



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RAFAELLA BRAGA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE *MULTIPLEX* PARA ESPÉCIES DO
GÊNERO *Candida* DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

2014

RAFAELLA BRAGA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE *MULTIPLEX* PARA ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*
DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Graziella Nuernberg Back Brito

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Santos, Rafaela Braga

Identificação molecular por reação em cadeia da polimerase
multiplex para espécies do gênero *Candida* de importância médica /
Rafaela Braga Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

Orientadora: Graziella Nuernberg Back Brito.

1. *Candida* . 2. PCR. 3. Multiplex. 4. Iniciadores. 5.
Diagnóstico. I. Back Brito, Graziella Nuernberg , orient. II.
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio
de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18 de dezembro de 2014
E-mail: rafinha_braga@yahoo.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Sílvia Maria Rodrigues Querido

Faculdade de Pindamonhangaba (FAP)
Campus Dutra
Pindamonhangaba

São José dos Campos, 18 de dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Sandoval Santos** e **Odete Braga Santos**, pelo amor e carinho, por todo empenho e dedicação à minha educação, pela força, por serem meus espelhos e companheiros. Obrigada por me ensinarem os verdadeiros valores da vida. Obrigada pelo caráter, pela paciência e por sonharem meus sonhos. Obrigada por tudo. Não tenho palavras suficientes para descrever tamanha gratidão.*

*Aos meus irmãos **Nicolau Braga Santos** e **Vanessa Braga Santos**, pelo amor, carinho, apoio e incentivo, pois também são meus espelhos. Obrigada por serem a minha família que eu tanto amo. Todas as conquistas em minha vida não são minhas, são nossas. Obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ser minha fonte de coragem.

Aos meus pais, principalmente minha mãe Odete Braga Santos, pela compreensão nestes anos de estudo, pelo amor, incentivo, dedicação e por tudo que eles representam na minha vida. Eu não seria nada sem eles.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito, por tudo que me ensinou, detalhe por detalhe, com toda paciência e dedicação. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos, pela amizade e companheirismo.

Ao querido Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por todo o conhecimento, colaboração, experiência e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos Prof. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, por todo apoio e suporte durante nossas reuniões.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Microbiologia, Felipe Eduardo de Oliveira, Adeline Lacerda Jorjão, Nádia Domingues, Patrícia Pimentel de Barros, Ana Carolina Chipoletti dos Santos, Anna Carolina Borges Pereira da Costa, Cristiane Aparecida Pereira Correia, Rodney Dennis Rossoni, Kely Karina Belato, Mirian Marcolan de Mello, Jonatas Rafael de Oliveira, Felipe Camargo, Marisol Velloso, Fernanda Freire, Isabela Amêndola, Michelle Peneluppi Silva, por toda ajuda no laboratório, pela nossa união, apoio, convivência e amizade.

À querida Dra. Patrícia Monteiro Ribeiro, pelas considerações feitas no Exame Geral de Qualificação.

À Profa. Dra. Sílvia Maria Rodrigues Querido, por fazer parte da minha banca examinadora.

Aos técnicos do laboratório, Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pela amizade e ajuda oferecida no laboratório.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação Rosemary de Fatima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Ivan Oliveira Damasceno.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	07
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Características gerais do gênero <i>Candida</i>	14
2.2 Prevalência e identificação de <i>Candida</i> spp.....	17
3 PROPOSIÇÃO.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Origem das amostras.....	24
4.2 Processamento das amostras para identificação molecular..	25
4.2.1 Extração do DNA das amostras.....	25
4.2.2 Quantificação do DNA extraído.....	26
4.2.3 Amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase).....	26
4.3 Análise de custos.....	28
4.4 Análise das horas requeridas.....	28
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	40
8 REFERÊNCIA.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API	= Sistema de Identificação Padronizado (método fenotípico de identificação. Empresa : Biomerieux-França)
ATCC	= American Type Culture Collection
°C	= grau Celsius
DNA	= Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	= Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EDTA	= ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>g</i>	= gravitacional
h	= hora
HAART	= <i>highly active anti-retroviral therapy</i>
HIV	= Vírus da Imunodeficiência Humana
IgA-S	= imunoglobulina A secretória (IgA-S)
M	= Molar
mg	= miligrama
min	= minutos
mL	= mililitros
mM	= milimolar
NaCl	= Cloreto de sódio
Nm	= nanômetro
pb	= pares de base
PBS	= tampão fosfato
PCR	= Reação em cadeia da polimerase
pH	= potencial hidrogênio-iônico
PLB1	= Fosfolipase B1
RNA	= Ácido ribonucléico
rRNA	= RNA ribossômico

s	= segundos
SAP	= Proteinases aspartil secretórias
SDS	= Dodecil sulfato de sódio
spp.	= espécies
TE	= Tris e EDTA
TBE	= Tris/Borato/EDTA
μL	= microlitros
μM	= micromolar
%	= porcentagem

Santos RB. Identificação molecular por reação em cadeia da polimerase *multiplex* para espécies do gênero *Candida* de importância médica [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo padronizar a identificação das amostras de espécies de *Candida albicans* e não-*albicans* por meio da técnica molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) *multiplex*. Os isolados foram obtidos de um estudo prévio, no qual foram realizados os procedimentos de coleta, isolamento e identificação das espécies de *Candida* de indivíduos HIV positivos e controle. Foram realizadas provas fenotípicas como a produção de clamidoconídeos e formação de tubo germinativo e pelo sistema de identificação API 20 C AUX. Para a identificação molecular de cada espécie foram utilizadas cepas ATCC e controle positivo. Os isolados foram semeados em caldo Sabouraud dextrose e incubados à 37 °C por 24 h. Foi realizada a extração, quantificação e purificação do DNA. A amplificação do DNA foi realizada por iniciadores específicos para a identificação de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. A presença e o comprimento dos fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose com brometo de etídio e visualizadas em luz ultra-violeta. Um total de 104 amostras previamente identificadas pelo API foram identificadas pela PCR *multiplex* e os resultados mostraram que apenas 14,4% estavam em discordância com o método fenotípico, dentre elas, dez amostras de *C. albicans*, duas de *C. glabrata*, uma de *C. parapsilosis* e duas de *C. tropicalis*. As amostras em discordância foram semeadas em meio cromogênico para *Candida* para confirmação da PCR *multiplex*. Os procedimentos de identificação fenotípicas geraram um custo aproximado de R\$82,00 por amostra. PCR *multiplex* teve um gasto de aproximadamente R\$8,00 por amostra e o tempo gasto na técnica molecular levou aproximadamente 8 h, já a identificação por métodos clássicos e bioquímicos podem exigir até 72 h. Concluímos que a PCR *multiplex* é um método preciso, fácil, econômico e rápido para a identificação destas espécies.

Palavras-chave: *Candida*. PCR. *Multiplex*. Iniciadores. Diagnóstico. *Candida albicans*.

Santos RB. Molecular identification by polymerase chain reaction multiplex for *Candida* species of medical importance [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

This study aimed to standardize sample identification of *Candida albicans* and non-*albicans* species by polymerase chain reaction of molecular (PCR) multiplex. The isolates were obtained from a previous study, in which the procedures were performed collection, isolation and identification of *Candida* species of HIV-infected individuals and control. Phenotypic tests such as chlamydospore production and germ tube formation and the identification system API 20 C AUX were performed. For the molecular identification of each species were used strains ATCC and positive control. The isolates were plated on Sabouraud dextrose broth and incubated at 37 °C for 24 h. Extraction, quantitation and purification of DNA was carried out. DNA amplification was performed with specific primers for the identification of *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. guilliermondii*. The presence and length of the amplified fragments were analyzed on agarose gel with ethidium bromide and visualized under ultra-violet light. A total of 104 samples previously identified by API were identified by multiplex PCR and the results showed that only 14.4% were in disagreement with the phenotypic method, among them, ten samples of *C. albicans*, two *C. glabrata*, one *C. parapsilosis*, and two *C. tropicalis*. Samples in dissent were sown in chromogenic medium for *Candida* to confirm the PCR multiplex. The phenotypic identification procedures generated a cost of R\$82.00 per sample. Multiplex PCR had a cost of about R\$8.00 per sample and the time spent in molecular technique took about 8 h, since the identification by classical biochemical methods and may require up to 72 h. We conclude that the multiplex PCR method is an accurate, easy, economical and quick to identify these species.

Keywords: *Candida*. PCR. Multiplex. Primers. Diagnostic. *Candida albicans*.

1 INTRODUÇÃO

Gênero *Candida* compreende espécies de leveduras amplamente espalhadas na natureza, habitando orofaringe, boca, dobras da pele, secreção brônquica, vagina, urina e fezes de seres humanos e animais homeotérmicos, podendo ser parasitas no homem e em outras espécies de animais. Algumas espécies de leveduras são consideradas comensais nos seres humanos, vivendo normalmente, sem causar infecções. Porém, em situações de imunocomprometimento, as leveduras podem proliferar e causar doenças, o que tornam estas espécies de grande importância médica (Jorge, 2006; Mohammadi et al., 2013).

O aumento da incidência de infecções causadas por espécies do gênero *Candida* nos últimos anos está relacionado com o aumento de indivíduos idosos, de pacientes imunocomprometidos e ao uso mais difundido de dispositivos médicos, como catéteres, nos quais estas leveduras podem formar biofilmes (Silva et al., 2012). Além da formação de biofilme, que é considerada fator de virulência, as espécies de *Candida* apresentam capacidade de adesão às células; produção de toxinas; produção de hifas ou pseudohifas que aumentam sua capacidade invasiva e permitem maior resistência à fagocitose; produção de enzimas como proteinases e fosfolipases que também atuam no processo de invasão tecidual, fator que dificulta a eliminação destes micro-organismos pelo hospedeiro (Jorge, 2006).

Em pacientes imunocomprometidos, as espécies de *Candida* podem causar diferentes tipos de infecções, desde doenças bucais leves até candidose sistêmica. O diagnóstico e tratamento de doenças causadas por este gênero é de extrema importância em pacientes HIV positivos, pois mesmo com o advento da terapia

antirretroviral, ainda apresentam mortalidade significativa associada ao gênero *Candida* (Patel et al., 2012).

Apesar de *Candida albicans* ser responsável pela maior parte das infecções que ocorrem no homem, dentre elas, infecções na pele, unhas, mucosas, trato intestinal e urinário, outras espécies também são potencialmente causadoras de candidoses, por exemplo, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* (Koneman et al., 2008; Silva et al., 2012).

O surgimento de espécies não-*albicans* como patógenos humanos pode ser atribuído à melhoria nos métodos de identificação, como exemplo, os métodos moleculares, e aos medicamentos utilizados, que selecionam as amostras resistentes, sendo que algumas espécies não-*albicans* apresentam maior perfil de resistência aos agentes antifúngicos comuns, como exemplo, fluconazol (Swinne et al., 2004; Silva et al., 2012; Demitto et al., 2012).

O método de identificação molecular PCR (reação em cadeia da polimerase) é um método *in vitro* que se utiliza de enzimas sintéticas ou iniciadores (*primers*) para amplificar, exponencialmente, sequências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA) e tem sido amplamente utilizada para identificação de diversos micro-organismos. Este método só foi possível graças à introdução de uma enzima termoestável, similar a extraída de uma bactéria que vive em fontes térmicas (*Thermus aquaticus*), a *Taq* polimerase, a qual permanece ativa mesmo em altas temperaturas. É uma técnica rápida, levando cerca de duas horas para completar seu ciclo. A reação em cadeia da polimerase *multiplex* utiliza-se de vários *primers* numa amostra e consiste dos seguintes estágios: o aquecimento a 95 °C que desnatura o DNA de fita dupla, a seguir o resfriamento a 60 °C que permite o anelamento dos *primers* com suas sequências complementares no DNA alvo, então ocorre a extensão ou alongamento de cada *primer*

gerando fitas recém-sintetizadas do fragmento que funcionou como molde. A *Taq* polimerase pode estender os *primers* em temperatura de até 72 °C. Quando a síntese se completa, toda a mistura é aquecida até 95 °C, para a desnaturação dos dúplices de DNA recém-formados. A repetição dos ciclos de síntese (resfriamento) e desnaturação (aquecimento) amplifica rapidamente a sequência de interesse e faz com que ela aumente exponencialmente. Os produtos da PCR são geralmente visualizados por eletroforese em gel de agarose acrescido de brometo de etídeo e podem ser visualizados sob luz ultravioleta (Eeles et al., 1992; Mesquita et al., 2001; Lodish et al., 2002; Ribeiro et al., 2011a).

Visto que as leveduras do gênero *Candida* podem causar diferentes infecções de importância médico-odontológica e que as diferentes espécies apresentam um perfil de resistência variável, a identificação precisa das espécies de *Candida* é extremamente importante para o tratamento adequado destas doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do gênero *Candida*

Leveduras do gênero *Candida* são organismos unicelulares e eucariotos, classificados como fungos imperfeitos da Classe Blastomycetes, Subdivisão Deuteromycotina, devido à inabilidade do gênero em apresentar formas sexuadas. O gênero *Candida* é composto por aproximadamente duzentas espécies de leveduras não produtoras de endósporos. Espécies de *Candida* são distinguidas entre os demais Deuteromycetes pela habilidade de formar pseudo-hifas, sendo *C. glabrata* a única exceção (Jorge, 2012).

Podem ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, fazendo parte da microbiota de homens e animais. São micro-organismos comensais, que habitam o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota vaginal, da uretra e do trato respiratório. Entretanto, leveduras do gênero *Candida* podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas. Isto se deve ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro ou ao rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras, uso de catéteres ou cirurgias invasivas (Giolo, Svidzinski, 2010).

Quando as defesas locais ou sistêmicas do hospedeiro estão diminuídas, *Candida* tem capacidade de invadir tecidos e provocar doença, sendo sua virulência determinada mais pelo hospedeiro do que pelo fungo (Jorge, 2006). Além disso, a virulência das leveduras do gênero *Candida* depende de outros fatores, como: adesão às células do

hospedeiro, formação de hifas e pseudohifas, secreção de enzimas hidrolíticas, como exemplo, proteinases e fosfolipases, dimorfismo e formação de biofilme (Nikawa et al., 2006).

Patógenos fúngicos são capazes de aderir diferentes tipos celulares e de interagir com componentes da matriz extracelular do hospedeiro (Nikawa et al., 2006). Diferentes amostras apresentam capacidades de aderência variáveis. Amostras de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea*, parecem ser mais aderentes que as demais espécies (Jorge, 2006).

A parede celular de *C. albicans* é composta por uma camada de quitina e polímeros de glicose e uma camada externa rica em manoproteínas que representam entre 30 a 50% do peso seco do micro-organismo. As manoproteínas têm um importante papel na adesão, antigenicidade, modulação da resposta imune do hospedeiro e no reconhecimento da levedura por células do sistema imune inato (Mora-Montes et al., 2007). De acordo com Manfredi et al. (2006) a aderência de *Candida* às células do hospedeiro é obtida pela combinação de mecanismos específicos, representados pela interação entre o ligante e o receptor, e não específicos, pela agregação, hidrofobicidade da superfície celular e interações eletrostáticas. De modo geral, as adesinas são biomoléculas que promovem a aderência de *C. albicans* às células do hospedeiro.

A característica de dimorfismo apresentada por *C. albicans* é correlacionada à virulência deste micro-organismo (Kumamoto, Vines, 2005). Na maioria das infecções bucais, leveduras e hifas podem ser encontrados nos tecidos infectados, entretanto, a forma filamentosa está mais relacionada com invasão tecidual em achados clínico-patológicos nas candidoses bucais (Villar et al., 2004). Segundo Kumamoto e Vines (2005), as hifas são importantes para invasão tecidual, além de escapar da endocitose das células do hospedeiro.

Um dos fatores de virulência que estas espécies apresentam é o biofilme, formado por uma associação de micro-organismos, agrupando-se em tecidos, próteses, catéteres e outras superfícies. Essa associação oferece vantagens, como maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e ação de antimicrobianos (Giolo, Svidzinski, 2010).

Outro mecanismo de patogenicidade é a atividade enzimática. *C. albicans* secreta várias enzimas, entre as quais estão: fosfolipase, lipase, fosfomonoestearases e proteinases. A proteinase é produzida principalmente pelas espécies mais patogênicas, como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, o que suporta a idéia de que as proteinases são relacionadas com virulência (Hube, Naglik, 2001; Naglik et al., 2003; Naglik et al., 2004). As proteinases aspartil secretórias (SAP) degradam muitas proteínas humanas no sítio de lesão, como albumina, hemoglobina e imunoglobulina A secretória (IgA-S). Sua atividade proteolítica tem sido associada com invasão tecidual (Yang, 2003). Em 2004, Naglik et al. relataram que a expressão dos genes da família SAP também está relacionada com a co-regulação de outros fatores de virulência, como a formação do biofilme, aderência, germinação, dimorfismo, além das funções de penetração e invasão dos tecidos, nutrição e interação com o sistema imune do hospedeiro.

Fosfolipases agem clivando os fosfolipídeos, prejudicando, portanto, a estabilidade da membrana, o que ocasiona lise celular. São um grupo de enzimas cuja secreção, em *C. albicans*, é regulada pelo gene PLB1 (Fosfolipase B1). Esta expressão é afetada por fatores nutricionais, condições do ambiente (temperatura e pH) e fase de crescimento da levedura. A produção de fosfolipase é concentrada nas pontas das hifas, e a atividade de produção é maior quando a hifa está em contato direto com a membrana, o que demonstra que as fosfolipases extracelulares são importantes na invasão tecidual por *C. albicans* (Giolo, Svidzinski, 2010).

Back-Brito et al. (2011) avaliaram a produção de proteinase e fosfolipase de isolados bucais de *Candida albicans* de pacientes HIV positivos, sob tratamento com terapia antirretroviral altamente ativo (HAART) e concluíram que esta terapia não reduziu a secreção dessas enzimas relacionadas à patogenicidade destas espécies.

2.2 Prevalência e identificação de *Candida* spp.

Infecções fúngicas invasivas representam uma grande preocupação para a saúde pública. Em particular, a candidose sistêmica permanece uma crescente fonte de mortalidade. O diagnóstico precoce é muitas vezes difícil, os sintomas não são específicos e as culturas são muitas vezes negativas ou tornam-se positivas muito tarde para iniciar uma terapia antifúngica eficaz (Lass-Flörl, 2009).

A identificação precisa das variadas espécies do gênero *Candida* é fundamental para adequada escolha do tratamento antifúngico, visto que leveduras deste gênero são os principais responsáveis por infecções sistêmicas potencialmente fatais em hospedeiros imunocomprometidos, particularmente pacientes infectados por vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes neutropênicos tratados para câncer ou distúrbios linfoproliferativos e em transplante de órgãos. Além disso, é considerada uma das infecções hospitalares mais comuns, principalmente em pacientes internados (catéteres e hemocultura). Um diagnóstico precoce e preciso pode reduzir elevada taxa de mortalidade nestes pacientes, reduzindo também o tempo de internação dos mesmos. (Santos, Soares, 2005; Ferreira et al., 2013).

Candida albicans é o patógeno mais comum isolado a partir de amostras clínicas, mas algumas espécies não-*albicans* também

representam um importante número de infecções (Liguori et al., 2010a). Esta espécie é também a mais identificada na forma comensal, sendo isolada em até 75% dos indivíduos saudáveis (Patel et al., 2012).

As amostras utilizadas no teste molecular do presente trabalho foram coletadas e identificadas por meio de provas fenotípicas (Junqueira et al., 2011). Os testes de crescimento em soro fetal bovino estéril e microcultivo foram utilizados para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis* das demais espécies não produtoras de tubo germinativo e clamidoconídeo (Koneman et al., 2008).

O crescimento em meio cromogênico tem sido bastante utilizado para isolamento de *Candida* spp. pois auxilia na identificação presuntiva de algumas espécies e facilita a seleção das cepas a serem isoladas. Entretanto há controvérsias em relação às contagens de colônias quando comparado com ágar Sabouraud dextrose. Ribeiro et al. (2011b) relataram que o ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol apresentou maior número de colônias (UFC/ml) em relação ao CHROMágar, e que esta diferença poderia ser explicada pelo fato do CHROMágar ser um meio mais seletivo e consequentemente inibir parcialmente alguns isolados de *Candida*.

Ribeiro et al. (2011a) compararam a PCR com os métodos fenotípicos para discriminação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* da cavidade oral de pacientes com transplante cardíaco, pacientes com tuberculose, pacientes HIV-positivos e pacientes saudáveis. Um total de 200 isolados, inicialmente classificadas como *C. albicans* foram analisados utilizando o seguinte testes fenotípicos: a) verificação da produção de tubo germinativo; b) formação e arranjo estrutural de clamidoconídeo em ágar fubá, em ágar tabaco, ágar girassol e ágar caseína; c) crescimento em temperatura de 45 °C. Todos os isolados que foram considerados sugestivos de *C. dubliniensis* nos testes fenotípicos foram submetidos a uma análise de PCR utilizando iniciadores universais e iniciadores específicos para *C. dubliniensis*. A PCR neste estudo identificou 100%

dos isolados como *C. albicans* não identificando nenhum isolado como sendo *C. dubliniensis*. Segundo estes autores, os testes fenotípicos realizados apresentaram resultados satisfatórios, com grau de eficiência entre 76% e 92,5%, porém a identificação definitiva entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* ainda requer técnicas genotípicas.

De acordo com Sugawara et al. (2013) as doenças fúngicas invasivas são cada vez mais reconhecidas como eventos de risco de vida em pacientes com distúrbios hematológicos, em particular nos doentes submetidos a quimioterapia intensiva ou transplante alogênico de células-tronco.

Junqueira et al. (2011) coletaram amostras da cavidade bucal de 61 pacientes HIV positivos com e sem candidoses, e verificaram que *C. albicans* foi a espécie predominante. As demais espécies isoladas foram: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entre estes pacientes, 11 apresentaram culturas mistas de *Candida*, formadas por *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata* e *C. albicans* e *C. krusei*.

Em 2013, Godoy et al. isolaram 81 amostras da cavidade bucal de pacientes com insuficiência renal crônica, submetidos à hemodiálise, dentre as espécies identificadas *Candida albicans* (63%) foi a espécie prevalente, seguida por *Candida glabrata* (16%). Em geral, as leveduras foram sensíveis aos antifúngicos avaliados, como o fluconazol, caspofungina e anfotericina B, contudo, para as espécies não-*albicans* foram necessárias concentrações significativamente mais elevadas de fluconazol.

Segundo estudo de Pannanusorn et al. (2013) as espécies patogênicas de *Candida* são atualmente reconhecidas como os principais agentes causadores de infecção fúngica invasiva e é a quarta causa mais comum de infecção nosocomial da corrente sanguínea. Neste estudo, isolados de *Candida* provenientes de infecções da corrente sanguínea foram avaliados para a formação de biofilme e os resultados

mostraram que 88,7% dos isolados de *Candida* não-*albicans* formaram biofilme em comparação com 40% dos isolados de *C. albicans*. Dentre as espécies não-*albicans*, a formação de biofilme foi mais frequentemente observada em *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* (100%), seguida por *C. glabrata* (95%), *C. dubliniensis* (85,7%) e *C. parapsilosis* (66,7%). Segundo os autores, estes resultados sugerem que o biofilme é o fator de virulência, provavelmente, mais significativo para infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* do que por *C. albicans* e também suportam a hipótese de que *C. albicans*, a mais patogênica espécie dentre o gênero *Candida*, possui mecanismos além da formação de biofilme para provocar candidemia.

Ferreira et al. (2013) compararam a frequência de espécies de *Candida* a partir de ambientes hospitalares (centro cirúrgico e centro de cuidados intensivos neonatal) e infecções hospitalares de pacientes internados (catéteres e hemocultura). Avaliaram a produção de biofilme e sua atividade metabólica, produção de hemolisina e os perfis de suscetibilidade antifúngica de isolados ambientais e clínicos. Gênero *Candida* foi prevalente em amostras coletadas de ambientes hospitalares, o que pode fornecer um reservatório para infecções contínuas. As amostras clínicas apresentaram maior produção de hemolisina e menor sensibilidade ao fluconazol. Espécies não-*albicans* predominaram em amostras coletadas de ambientes hospitalares e infecções. Estas espécies tiveram menor suscetibilidade ao fluconazol e anfotericina B e seus biofilmes tiveram atividades metabólicas mais altas do que as produzidas por *C. albicans*.

Liguori et al. (2010b) compararam nove sistemas fenotípicos para identificação de *Candida* spp. com o método molecular PCR *multiplex*. Os sistemas fenotípicos foram os kits: API 20 C AUX (bioMérieux S.p.A.), RYIP (Dade Behring S.p.A); Vitek2 IDYST sistema (bioMérieux S.p.A); meios cromogênicos (CHROMagar; AlfaWassermann SpA), Oxoid Chromogenic *Candida* Ágar (OCCA), *Candida* ID2

(bioMérieux S.p.A.), Ágar Identificação de *Candida* (Biotest Itália Srl), CandiSelect 4 (Bio-Rad), e Chromalbicans Ágar (Biolife). Embora, com diferenças de poder discriminatório, os métodos testados apresentaram níveis de sensibilidade aceitáveis e especificidade quando comparado ao PCR *multiplex* e, portanto, todos poderiam ser úteis para a identificação de *C. albicans*. Contudo, os autores relataram que técnicas que requerem cultivo destes micro-organismos são técnicas laboriosas, de alto custo e requerem maior tempo para a identificação.

Ribeiro et al. (2011a) avaliaram os principais métodos fenotípicos para a discriminação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* de isolados da cavidade bucal obtidas de pacientes submetidos a transplante cardíaco ortotópico sob terapia imunossupressora, pacientes com tuberculose sob antibioticoterapia prolongada e pacientes HIV positivos sob terapia antirretroviral. Dentre os métodos fenotípicos testados, nenhum mostrou 100% de concordância com o método genotípico.

Romeo et al. (2009) desenvolveram um protocolo de PCR *multiplex* para a detecção de *Candida glabrata* e duas novas espécies, *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis*, que compartilham muitas características fenotípicas com a primeira, sendo facilmente confundidas como tal. Infecções causadas por estas novas espécies foram recentemente relatadas, contudo inicialmente estas espécies haviam sido identificadas como *C. glabrata*. Isso destaca o alto grau de semelhança fenotípica compartilhada por estas três espécies de *Candida* e enfatiza o problema de erro de identificação entre elas. Portanto, a identificação de *C. nivariensis* e *C. bracarensis* exige o uso de técnicas genotípicas. O método molecular PCR *multiplex* descrito por estes autores foi simples, rápido e preciso para distinguir estas três espécies.

De acordo com Shin et al. (2013), as infecções fúngicas pulmonares continuam aumentando devido ao grande número de pacientes imunocomprometidos, sendo assim de extrema importância uma rápida e precisa detecção e identificação destes fungos patogênicos.

Os autores avaliaram o desempenho da PCR para detecção e identificação dos organismos fúngicos em lavado broncoalveolar e concluíram que a PCR possuía concordância com as culturas de espécimes nos quais fungos foram detectados anteriormente. Além disso, a PCR detectou organismos fúngicos em amostras nas quais as culturas falharam devido ao supercrescimento bacteriano.

Considerando as variações na suscetibilidade aos agentes antifúngicos entre as espécies de *Candida*, a identificação em nível de espécie é de extrema importância para garantir um tratamento rápido e adequado. Mohammadi et al. (2013) comprovaram que a PCR é um método simples e confiável e tem potencial para identificar mais leveduras isoladas clinicamente. Patel et al. (2012) comprovaram que a espécie de *Candida krusei* foi resistente ao fluconazol. Já as espécies *C. glabrata* e *C. dubliniensis* desenvolveram resistência rapidamente e os resultados clínicos com fluconazol necessitaram de doses mais elevadas para estas espécies.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo padronizar a identificação de sete espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) utilizando a técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex* e verificar as vantagens deste método em relação aos custos, precisão e tempo quando comparado técnicas fenotípicas anteriormente empregadas para identificação destes isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das amostras

Os isolados utilizados neste estudo foram obtidos em um estudo prévio (Junqueira et al., 2011) nos quais foram realizados os procedimentos de coleta, isolamento e identificação das amostras de *Candida* spp. de indivíduos HIV positivos portadores de candidose orofaríngea e controle (Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP com protocolo 051/2009-PH/CEP e Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas protocolo 274/2009).

As amostras da cavidade bucal foram coletadas por meio de enxágue bucal (NaCl a 0,85%, PBS 0,1M e pH 7,2). Após os procedimentos laboratoriais de centrifugação e ressuspensão do lavado bucal, as amostras foram semeadas em meio cromogênico para *Candida*. Os isolados foram identificados por provas fenotípicas, como a produção de clamidoconídeo e formação de tubo germinativo e pelo sistema de identificação API 20 C AUX (Bio-Merieux, França). Dentre os isolados identificados fenotipicamente, 104 foram analisados genotipicamente através da reação em cadeia da polimerase (PCR) *multiplex*.

Os isolados foram mantidos congelados em caldo Sabouraud acrescido de glicerol em freezer -80 °C.

4.2 Processamento das amostras para identificação molecular

Para a utilização dos isolados, 10 µl das amostras foram inicialmente semeadas em 2 ml de caldo Sabourad dextrose e incubadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, 2 ml de cada amostra foram transferidos para microtubos para serem centrifugadas por 10 min, a 2.500 *xg* (Eppendorf Centrifuge 5430R). O sobrenadante foi descartado e o depósito ressuspensionado em 2 mL de PBS após homogeneização em agitador de tubos (Vortex) por 30 s.

4.2.1 Extração do DNA das amostras

Para a extração de DNA, foi adicionado 100 µl de uma solução de lise da parede celular (0,9 M sorbitol; 0,1 M EDTA; 50 mM dithiothreitol - DTT, Calbiochem, USA; Zymolyase® 165 ug por mL, ICN, USA) em cada tubo. Os tubos foram incubados à temperatura de 37 °C por 30 min em banho-maria. Após este período, foram centrifugados a 2.500 *xg*. por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o depósito ressuspensionado em outra solução para lise das membranas celulares (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% SDS). Em seguida, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 min para a extração total do DNA.

O DNA extraído foi purificado acrescentado às amostras 100 µL 5M de acetato de amônio (Quimex, Brasil) e foram mantidas no gelo por 20 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 *xg*. por 15 min para remoção de proteínas. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo contendo 150 µL de isopropanol. O sistema foi homogeneizado e mantido em congelador a -20 °C por 30 min. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 7.500 *xg*. Descartou-se o

sobrenadante e o precipitado foi lavado com 200 μ L de etanol 80% e centrifugação por 5 min a 7.500 $\times g$. Os tubos permaneceram abertos em estufa de secagem por 30 min para a completa evaporação do etanol. O precipitado foi suspenso em 30 μ L de tampão TE (10mM TE, pH 7,5).

Além da extração de DNA das amostras clínicas, também foi realizada a extração das seguintes amostras ATCC: *C. albicans* ATCC 36802; *C. guilliermondii* ATCC 6260; *C. tropicalis* ATCC 13803; *C. glabrata* ATCC 9030; *C. dubliniensis* ATCC 646 MYA; *C. parapsilosis* ATCC 90018; *C. krusei* ATCC 6258, que foram utilizadas como controles positivos das reações de amplificação.

4.2.2 Quantificação do DNA extraído

Após os procedimentos de extração foi realizada a quantificação de DNA com o objetivo de obter melhores resultados na amplificação. Um microlitro do produto de extração foi avaliado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) com medição da sua absorvância em 260 nm. Após aferição, as amostras foram diluídas para a concentração final de 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

4.2.3 Amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a discriminação das espécies fúngicas, foram amplificados as regiões ITS1 entre os genes 18S rRNA e 5,8S rRNA e uma porção do ITS2 de *C. albicans*. Foi realizada uma PCR *multiplex* utilizando os *primers* e condições de amplificação descritas por Liguori et al. (2010a).

Para uma reação de 25 µl de volume total, foi utilizado Taq Buffer 10 ×, dNTPs 10 mM, *primers* 5 µM e 0.5 µL *Taq* polimerase 5 u µL⁻¹. O *primers* utilizados estão descritos no Quadro 1 e suas respectivas sequências de nucleotídeos (Desenhos dos *primers*).

Quadro 1 - *Primers* e seus respectivos desenhos utilizados para a identificação de diferentes espécies de *Candida*

Primers	Desenho dos Primers
ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS2	5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'
CA3	5'-GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG-3'
CA4	5'-AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G-3'
ITS1F	5'-CCA GCG CTT AAT TGC G-3'
ITS1K	5'-ATC GTC TGA ACA AGG CCT GC-3'
ITS2D	5'-GAG AAC CAA GAG ATC CGT TGT TG-3'

(Liguori et al., 2010a)

A amplificação foi realizada no termociclador com um programa de uma desnaturação inicial a 92 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de: 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C. Ao término dos ciclos, foi realizado um único ciclo de alongação final a 72 °C por 10 min. Em todas as reações foram utilizadas DNA molde das cepas ATCCs como controles positivos das reações e um controle negativo, sem adição de DNA molde.

A presença e o comprimento dos fragmentos amplificados foram analisados após eletroforese em tampão TBE (0,1M Tris, 0,09M ácido bórico, 1mM de EDTA, pH8,4) e gel de agarose 2% com brometo de etídio (0,5 ug mL⁻¹) a 100 V por 1 h e visualizadas na presença de luz ultravioleta pelo aparelho transluminador S/N 042606-001 Benchtop. Os *primers* utilizados permitiram a identificação de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* por

meio dos diferentes fragmentos gerados (Liguori et al, 2007; Liguori et al, 2010a). O Quadro 2 apresenta os *primers* e o tamanho dos fragmentos que discriminaram as diferentes espécies.

As cepas que apresentaram um perfil de amplificação diferente do padrão foram semeadas por esgotamento em meio cromogênico para verificar a possibilidade de contaminação.

4.3 Análise de custos

Os custos dos métodos fenotípicos e molecular foram analisados considerando-se os valores atuais e específicos de reagente e/ou meios de cultura gastos para cada prova realizada. Não foram contabilizados os gastos gerais com equipamentos e equipe técnica.

4.4 Análise das horas requeridas

O período em horas foi avaliado para cada teste (fenotípico e molecular) a partir de uma amostra, não considerado o período de semeadura e isolamento prévio.

Quadro 2 - *Primers* usados na PCR *multiplex* e seus fragmentos gerados de acordo com as espécies de *Candida*

Produtos da PCR <i>multiplex</i>								
<i>Primers</i>								
Micro-organismos	ITS1	ITS1F	ITS1K	ITS2	ITS2D	CA3	CA4	Tamanho dos fragmentos
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	+	+	-	-	482-483/ 462-463 pb
<i>C guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	-	-	248-228 pb
<i>C parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	-	-	229-209 pb
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+	+	-	-	218-199 pb
<i>C. albicans</i>	+	-	-	+	+	+	+	218-219/198-199/110pb
<i>C. krusei</i>	+	-	-	+	+	-	-	182-166 pb
<i>C. dubliniensis</i>	+	-	-	-	+	-	-	198 pb

(+): anelamento do primer (-): não ocorre anelamento pb: pares de base (Liguori et al., 2010a)

5 RESULTADOS

Um total de 104 amostras do gênero *Candida* previamente identificadas pelo método fenotípico (API 20 C AUX) foram genotipicamente identificadas por meio da PCR *multiplex*.

Os resultados da PCR *multiplex* demonstraram que das 104 cepas identificadas somente 15 (14,4%) estavam em discordância com o método fenotípico, dentre elas, dez amostras de *C. albicans*, duas *C. glabrata*, uma *C. parapsilosis* e duas *C. tropicalis*. As cepas de *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* previamente identificadas pelo API estavam de acordo com a PCR *multiplex*. A Tabela 1 mostra as espécies identificadas e a porcentagem de concordância entre os métodos fenotípicos e PCR.

Tabela 1 - Espécies identificadas e a porcentagem de concordância entre os métodos

Espécies	Identificação fenotípica (API)	Identificação por PCR <i>multiplex</i>	% de acordo de identificação
<i>C. albicans</i>	62	52	84%
<i>C. glabrata</i>	22	20	90%
<i>C. parapsilosis</i>	5	4	80%
<i>C. tropicalis</i>	6	4	66,6%
<i>C. dubliniensis</i>	5	5	100%
<i>C. krusei</i>	3	3	100%
<i>C. guilliermondii</i>	1	1	100%

Todas as amostras em discordância com o API foram semeadas em meio cromogênico para *Candida* para verificar se as amostras estavam contaminadas. As amostras que apresentaram

fragmentos amplificados para *C. albicans* e *C. glabrata* em uma mesma reação de amplificação, apresentaram colônias verdes e cremes no meio seletivo, como pode-se observar na Figura 1. Após crescimento neste meio, as amostras foram isoladas e novamente identificadas pela PCR *multiplex* e os resultados são demonstrados na Tabela 2.



Figura 1 - Colônias semeadas em meio cromogênico para *Candida* das amostras que apresentaram fragmentos amplificados para *C. albicans* e *C. glabrata* em uma mesma reação de amplificação

Tabela 2 - Amostras identificadas fenotipicamente em discordância com o método genotípico

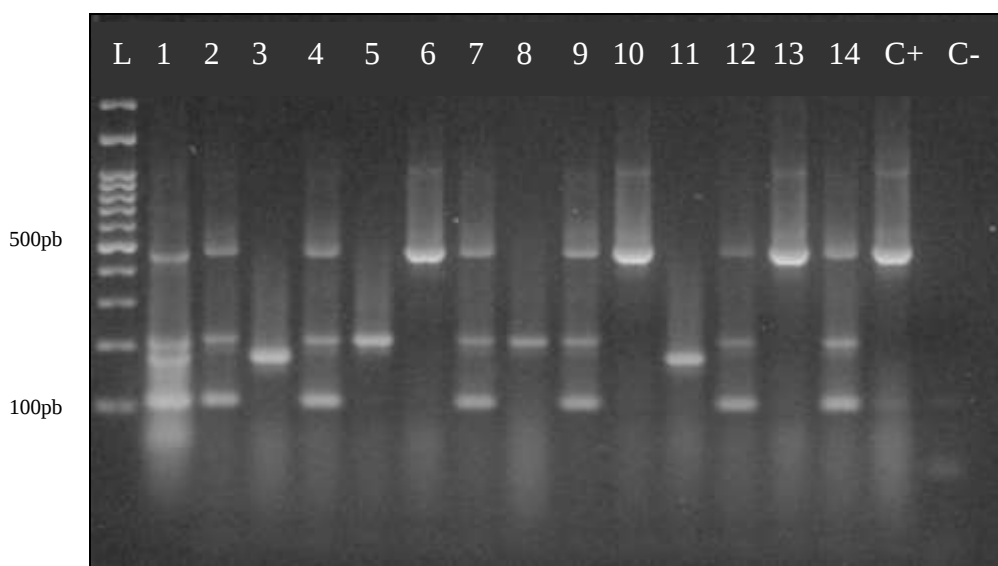
Identificação fenotípica (API)	Identificação PCR <i>multiplex</i>
<i>C. albicans</i> (1-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (15-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (100-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (104-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (110-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (123-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (152-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (140-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (31-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. albicans</i> (118-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. glabrata</i> (49)	<i>C. glabrata</i> (480 pb) + <i>C. krusei</i> (182 pb)
<i>C. glabrata</i> (14-S)	<i>C. krusei</i> (182 pb)
<i>C. parapsilosis</i> (63)	<i>C. krusei</i> (182 pb)
<i>C. tropicalis</i> (212-S/1)	<i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. tropicalis</i> (212-S/2)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)
<i>C. tropicalis</i> (140-S)	<i>C. albicans</i> (110-210 pb) + <i>C. glabrata</i> (480 pb)

Dez amostras de *C. albicans* em discordância com o método fenotípico apresentaram fragmentos amplificados para *C. albicans* e *C. glabrata*, apresentando em gel de agarose três fragmentos de amplificação com aproximadamente 110 pb, 210 pb e 480 pb, como pode-se observar as amostras amplificadas na Figura 2.

Duas amostras identificadas fenotipicamente como *C. tropicalis* apresentaram discordância no método genotípico, sendo uma amostra identificada pela PCR *multiplex* contendo fragmentos amplificados para *C. albicans* e *C. glabrata*, respectivamente (110-210 pb e 480 pb) e a outra amostra apresentou duas colônias diferentes no meio de cultura cromogênico, em uma delas a PCR *multiplex* apresentou fragmentos amplificados para *C. glabrata* (480 pb) e a outra fragmentos para *C. albicans* e *C. glabrata* (110-210 pb e 480 pb), como mostraram as colunas 6 e 7 da Figura 2.

Uma amostra fenotipicamente identificada como *C. parapsilosis*, foi identificada pela PCR *multiplex* sendo *C. krusei*, contendo fragmentos amplificados de 182 pb, indicado pela coluna 11 da Figura 2. A Figura 3 (A) mostra as colônias características de *C. krusei*, confirmando o resultado da PCR *multiplex*.

Duas amostras identificadas pelo API como *C. glabrata* apresentaram discordância, sendo uma delas identificada genotipicamente como *C. krusei* (coluna 3 da Figura 2). A Figura 3 (B) mostra as colônias características de *C. krusei*, confirmando o resultado da PCR *multiplex*. A outra amostra fenotipicamente identificada como *C. glabrata* apresentou fragmentos amplificados de *C. glabrata* (480 pb) e de *C. krusei* (182pb).



(L=Ladder de 100 pares de base; Coluna 1: Sete espécies de *Candida*; Colunas 2, 4, 9, 12 e 14= amostras de *C. albicans* em discordância, com 3 fragmentos amplificados: 110-210 pb e 480 pb, Coluna 3= *C. glabrata* com fragmentos para *C. krusei* (182 pb), Coluna 5 e 8= *C. tropicalis*, Coluna 6= *C. tropicalis* com fragmentos para *C. glabrata*; Coluna 7= *C. tropicalis* com 3 fragmentos amplificados (110-210 pb e 480 pb); Coluna 10= *C. glabrata*; Coluna 11= *C. glabrata* com fragmentos amplificados para *C. krusei* (182 pb), Coluna 13= *C. glabrata*; Controle positivo= C+ (*C. glabrata*) e Controle negativo= C-).

Figura 2 - Gel de agarose de amostras em discordância com o API



Figura 3 - A) Amostra identificada pelo API como *C. parapsilosis*. Semeada em meio cromogênico as colônias cresceram com características de *C. krusei*, confirmando o resultado da PCR *multiplex*; B) Amostra identificada pelo API como *C. glabrata*. Semeada em meio cromogênico as colônias cresceram com características de *C. krusei*, confirmando o resultado da PCR *multiplex*.

Os custos das técnicas fenotípicas que foram utilizadas na etapa prévia e os custos da PCR *multiplex* foram comparados e podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Custo por amostras das técnicas fenotípicas e PCR *multiplex*

Testes	Custo por amostra
Tubo germinativo	R\$0,70
Microcultivo	R\$0,20
Cultivo em meio cromogênico	R\$2,65
API 20 C AUX	R\$78,60
PCR	R\$8,10

O período requerido em horas para cada teste fenotípico foi estimado e apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Período estimado para as provas fenotípicas e PCR

Testes	Período estimado para cada prova
Tubo germinativo	4 h
Microcultivo	72 h
Cultivo em meio cromogênico	24 h
API 20 C AUX	72 h
PCR	8 h

6 DISCUSSÃO

O sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França) é um teste que verifica a habilidade do isolado em utilizar determinado substrato como única fonte de energia e permite a identificação de diferentes espécies. O perfil da reação de assimilação fornece um código numérico, e por comparação deste perfil com uma base de dados, o isolado é identificado em gênero e espécie. Quando comparado à identificação fenotípica clássica (formação de tubo germinativo, produção de clamidoconídeos em microcultivo, fermentação e assimilação de carboidratos) é considerado de fácil execução, além de oferecer o resultado em menor tempo (72 h) (Williams, Lewis, 2000; Silva, Candido, 2005). Contudo, para a correta identificação, algumas vezes é necessária a realização de uma prova complementar, em que se verifica a formação de hifa/pseudohifa após crescimento do isolado em ágar arroz. No presente trabalho, a PCR *multiplex* comprovou a maioria das amostras identificadas, apresentando pouca discordância entre os métodos.

Em relação aos custos para a realização das técnicas de identificação, comparando os métodos fenotípicos com a PCR *multiplex*, observamos grande diferença entre os valores dos dois métodos. Todos os procedimentos prévios de identificação fenotípica, como microcultivo, meios cromogênicos, formação de tubo germinativo e posterior confirmação pelo API geram maior custo por amostra, perfazendo cerca de R\$82,00. A PCR *multiplex* foi mais econômica, tendo um gasto de aproximadamente R\$8,00 por amostra, cerca de 10 vezes mais barata que os testes clássicos e bioquímicos. A técnica tem se tornado economicamente acessível, apresentando uma redução de valores no decorrer dos anos. Contudo, cabe ressaltar, que a avaliação dos custos

foi baseada no preço comercial dos reagentes comprados no Brasil no ano de 2014, sem considerar os investimentos financeiros em equipamentos.

Considerando o tempo gasto para as identificações, a técnica molecular leva aproximadamente 8 h, já a identificação por métodos clássicos e bioquímicos podem exigir até 72 h. Os métodos fenotípicos de identificação também são consideradas técnicas mais laboriosas, sendo necessário um treinamento técnico para correta padronização do inóculo e interpretação visual dos resultados.

De acordo com Liguori et al. (2007) PCR *multiplex* identificou corretamente todas as 78 amostras, incluindo 5 culturas de lavados bucais de pacientes com colonização de espécies mistas (identificadas como contendo apenas espécies de *Candida* pelo método fenotípico) e identificou uma amostra positiva para *C. albicans*, identificada como negativa nos testes fenotípicos de rotina. Dentre as cinco amostras que apresentaram culturas mistas na PCR *multiplex* (*C. albicans* + *C. glabrata*; *C. glabrata* + *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* + *C. guilliermondii*) o método fenotípico identificou como *C. albicans*. Das quatro amostras identificadas fenotipicamente como *C. tropicalis*, três foram identificadas pela PCR *multiplex* como *C. albicans* e uma como *C. guilliermondii*. Uma amostra de *C. parapsilosis* foi identificada pela PCR *multiplex* como *C. albicans*. Três amostras identificadas fenotipicamente como *C. glabrata*, na PCR *multiplex* foram identificadas como *C. albicans*. Cinco amostras *C. albicans* apresentaram resultados discordante, sendo uma identificada pela PCR *multiplex* como *C. parapsilosis*, uma como *C. glabrata*, uma como *C. kefyr*, e duas como *C. dubliniensis*. Todas as soluções de enxágue bucal que apresentaram discordância entre os métodos fenotípicos e a PCR *multiplex* foram cultivados em CHROMágar para *Candida* que confirmou a identificação da PCR *multiplex*, exceto para *C. dubliniensis*, que neste meio seletivo ainda apresentou coloração característica de *C. albicans*.

Todas as 5 cepas identificadas como *C. dubliniensis* pelo sistema API 20 C AUX no presente estudo foram confirmadas no teste molecular corroborando os bons resultados de diferenciação entre *C. albicans* de *C. dubliniensis* pelo sistema API 20 C AUX descritos por Silva e Candido (2005), porém não observados por Liguori et al. (2007). Esta incongruência de resultados reforça a importância da identificação molecular, capaz de identificar precisamente cepas com aspectos fenotípicos semelhantes, mas que podem apresentar características de infecção ou de resposta a tratamentos bastante diferentes.

Liguori et al. (2009) avaliaram a PCR *multiplex* sobre soluções de lavados bucais de 95 indivíduos com suspeita de candidose oral e os resultados foram comparados com sete sistemas de identificação fenotípicas comumente usados. Os kits utilizados foram: API 20C AUX, Vitek 2 cartão ID-YBC, Rapid Yeast Identification Panel, CHROMágar *Candida*, Chromogenic *Candida* Ágar, *Candida* Identification Ágar e CandiSelect 4. Neste estudo, das 95 amostras analisadas dos indivíduos com suspeitas de candidose oral, 85,3% (81 amostras) deram resultados positivos para leveduras e 14,7% das amostras foram negativas para a detecção destes micro-organismos, o que enfatiza a importância de um diagnóstico laboratorial preciso para esta doença. Dentre as 81 amostras identificadas pela PCR *multiplex*, 68 eram *C. albicans*, 8 *C. glabrata*, 2 *C. tropicalis*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. kefyr* e 1 *C. famata*. Foram encontradas microbiotas mistas em cinco soluções de enxágue bucal (6,2%). Em particular, três amostras de soluções de enxágues bucais foram positivas para *C. albicans* e *C. glabrata*, uma para *C. guilliermondii* e *C. glabrata*, e uma para *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Segundo estes autores, as técnicas convencionais exigem vários dias para a conclusão, já a PCR *multiplex* surgiu como uma alternativa válida para os métodos tradicionais, diminuindo significativamente o tempo de identificação, em particular, casos de crescimento fúngico lento ou de difícil cultivo.

No presente trabalho, também observamos amostras que apresentaram mais de um fragmento amplificado. O fato de algumas placas não apresentarem crescimento de colônias diferentes que indicaria uma amostra mista já foi relatado em outros estudos, como o de Liguori et al. (2007) e Back-Brito et al. (2012). Como a técnica molecular é mais sensível, duas hipóteses podem ser inferidas a este resultado, problemas de crescimento para as cepas em menor número no meio cromogênico utilizado ou células não viáveis que impedem as técnicas baseadas em cultivo, mas não às moleculares. A possibilidade de contaminação durante a extração ou amplificação foi descartada, pois utilizamos controles negativos em todos os processos, os pipetadores automáticos são de uso restrito as técnicas moleculares e foram utilizadas alíquotas pequenas dos reagentes para uso único. Para confirmar a presença destas amostras mistas indicadas pela PCR *multiplex*, as amostras foram enviadas para sequenciamento para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Amazônia em colaboração com o Professor Dr. Adolfo José da Mota.

As amostras 14-S e 63 identificadas pelo API em *C. glabrata* e *C. parapsilosis* respectivamente e que obtiveram a identificação em *C. krusei* pela PCR *multiplex* foram confirmadas como *C. krusei* quando semeadas em meio cromogênico. Uma possibilidade para tal fato seria de erro na especificação dos tubos plásticos em que as amostras foram armazenadas.

Liguori et al. (2007) ressaltaram que a utilização da PCR *multiplex* para diagnósticos clínicos microbiológicos pode ser realizada diretamente da amostra clínica, eliminando o tempo para cultura e reduzindo os custos. Contudo, sem o isolamento do micro-organismo, as técnicas moleculares apresentam limitações, como: incapacidade de diferenciar células vivas de mortas, a impossibilidade de realizar provas bioquímicas ou de se avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.

7 CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que o método de identificação por PCR *multiplex* é um método preciso, fácil, aplicável, econômico e requer um tempo menor para a identificação destas espécies, quando comparado com os métodos fenotípicos. É uma técnica adequada para a rotina de um laboratório de microbiologia clínica, podendo obter diagnósticos rápidos e precisos para o tratamento correto de pacientes com infecções fúngicas.

8 REFERÊNCIAS*

Back-Brito GN, El Achkar VNR, Garbim AL, Romeiro RL, Jorge AOC, Balducci I, et al. HAART therapy does not reduce the proteinase and phospholipase secretion by oral *Candida albicans* isolated from HIV-positive patients. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011;70(2):101-5.

Back-Brito GN, da Mota AJ, de Souza Bernardes LÂ, Takamune SS, Prado Ede F, Cordás TA, et al. Effects of eating disorders on oral fungal diversity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012;113(4):512-7.

Demitto FO, Amaral RCR, Biasi RP, Guilhermetti E, Svidzinski TIE, Baeza LC. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. in vitro among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. J Bras Patol Med Lab. 2012;48(5):315-21.

Eeles RA, Warren W, Stamps A. The PCR revolution. Eur J Cancer. 1992;28(1):289-93.

Ferreira AV, Prado CG, Carvalho RR, Dias KST, Dias ALT. *Candida albicans* and non-*C. albicans* species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. Mycopathologia. 2013;175(34):265–72.

Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. J Bras Patol Med Lab. 2010;46(3):225-34.

Godoy JSR, Mendonça PSB, Nakamura SS, Yamada SS, Mesquita CS, Pieralisi N, et al. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. J Oral Pathol Med. 2013;42(3):229–34.

Hube B, Nagliak J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology. 2001;147(8):1997-2005.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Santos; 2006.

Jorge AOC. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman MAHJ, Vilela SFG, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. BMC Microbiology. 2011;11:247.

Koneman EW, Winn JW, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2008.

Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. Cell Microbiol. 2005;7(11):1546-54.

Lass-Flörl C . The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 2009;52(3):197-205.

Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. J Clin Pathol. 2007;60(9):1035-9.

Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Gallé F, Signoriello G, Colella G, et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and *multiplex* polymerase chain reaction for species identification. Oral Microbiol Immunol. 2009;24(1):76–8.

Liguori G, Gallé F, Lucariello A, Di Onofrio V, Albano L, Mazzarella G, et al. Comparison between *multiplex* PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. Identification. New Microbiol. 2010a;33(1):63-7.

Liguori G, Di Onofrio V, Galle F, Lucariello A, Albano L, Catania MR, et al. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a *multiplex* PCR. J Prev Med Hyg. 2010b;51(3):121-4.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. DNA recombinante e genômico. In: Biologia celular e molecular. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.

Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Vesconi P, Porter SR. In vitro evaluation of virulence attributes of *Candida* spp. Isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(3):183-9.

Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15(4):314-9.

Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol*. 2013;51(6):657-63.

Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Díaz-Jiménez DF, López-Romero E, Zinker S, et al. Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for n-glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryotic Cell*. 2007;6(12):2184-93.

Naglik J, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Molec Biol Rev*. 2003;67(3):400-28.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004;6(10):915-26.

Nikawa H, Egusa H, Makihiro S, Okamoto T, Kurihara H, Shiba H, et al. An *in vitro* evaluation of the adhesion of *Candida* species to oral and lung tissue cells. *Mycoses*. 2006;49:14-7.

Pannanusorn S, Fernandez V, Romling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*. 2013;56(3):264-72.

Patel PK, Erlandsen JE, Kirkpatrick WR, Berg DK, Westbrook SD, Loudon C, et al. The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with HIV/AIDS in the era of antiretroviral therapy. *AIDS Res Treat*. 2012.doi:262471.

Ribeiro PM, Querido RSM, Back-Brito GN, Mota AJ, Koga-Ito CY, Jorge AO. Research on *Candida dubliniensis* in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011a;71(1):81-6.

Ribeiro PM, Bacal F, Koga-Ito CY, Junqueira JC, Jorge AO. Presence of *Candida* spp. in the oral cavity of heart transplantation patients. J Appl Oral Sci. 2011b;19(1):6-10.

Romeo O, Scordino F, Pernice I, Passo C, Criseo G. A *multiplex* PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. J Microbiol Methods. 2009;79(1):117–20.

Santos ALS, Soares RMA. *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43(1):13–20.

Shin JH, Ranken R, Sefers SE, Lovari R, Quinn CD, Meng S, et al. Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013;51(1):136-41.

Silva JO, Candido RC. Evaluation of the API 20C AUX system for the identification of clinically important yeasts. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(3):261-3.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev 2012;36(2):288-305.

Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, et al. Clinical utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. Eur J Haematol. 2013;90(4):331-9.

Swinne D, Watelle M, Van der Flaes M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole (UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-*albicans* bloodstream yeast isolates. Mycoses. 2004;47(5-6):177–83.

Villar CC, Kashleva H, Ongari-Bagtzoglou A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(4):262-9.

Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Dis. 2000;6(1):3-11.

Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J. Microbiol Immunol Infect. 2003;36(4):2223-8.