES DA ICS*

*ICS = infecção de corrente sanguínea

11- EM PRESENÇA DE FOCO SECUNDÁRIO, QUAL O FOCO?

PELE

ÓRGÃO PROFUNDO:_____

ENDOFTALMITE

UNHA

OUTRO:_____

12- LOCALIZAÇÃO DO PACIENTE NO MOMENTO DO INÍCIO DOS SINTOMAS

EM CASA

INTERNADO

13- USO DE CORTICOIDES NOS 30 DIAS ANTERIORES À INFECÇÃO:

SIM

NÃO

14- DESFECHO:

ALTA

ÓBITO

DATA DO DESFECHO:_____/_____/_____

APÊNDICE B – Ficha de identificação fenotípica de *Fusarium* spp

N° CEPA: _____

ESPÉCIE: _____

1- PDA - AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO

ANVERSO: _____

REVERSO: _____

TAXA DE CRESCIMENTO A 30°C EM mm: _____

2- CLA - AVALIAÇÃO DE MACROCONÍDIOS PRESENTE AUSENTE

QUANTO AO N° DE SEPTOS: _____

QUANTO AO TAMANHO:

 LONGO/ ALONGADO CURTO/ ENCURTADO

QUANTO À CURVATURA:

 EM LINHA RETA/ FORMA DE AGULHA CURVATURA DORSOVENTRAL TOTAL CURVATURA DORSOVENTRAL PARCIAL LADO DORSAL MAIS CURVO QUE O LADO VENTRAL

QUANTO À FORMA DA CÉLULA APICAL:

 EMBOTADA PAPILAR CURVA/ GANCHO CÔNICA

QUANTO À FORMA DA CÉLULA BASAL:

 FORMA DE PÉ PÉ ALONGADO ENTALHADA

MAL ENTALHADA

AVALIAÇÃO DE MICROCONÍDIOS

PRESENTE

AUSENTE

QUANTO AO N° DE SEPTOS:_____

QUANTO AO TAMANHO:_____

QUANTO À FORMA:

OVAL

RENIFORME

QUASE OVOIDE COM BASE TRUNCADA

PIRIFORME

NAPIFORME (FORMA DE NABO)

GLOBOSO

FUSIFORME

FORMA DE CIGARRO

QUANTO À CÉLULA CONIDIOGÊNICA:

MONOFIÁLIDES

POLIFIÁLIDES

LONGA

CURTA

QUANTO À DISPOSIÇÃO DAS CADEIAS:

SOLITÁRIOS

EM CADEIAS CURTAS

EM CADEIAS LONGAS

EM FALSAS CABEÇAS

3- SNA - AVALIAÇÃO DE CLAMIDOSPOROS

PRESENTE

AUSENTE

QUANTO À DISPOSIÇÃO:

- ISOLADOS
 - AOS PARES
 - AGRUPADOS
 - EM CADEIAS
- QUANTO À PAREDE:
- LISA
 - RUGOSA

4- OUTRAS CARACTERÍSTICAS:

- HIFAS CIRCINADAS (ENROLADAS)
- MESOCONÍDIO

CARACTERÍSTICAS _____

- ODOR DA COLÔNIA (MICOTOXINAS)

DESCRIÇÃO DO ODOR _____

5- COMENTÁRIOS

APÊNDICE C - Características de 17 pacientes com fusariose no período de janeiro - setembro de 2014 no Inca-RJ¹

Dados demográficos e clínicos	n = 17 (%)
Idade - Mediana (variação)	11 (4-50)
Masculino	10 (58,8)
Feminino	7 (41,2)
Doença de base	
Hematológica	12 (70,6)
Não hematológica	5 (29,4)
Neutropenia < 500 céls/ mm ³	
Presente	9 (52,9)
Ausente	8 (47,1)
Galactomana > 0,5 ng/mL	
Ausente	12 (70,6%)
Não avaliado	5 (29,4%)
Transplante de medula óssea	
Presente	7 (41,2)
Ausente	10 (58,8)
Quimioterapia	
Presente	15 (88,2)
Ausente	2 (11,8)
Uso de corticoides	
Presente	11 (65%)
Ausente	6 (35%)
Cateter de Longa Duração	
Presente	17/(100)
Colonização/ infecção prévia por <i>Fusarium</i> spp.	
Ausente	17/(100)
Antifúngico prévio ²	
Voriconazol	1/(5,9)
Localização do paciente	
Cemo ³ pediatria	2/(11,8)
Cemo adulto	5/(29,4)
Oncopediatria	4/(23,5)

	Hematopediatria	4/(23,5)
	Hematologia adulto	2/(11,8)
Coinfecção por outros fungos⁴		
	Presente	2 (11,8)
Óbito 30 dias após a infecção		
	Presente	4 (24%)
	Ausente	13 (76%)
Complexo de espécie identificada⁵		
	FOSC	15 (88,2)
	FSSC	2 (11,8)
Amostras clínicas⁶		n = 33 (%)
	Hemocultura	26 (78,8)
	Ponta de cateter	6 (18,2)
	Urina	1 (3)

¹Inca-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; ²considerado antifúngico prévio o uso de anfotericina B, voriconazol e/ou posaconazol; ³Cemo, Centro de Transplantes de Medula Óssea; ⁴Coinfecção por *Aspergillus* spp. e *Sporothrix brasiliensis*; ⁵ FOSC, complexo de espécies *Fusarium oxysporum*; FSSC, Complexo de espécies *Fusarium solani*; ⁶Alguns pacientes apresentaram amostras clínicas diferentes.