



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Candida albicans* E *Candida dubliniensis*

Laura Wiebusch¹; Luana Mireli Carbonera Rodrigues²; Danielly Beraldo dos Santos Silva³; Adriana Araújo de Almeida⁴; Kelly Mari Pires de Oliveira⁵

UFGD/FCA – Caixa Postal 533, 79.804-970 – Dourados – MS, E-mail: laurawiebusch@hotmail.com.

¹ Acadêmica do curso de Biotecnologia pela UFGD. ² Mestranda do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela UFGD. ³ Mestranda do programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção pela UFGD. ⁴ Doutoranda do programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste pela UFMS. ⁵ Docente da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD.

RESUMO

Espécies de *Candida* são leveduras oportunistas que podem causar infecções e devido as características fenotípicas de *Candida albicans* serem muito semelhantes da *Candida dubliniensis*, torna-se necessário realizar testes que diferenciem essas espécies. Nesse sentido, o objetivo foi comparar os métodos de identificação fenotípicos e genotípicos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. As amostras foram isoladas em cultura com Chromagar e a diferenciação das colônias analisadas no caldo Sabouraud hipertônico e ágar tabaco. A confirmação dos resultados foi dada realizando a PCR Duplex. Os métodos realizados confirmaram a identificação de *C. albicans* para todos os isolados utilizados no estudo e, com esses resultados mostram que os protocolos utilizados foram eficientes, uma vez que o teste genotípico confirmou os resultados dos testes fenotípicos.

Palavras-chave: PCR Duplex, imunocomprometidos, virulência.

INTRODUÇÃO

Candida albicans e outras espécies de *Candida* são exemplos de fungos oportunistas que podem causar infecções (PFALLER, 1996). Este fungo patogênico é capaz de infectar a pele e mucosas de pacientes imunocomprometidos. A virulência da

C. albicans esta ligada a formação de hifas, que se adapta e se adere nas superfícies epiteliais durante o contato com células do hospedeiro.

Outra espécie conhecida é a *C. dubliniensis*. Esta levedura tem sido detectada em várias amostras clínicas, mas principalmente a partir de grupos de risco específicos, tais como indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). (SULLIVAN *et al.*, 1997; MEIS *et al.*, 1999). Esta espécie está associada com infecções superficiais e sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos (SULLIVAN *et al.*, 1998) e apresentam várias propriedades, tais como morfológicas, fenotípicas, bioquímicas e características de virulência que se assemelham aos de *C. albicans*, dificultando assim a identificação da mesma (SULLIVAN *et al.*, 1999).

Alguns métodos fenotípicos têm sido descritos para distinguir as duas espécies por apresentarem alta reprodutibilidade e baixo custo, é o caso do caldo sabouraud hipertônico (ALVES *et al.*, 2002) e o meio de cultura ágar tabaco (KHAN *et al.*, 2004). A diferenciação ocorre, pois em caldo Sabouraud hipertônico a *C. dubliniensis* apresenta nenhum crescimento e em ágar tabaco os seus aspectos morfológicos são diferentes das espécies de *C. albicans*. No entanto, o método mais preciso para a identificação de *C. dubliniensis*, diferenciando-o de *C. albicans*, é baseado em PCR, sendo este muito utilizado em laboratórios devido sua alta velocidade de identificação e precisão (SELVARANGAN *et al.*, 2002). Diante disto, o objetivo foi avaliar a diferenciação fenotípica e genotípica entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada juntamente com o Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados. As 23 cepas de *Candida* utilizadas no estudo foram isoladas e identificadas presuntivamente como *C. albicans* pelo meio cromogênio CHROMagar Candida® e encaminhadas para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foram armazenadas em criotubos com miçangas em caldo Sabouraud Dextrose + 20% glicerol em -70°C.

Diferenciação fenotípica das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Caldo Sabouraud hipertônico

Foram realizados o teste de crescimento no caldo Sabouraud hipertônico conforme descrito por ALVES (2002), o qual os isolados foram suspensos em tubos que continham caldo Sabouraud suplementado com NaCl. As culturas foram visualmente examinadas para detecção do crescimento dos fungos, que deixaria o meio turvo, em intervalos de 24 horas. A ausência de colônias no tubo de ensaio após 96 horas de incubação determinou que o isolado era *C. dubliniensis* e o crescimento determinou *C. albicans*, pois apenas esta é capaz de crescer em meio contendo NaCl.

Ágar tabaco

A técnica do ágar Tabaco foi realizada conforme descrito por KHAN (2004). Após a inoculação dos isolados no ágar tabaco, as placas de cultura foram incubadas a 28° C e as características foram observadas diariamente durante 96 horas. A diferenciação das espécies foi analisada conforme a morfologia e coloração das colônias.

Identificação Molecular das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Cultivo dos fungos e extração do DNA

Os isolados foram repicados para ágar Sabouraud por 48h a 35°C. Após, foram transferidas asépticamente, 3 colônias para um tubo falcon contendo 5 mL de caldo sabouraud dextrose, os mesmos foram colocados no shaker a uma rotação de 50 rpm à temperatura ambiente por 24h.

Os tubos com as leveduras com água milliQ foram centrifugados e ressuspendidos em tampão PBS, após foram transferidas para microtubos e β -Mercaptoetanol e tampão de extração [3 g de CTAB (3%); 5 g PVP (5%); 18,68 g de NaCl (2N); 10mL de Tris-HCl (100mM); 2 mL de EDTA (25 mM e pH 8)], após os microtubos foram incubados em banho-maria à 60° C por 1h. Posteriormente foram adicionados Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1) e agitou-se, em seguida os microtubos foram centrifugados. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo. Adicionou-se Acetato de Sódio e álcool absoluto [25 μ L de Acetato de Sódio (3M e pH 5,2); 625 μ L de álcool absoluto] e armazenado no freezer por 10 min.

Os microtubos foram retirados do freezer e centrifugados, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se etanol 70% gelado e homogeneizou-se por inversão. As amostras foram submetidas novamente à centrifugação eo sobrenadante foi descartado.

Após esta etapa, os microtubos foram invertidos para a secagem do sedimento sobre papel absorvente por 10 min. Após a secagem, o DNA foi ressuspendido em TE pH 8,7 [10mM Tris - HCl (1M) pH 7,61 e 1mM EDTA (0,1 M)] com RNase (Promega®) e incubados em banho-maria (37° C) por 60 min sendo posteriormente, armazenados a – 20°C. A pureza e concentração do DNA foram determinadas de densidade óptica em nanofotometro.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR-Duplex)

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador. As soluções de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL, constituídos por 12,5 µL de PCR Master MIX, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles) e 2 µL DNA genômico (10 a 20 ng). Foi realizada PCR Duplex em que foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para identificação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* conforme descritos por AHMAD et al. (2012).

Para essa reação, o programa de amplificação do termociclador foi: desnaturação inicial de 95°C por 5', 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1', anelamento a 55°C por 30'' e extensão a 72°C por 1', seguido da extensão final a 72°C por 10'. Os produtos resultantes das amplificações por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. (AHMAD et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de pacientes hospitalizados no período de estudo foram obtidos 23 isolados de urocultura identificados presuntivamente como *C. albicans*. O cultivo destes isolados nos meios de cultura caldo Sabouraud Dextrose hipertônico e ágar tabaco confirmaram que todas as leveduras são da espécie *C. albicans*.

O crescimento no caldo é baseado na turbidez do meio, o que pode ser confundido com contaminação microbiana. Isso confere com os resultados descrito por SILVEIRA-GOMES *et al.* (2011), a qual no seu estudo, que utilizava a mesma técnica, oito dos seus isolados de *C. albicans* não apresentaram crescimento no caldo hipertônico, sugerindo que eles representavam *C. dubliniensis*, porém foram confirmados como *C. albicans* quando realizado outras técnicas de diferenciação das espécies. Para o teste no ágar tabaco todas as amostras apresentaram colônias lisas, coloração branca-creme, sem a presença de hifas ou clamidoconídeos sendo assim identificadas como *C. albicans*.

Os resultados do teste agar tabaco corroboram com KHAN *et al.*, (2004) uma vez que todas as amostras apresentaram as características esperadas de acordo com a metodologia. Diferente dos resultados observado por RIBEIRO (2011) onde 16 dos seus isolados, que utilizaram a mesma técnica, tiveram suas espécies sugestivas como *C. dubliniensis* e quando realizado a PCR todos os isolados foram identificados como *C. albicans*. Mesmo com esses resultados divergentes, eles os consideraram satisfatório para esta técnica, pois foi a que apresentou o menor número de identificações incorretas quando comparado com outros métodos de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* utilizadas no seu estudo, garantindo a eficiência de identificação do ágar tabaco em 92%.

Das amostras analisadas no teste genotípico foi possível observar que não houve formação de bandas a 325 pb, o que caracteriza *C. dubliniensis*, apenas em 100 pb, identificando assim a presença de *C. albicans* em todos os isolados. A eficácia deste teste é demonstrada nos estudos de AHMAD *et al* (2012) que também realizou a identificação genotípica utilizando a técnica duplex PCR e identificou com precisão todos os 55 *C. albicans* e 67 *C. dubliniensis* entre um total de 134 isolados de *Candida* spp., rendendo amplicons de 100 pb e 325 pb respectivamente, sendo que as demais espécies de *Candida* não foram amplificadas. Desta forma, o estudo utilizando a técnica duplex PCR garantiu 100% de sensibilidade e especificidade.

Conforme apresentado, os métodos realizados confirmaram a identificação de *C. albicans* para todos os isolados utilizados no estudo. Os testes elaborados para a identificação de *C. albicans* demandaram resultados positivos, funcionando como um guia para a diferenciação destas duas espécies. Portanto, conclui-se com este estudo que o uso do protocolo proposto foi eficiente, sendo que o teste genotípico confirma os resultados dos testes fenotípicos, contribuindo e auxiliando trabalhos futuros.

AGRADECIMENTOS

À FUNDECT-MS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S; KHAN, Z, ASADZADEH, M; THEYYATHEL, A; CHANDY, R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infectious Diseases* 2012, 12 : 230.

ALVES, S. H.; MILAN, E. P.; SANT'ANA, P. L.; OLIVEIRA, L. O.; SANTURIO, J. M.; COLOMBO, A. L. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 43, p. 85-86. 2002

KHAN, Z. U.; AHMAD, S.; MOKADDAS, E.; CHANDY, R. Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, p. 4796-4798. 2004

MEIS, J. F.; RUHNKE, M.; De PAUW, B. E.; ODDS, F. C.; SIEGERT, W.; VERWEIJ, P. E. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerging Infectious Diseases*. v. 5, p. 150-3. 1999.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: Emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases*. v. 22, n. 2, p. 89-94. 1996

RIBEIRO, P. M, *et al.* 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* v. 71, p. 81-86. 2011.

SELVARANGAN, R.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, p. 4308-4312. 2002.

SILVEIRA-GOMES, F; SARMENTO, D; ESPIRITO-SANTO, E; SOUZA, N; PINTO, T; MARQUES-DA-SILVA, S. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44(4):457-460, 2011.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Current Topics Medical Mycology*. v. 8, p. 15-25. 1997

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, p. 329-334. 1998.

SULLIVAN, D. J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEE, S.; PINJON, E.; McCARTAN, B. *et al.* *Candida dubliniensis*: An update. *Revista Iberoamericana de Micologia*. v. 16, p. 72-76. 1999.