

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans*

Autor(es): Júlio Cesar Sousa Prado¹; Maria Gleiciane de Queiroz Martins²; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar³; Antônia Nádia Brito dos Santos¹; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle⁴

¹Discentes de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, PPGCS, UFC; E-mail: cesarprado55@gmail.com,

²Docente/pesquisadora do Centro Universitário Inta – UNINTA; E-mail: gleiciane.martins@uninta.edu.br

³Pós-doutoranda, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas - UVA; E-mail: lidianelinhaires@yahoo.com.br

⁴Docente/pesquisadora, PPGCS, UFC. E-mail: raquelbios@yahoo.com.br.

Resumo: *Candida albicans* é uma levedura que causa infecções fúngicas, seu diagnóstico tradicional é feito por métodos fenotípicos, que são demorados e podem ser imprecisos. Este estudo avaliou a identificação molecular de 12 isolados clínicos de *C. albicans* por meio de PCR convencional com primers universais ITS. Os resultados mostraram que a identificação molecular foi eficaz na confirmação da identificação realizada de forma convencional. A identificação molecular foi mais rápida e precisa do que o método convencional, pois permitiu a identificação das cepas clínicas em apenas 24 horas. Os autores concluem que a identificação molecular é uma ferramenta promissora para a identificação de *C. albicans*.

Palavras-chave: PCR, Primers Universais, ITS1-ITS4, ITS3-ITS4.

1. INTRODUÇÃO

Candida spp. é um gênero de levedura que causa infecções fúngicas em todo o mundo (PAULA et al., 2021). No ambiente hospitalar, é responsável por 80% das infecções fúngicas, incluindo infecções da corrente sanguínea, no trato urinário e em incisões cirúrgicas, ainda podendo ser encontrada nas mucosas do trato respiratório e genital de animais e humanos, e fazendo parte da microbiota humana (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Já *Candida albicans* é uma espécie de levedura que faz parte do gênero *Candida* spp., onde o gênero é composto por mais de 200 espécies, mas *C. albicans* é a espécie mais comum e patogênica (ODDS, 1987). Esta levedura ainda se apresenta de forma comensal, ou seja, é um organismo que vive naturalmente no corpo humano, sem causar infecções. No entanto, em condições de imunossupressão, como em pacientes com câncer, HIV/AIDS, ou que fazem uso de antibióticos, esse fungo pode se multiplicar e causar infecções graves (WANG et al., 2019).

Sua detecção e identificação de forma correta é de extrema importância, pois a virulência dos isolados clínicos de *Candida* spp. diferem de acordo com a espécie (BASTOS et al., 2023). O diagnóstico das infecções ocasionadas por este tipo de levedura normalmente é realizado por exames laboratoriais que envolvem o método convencional de identificação de espécies de *Candida* spp., que é baseado em testes de assimilação e fermentação de açúcares, análise morfológica da colônia, uso de meios cromogênicos, painéis enzimáticos e sistemas automatizados (SIDRIM, ROCHA, 2004). A fim de minimizar as limitações da fenotipagem,

métodos de biologia molecular foram adaptados para serem utilizados na identificação de espécies de *Candida* spp. (CIRAK; KALKANCI; KUSTIMUR, 2003).

A identificação molecular de leveduras é feita por meio de regiões do DNA que são amplamente sequenciadas na ecologia molecular de fungos. Essa região reconhecida como ITS e IGS, são conservadas no aglomerado ribossômico dos fungos, mas pode variar de tamanho entre as espécies de *Candida* spp. (MORSCHHÄUSER, 2016). Devido ao seu maior grau de variação do que outras regiões do gene rDNA (para pequenas e grandes subunidades rRNA), a variação entre repetições individuais de rDNA pode ser observada nas regiões ITS e IGS (MORSCHHÄUSER, 2016). Assim, uma técnica de PCR baseia-se no uso de primers fúngicos universais para amplificação dessas regiões, seguido de análise de restrição, sequenciamento ou determinação do tamanho do fragmento amplificado (FUJITA, 2021).

Dessa forma, este estudo objetivou identificar diferentes isolados clínicos de *Candida albicans* por biologia molecular com primers universais ITS, no intuito de confirmar a identificação realizada de forma convencional (análise morfológica das colônias, uso de meios cromogênicos e por sistema automatizado Vitek®).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas utilizadas

Um total de 12 cepas foram utilizadas neste estudo, pertencentes a Micoteca do Laboratório de Microbiologia (LABMIC) da Universidade Estadual Vale do Acaraú, oriundas de pacientes internados em hospitais do Ceará, a Tabela 1 apresenta a origem das culturas primárias e o modo convencional de identificação das linhagens das leveduras. A cepa ATCC (90028) de *Candida albicans* foi utilizada neste estudo para fins comparativos.

Tabela 1. Origem das culturas primárias e modo de identificação de cepas clínicas de *Candida albicans*

CEPAS	ORIGEM DA CULTURA	MODO DE IDENTIFICAÇÃO
ATCC 90028	Sangue	-
LABMIC 0102	Hemocultura	CHROMagar/ VITEK®
LABMIC 0104	Aspirado Traqueal	CHROMagar/ VITEK®
LABMIC 0105	Sangue	CHROMagar/ VITEK®
LABMIC 0128	Cepa clínica (doente)	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0129	Cepa clínica (doente)	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0131	Microbiota oral indivíduo saudável	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0132	Microbiota oral indivíduo saudável	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0133	Indivíduos com HIV+	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0134	Indivíduos com HIV+	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0136	Indivíduos com HIV+	CHROMagar/ Microcultivo
LABMIC 0137	Indivíduos com HIV+	CHROMagar/ Microcultivo

Fonte: Autores, 2023.

2.2 Extração do DNA fúngico

As cepas foram isoladas e cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), por 24-48 horas a 37°C, e então se extraiu o material genético. As células foram recuperadas por centrifugação a 4500 xg por 2 minutos, e ressuspenso em 200 µL de Tampão 1 (2% Triton x 100; 1% de SDS; 10 mM Tris/HCl (pH 8); 100 mM NaCl). Em seguida, adicionou-se 200 µL

Fenol : Clorofórmio : Álcool isomílico (25:24:1) e adicionadas 3/5 beads (esferas de vidros). Após foi agitado por 4 min, e adicionado 200 µL do Tampão 2 (10 Mm Tris/ HCl (pH 8) e 1 Mm DE EDTA). As amostras foram centrifugadas (13.000 xg) por 5 min, e o DNA extraído do sobrenadante foi precipitado com a adição de etanol (1 mL). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 xg por 5 min, e o pellet foi ressuspense em 400 µL de tampão 2 10 Mm Tris/ HCl (pH 8) e 1 Mm DE EDTA). As amostras foram incubadas em banho-maria por 30min a 50°C para retirada do RNA, após centrifugada por 13.000 xg e deixada secar ao ar e ressuspense em 50 µL 2 (10 Mm Tris/ HCl (pH 8) e 1 Mm DE EDTA) (Ausubel et al., 2002).

O DNA fúngico foi quantificado em espectrofotômetro (Amersham Biosciences GeneQuant Pro), primeiramente foi utilizado 98 µL de água Milli-Q juntamente com 2 µL do tampão para calibrar o equipamento, após foram realizadas as quantificações seguindo as seguintes proporções de água Milli-Q para cada amostra de DNA (98 µL:2 µL). Para analisar a integridade do material genético, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e coradas com brometo de etídio, após reveladas em transiluminador (Enduro™ GDS Touch).

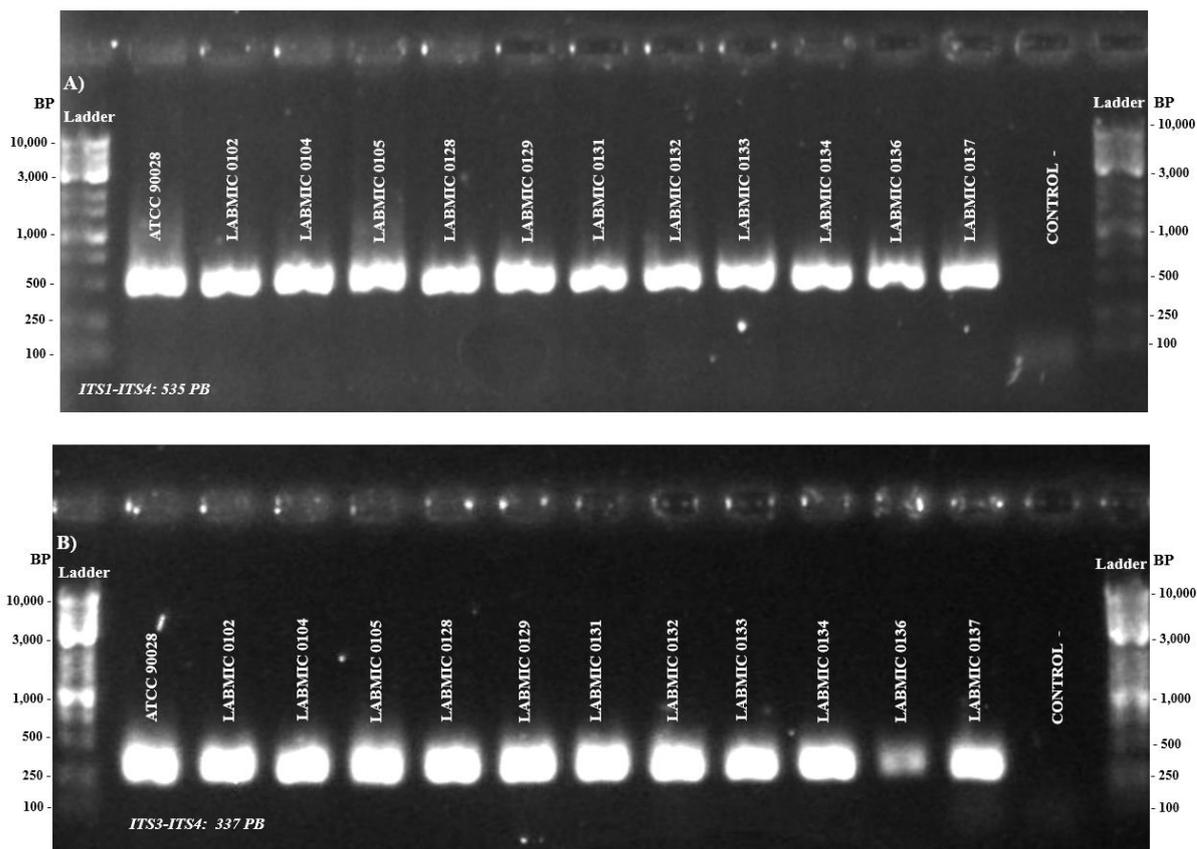
2.3 Identificação Molecular

O procedimento para realização da PCR foi seguido conforme método previamente descrito por Fujita *et al.*, 2001). Primers ITS1 (5_-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3_) e ITS3 (5_-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3_), e o ITS4 reverso (5_-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3_) foram usados para direcionar regiões conservadas no cluster de DNA ribossômico, 18S, 5.8S e 28S, respectivamente, sendo fornecidos pela Invitrogen (Carls-bad, CA). As amostras foram identificadas usando dois reações de PCR independentes: uma usando os primers ITS1-ITS4 e outra usando os primers ITS3-ITS4. O par de primers ITS1-ITS4 foi usado para amplificar a região intermediária 5.8S do rDNA e as regiões adjacentes ITS1 e ITS2, o par de ITS3-ITS4 primers foi usado para amplificar uma porção maior de 5.8S rDNA e a região adjacente a IST2.

A reação de PCR foi realizada em Termociclador MiniAmp Thermal Cyclers (ThermoFisher), para o preparo foram utilizando o DNA fúngico, Kit de reação de PCR 2x Class Five Master Mix (Class Five Enzymes) e os Pares de Primers (Forward-Reverse) de amplificação dos genes de identificação ITS1, ITS3 e ITS4. Cada reação foi estabelecida a partir do rendimento do DNA obtido, consistindo no volume restante de água ultrapura. Os parâmetros de amplificação dos genes foram definidos de acordo com o fabricante dos primers, consistindo em uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos consistindo em desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, e uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Para análise das bandas formadas foram utilizados gel agarose a 1% e tampão 1x TBE, além de marcador molecular de 1 Kb (KASVI) para definir o tamanho das bandas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de 12 isolados clínicos de *Candida albicans* foram confirmadas a identificação por PCR convencional, através dos primers universais de identificação ITS1-ITS4 e ITS3-ITS4, apresentando amplicons na faixa 535 BP para ITS1-ITS4, e 337 BP para ITS3-ITS4, respectivamente. A figura 1 expõe os produtos de PCR dos primers utilizados para confirmação da identificação.



Amplicons referentes aos genes de identificação: *ITS1-ITS4* (A); *ITS3-ITS4* (B). BP/PB: Pares de bases.

Figura 1. Produto de PCR dos primers de identificação de *Candida albicans* em gel agarose.

No presente estudo, a cepa padrão ATCC 90028 de *C. albicans* foi utilizada como referência para identificar a altura dos produtos dos pares de bases das cepas clínicas. A confirmação de que todos os produtos se apresentaram na mesma faixa, além do marcador molecular utilizado para identificar o intervalo apresentado pelos pares de bases (535 pb para *ITS1-ITS4*, e 337 pb para *ITS3-ITS4*), permitiu concluir que todas as cepas são de *C. albicans*. Os estudos de Basto et al., 2023 e Brito, 2008, também encontraram resultados semelhantes ao identificarem diferentes isolados clínicos de *C. albicans* pelos primer universais *ITS1-ITS4* e *ITS3-ITS4*.

É relevante relatar que a identificação deste tipo de levedura pelo método convencional é demorado, caro e trabalhoso, de modo que vários produtos e sistemas comerciais são requeridos para seu sucesso. Outro ponto que é importante ser mencionado, é o tempo para obtenção dos resultados de identificação, que é extremamente importante, uma vez que o diagnóstico clínico rápido e preciso direciona o tratamento com antifúngico adequado.

Neste estudo, a identificação molecular foi mais rápida quando comparado ao método convencional, além de um menor tempo para análise dos dados e alta sensibilidade quando comparado ao método convencional de identificação, Back-Brito afirma também em seus estudos um menor tempo para obtenção de resultados satisfatórios quanto à identificação molecular por PCR, apesar do uso de kits, painéis e equipamentos automatizados se apresentarem como prevalentes.

4 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a identificação molecular de diferentes isolados clínicos de *C. albicans* por meio de PCR convencional com primers universais ITS. Os resultados mostraram que a identificação molecular foi eficaz na confirmação da identificação realizada de forma convencional. A identificação molecular foi mais rápida e precisa do que o método convencional, pois permitiu a identificação das cepas clínicas em apenas 24 horas. O método convencional, por outro lado, pode levar até 7 dias para produzir resultados. Com isso, os resultados sugerem que a identificação molecular é uma ferramenta promissora para a identificação de *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

AUBERTINE, C. L. et al. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar Candida as a source medium with the new card. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 1, p. 227-228, 2006.

Back-Brito *et al.* (2009). PCR-AGE, métodos automatizados e manuais para identificar cepas de *Candida* de fontes veterinárias: uma abordagem comparativa. **Microbiologia veterinária**, 139(3-4), 318-322.

BASTOS, Rafael Carneiro et al. Molecular Diagnosis Compared to Conventional Diagnosis for Rapid Detection of Resistant Strains of Candida Spp. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 4, p. e14112441088-e14112441088, 2023.

CIRAK, Meltem Yalinay; KALKANCI, Ayse; KUSTIMUR, Semra. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1027-1032, 2003.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

FUJITA, Shin-ichi et al. PCR multiplex usando regiões espaçadoras transcritas internas 1 e 2 para rápida detecção e identificação de cepas de levedura. **Revista de microbiologia clínica**, v. 10, pág. 3617-3622, 2001.

MORSCHHÄUSER, J. (2016). O desenvolvimento de resistência ao fluconazol em *Candida albicans* - um exemplo de microevolução de um patógeno fúngico. **Journal of Microbiology**, 54(3), 192-201

ODDS, Frank C. *Candida* infections: an overview. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1987.

PAULA, Cristiane Coimbra et al. Colonização de gêneros fúngicos em hemoculturas positivas de pacientes hospitalizados. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 9952-9963, 2021.

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

WANG, Meizhu et al. Virulence and antifungal susceptibility of microsatellite genotypes of *Candida albicans* from superficial and deep locations. **Yeast**, v. 36, n. 5, p. 363-373, 2019.