

## ARTIGO

# Identificação molecular e fenotípica de leveduras de importância clínica para autenticação em biobanco de leveduras

*Molecular and phenotypic identification of clinical important yeasts for biobank authentication*

### Resumo

A candidíase invasiva continua sendo prevalente causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Nas últimas décadas, as tecnologias para identificação de leveduras (IdLev) têm avançado significativamente, com métodos bioquímicos automatizados e ensaios moleculares. A Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) tem se apresentado como uma alternativa promissora para a identificação na rotina de espécies de leveduras. O presente trabalho, teve como objetivo a comparação de metodologias moleculares e fenotípicas na IdLev. Foi selecionado o método de Castellani, para a manutenção e conservação dos microrganismos do Biobanco de Leveduras (BioBLev), tendo sido analisados 112 isolados, onde foi observado, dentre as espécies, as seguintes taxas de recuperação: *C. tropicalis* (27,7%), complexo *C. albicans* (21,6%), complexo *C. parapsilosis* (20,7%), complexo *C. glabrata* (16,2%), *C. krusei* (3,6%), *C. haemuloni* (1,8%). Dentre as espécies com o menor percentual de isolamento, foram encontradas: *C. dubliniensis*, *C. famata*, complexo *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. utilis* (0,9%) e outras espécies de leveduras (4,5%). Foi possível verificar o bom desempenho do MALDI-TOF MS frente aos métodos fenotípicos para a caracterização das leveduras assim como sua boa correlação com o PCR em tempo real. Por fim, foram elaborados os protocolos técnicos, formulários e um Compêndio de Métodos e de Boas Práticas em Coleção de Cultura de Leveduras. O presente estudo permitiu a recuperação de cepas de leveduras de interesse clínico para autenticação, através das metodologias fenotípicas e genotípicas e criação de um banco de microrganismos para atender às demandas de pesquisa do Instituto de Biologia do Exército.

**Palavras-chave:** Candidíase; Identificação de leveduras; MALDI-TOF MS; qPCR; Banco de leveduras.

### Eliane Olmo Pinheiro

Policlínica Piquet Carneiro, Faculdade de Ciências Médicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio De Janeiro (UERJ).

### Marcos Dornelas-Ribeiro

[dornelas-ribeiro@hotmail.com](mailto:dornelas-ribeiro@hotmail.com)

### Caleb Guedes Miranda dos Santos

### Tatiana Lúcia Santos Nogueira

### Virginia Sara Grancieri do Amaral

Divisão de Ensino e Pesquisa em Defesa Biológica, Instituto de Biologia do Exército (IBEx). Rua Francisco Manuel, 102, Benfica, Rio de Janeiro.

### Paulo Murillo Neufeld

Laboratório de Micologia, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Recebido em: dez. 2022

Aprovado em: dez. 2022

REVISTA BRASILEIRA DE SAÚDE MILITAR

<http://www.ebrevistas.eb.mil.br/HCE>



## Abstract

Invasive candidiasis remains a prevalent cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. This form of candidiasis is one of the most polymorphic aspects of systemic mycoses and, in many cases, constitutes a terminal finding. In recent decades, yeast identification technologies have advanced significantly, with automated biochemical methods and molecular assays. Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) has been presented as a promising alternative for yeast species identification routine. The present work aimed to compare molecular and phenotypic methodologies in the identification of yeast isolates. The Castellani method was selected for the maintenance and conservation of microorganisms in the Yeast Collection, of which 112 yeast isolates were isolated. The following recovery rates were observed among the species: *C. tropicalis* (27.7%), *C. albicans* complex (21.6%), *C. parapsilosis* complex (20.7%), *C. glabrata* complex (16.2%), *C. krusei* (3.6%), *C. haemulonii* (1.8%). Among the species with the lowest percentage of isolation, the following were found: *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii* complex, *C. pelliculosa*, *C. utilis* (0.9%) and other yeast species (4.5%). It was possible to verify the good performance of MALDI-TOF MS against phenotypic methods for the characterization of yeasts, as well as its good correlation with real-time PCR. Finally, technical protocols, forms and a Compendium of Methods and Good Practices in Yeast Culture Collection were prepared. The present study recovered yeast strains of clinical interest to be authenticated through phenotypic and genotypic methodologies and to create a bank of microorganisms at the Army Institute of Biology.

**Key-words:** Candidiasis, Yeast identification; MALDI-TOF MS; qPCR; Yeast banking.

## 1. Introdução

Nas últimas três décadas, a incidência de infecções sistêmicas apresentou significativo aumento, devido a fatores como Aids, transplantes de órgãos e medula óssea, uso de citostáticos e quimioterápicos, corticoterapia, antibioticoterapia, técnicas cirúrgicas invasivas e acesso vascular (DORNELAS-RIBEIRO et al., 2012; NEUFELD et al., 2015). Dentre os fungos, *Candida spp* é o microrganismo que mais causa infecções em pacientes imunocomprometidos.

A guarda e a manutenção de espécimes de microrganismos, sob a forma de coleções de cultura (ColCult) ou biobanco (BioB), é importante por diversos aspectos, como conservação e exploração da diversidade genética e metabólica. Por definição, ColCult de microrganismos podem ser consideradas como centros de conservação de recursos genéticos *ex-situ*, que tem como função principal, a aquisição, caracterização, manutenção e distribuição de microrganismos e células autênticas e reagentes biológicos certificados, as quais atuam também como provedores de serviços especializados e centros de informação. Existem diferentes tipos de ColCult, tais como coleções de trabalho, coleções institucionais e, principalmente, as coleções de serviço. A preservação e a manutenção de culturas de microrganismos devem ser realizadas de forma a garantir a sobrevivência, pureza e estabilidade morfológica e fisiológica do microrganismo, bem como suas características genéticas, durante períodos prolongados (CAVALCANTI, 2010).

O Brasil dispõe de diversas ColCult, a exemplo da Embrapa, do Instituto Adolfo Lutz, da Fundação Oswaldo Cruz, da Fundação Tropical de Pesquisas e



Tecnologia André Tosello, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, dentre outras (ABREU; TUTUNJI, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi construir um banco de leveduras, com autenticação da identificação das espécies utilizando diferentes metodologias, incluindo espectrometria de massas (MS) para IdLev de importância clínica.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Origem, cultura e isolamento das cepas

As leveduras estudadas foram isoladas de fluídos corporais de 83 pacientes durante os procedimentos diagnósticos de rotina no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Adventista Silvestre (LBM/HAS), no Rio de Janeiro, entre 2004 e 2017.

Os espécimes clínicos foram inoculados em garrafas contendo meio para sistema de hemocultura automatizado. Foram utilizados Myco/F (BD Becton Dickinson) e Bact/Alert® 3D (Biomerieux). As amostras positivas foram semeadas por esgotamento em meios enriquecidos (ágar sangue e chocolate) e diferenciais (MacConkey e ágar batata dextrose-BDA) para posterior IdLev no Laboratório NB2 do Instituto de Biologia do Exército (LNB2/IBEx). As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por período de no mínimo 48h.

As cepas de referência *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida albicans* (ATCC 24433), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram usadas neste trabalho.

### 2.2. Identificação das leveduras

Os isolados clínicos foram identificados por provas fisiológicas, incluindo provas bioquímicas (PBioq), prova da produção de tubo germinativo (PTG), prova da produção de clamidósporo (PCEsp) e teste cromogênico (TCro), além de análises moleculares, como espectrometria de massas (MS) e reação em cadeia de polimerase por tempo real (qPCR).

#### 2.2.1. Identificação por Provas Fisiológicas

##### 2.2.1.1. Teste de Pbioq

O isolamento das cepas, tanto no LBM/HAS, quanto no LNB2/IBEx foi realizado na plataforma automatizada Vitek® 2 Systems (Biomerieux), utilizando cartões YBC ou YST para IdLev. Os cartões foram inoculados de acordo com as instruções do fabricante e inseridos no equipamento para leitura e quantificação. A identificação foi considerada aceitável quando os percentuais



de probabilidade obtidos foram  $\geq$  a 85%, na ausência de solicitação de testes complementares pelo equipamento. O Vitek 2 realiza caracterização fenotípica, a nível de identificação bioquímica (MONTEIRO et al., 2016). Para isso, utiliza cartões com substratos bioquímicos liofilizados para a identificação taxonômica, tendo como base a assimilação de carboidratos e nitratos (NATH et al., 2017).

#### 2.2.1.2. Prova da PTG

Isolados de leveduras identificados no LBM/HAS como *C. albicans*, foram inoculados com 0,4 mL de soro humano e incubados por um período de 2 a 3 horas em estufa a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Em seguida, uma alíquota dessa suspensão foi transferida para uma lâmina e recoberta por lamínula. A formação de TGs foi verificada usando microscopia óptica, aumento de 40x Olympos BX 50 (NEUFELD, 1999). As cepas positivas foram catalogadas e os resultados correlacionados com a produção de CEsp.

#### 2.2.1.3. Prova da PCEsp

As culturas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar milho (Oxoid) com Tween 80 (Reagen) a 1%, seguindo três estrias paralelas. Em seguida, a superfície do meio de cultura foi coberta com lamínulas estéreis e as placas incubadas em estufa (Sterilifer) à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 48h a 96h. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e examinadas por microscopia ótica com aumento de 40x (NEUFELD, 1999). As cepas que apresentaram a formação de CEsp e também foram positivas no teste de PTG, forneceram uma identificação presuntiva de *C. albicans*.

#### 2.2.1.4. Teste Cromogênico

Os isolados foram cultivados em meio CHROMagar®-Candida, Plast Labor, seletivo e diferencial, para avaliar as características morfotintórias das cepas, após 48 h de incubação em estufa a  $35^{\circ}\text{C}$ . Neste meio, a inclusão de substratos cromogênicos produz colônias de diferentes cores, permitindo a identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (CAMPANHA et al., 2005). As colônias de *C. albicans* devem apresentar textura cremosa e coloração verde, enquanto as *C. tropicalis* tem textura mucóide e coloração azul-petróleo e *C. krusei* apresenta textura seca e coloração rosa (RIBEIRO et al., 2009).



## 2.2.2. Identificação por Análises Moleculares

### 2.2.2.1. MS por Tempo de Vôo (MALDI-TOF MS)

A técnica baseia-se na exposição de proteínas intracelulares e de membranas das leveduras após a ruptura da membrana celular. A análise proteica dos isolados foi realizada no equipamento Microflex LT (Bruker Daltonik, Biotyper), cuja metodologia se baseia na Dessorção/Ionização de Matriz Assistida por Laser (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI), seguido pela detecção do tempo de voo (Time of Flight - TOF). A relação m/z é usada para acessar o perfil proteico específico (ou MS) de cada levedura, semelhante a uma impressão digital, permitindo uma classificação taxonômica precisa (KASSIM et al., 2017).

As colônias isoladas foram apostas diretamente em poços na placa metálica de 96 poços, com auxílio de palitos de madeira estéreis, conforme descrito (LEE, et al., 2017). Em seguida, foi adicionado sobre as colônias 1,0µL de ácido fórmico a 85%. Após secagem à temperatura ambiente, foi adicionado 1,0µL da matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) dissolvida em acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 2,5%, com posterior secagem a temperatura ambiente. A placa foi introduzida no equipamento e submetida ao feixe de laser.

O perfil do espectro de cada amostra foi gerado a partir da intensidade dos sinais de cada proteína detectada em função da massa/carga (m/z) é comparado com o espectro presente no banco de dados do equipamento de forma automática, utilizando o software Bruker Biotyper 3.1. Cada espectro é específico de um microrganismo, permitindo sua identificação de forma rápida. As amostras foram analisadas em duplicata, no modo linear positivo, com frequência de 60 Hz e intervalo de massa entre 2 e 20 KDa. Cada espectro foi obtido a partir de 240 tiros, em passos de 40 tiros de diferentes posições da placa alvo e o log dos scores foi calculado. Score  $\geq 1,7$  indica identificação confiável a nível de espécie, enquanto, pontos de corte menores que 1,7 indicam identificação não confiável, requerendo a repetição da análise (LEE et al., 2017).

### 2.2.2.2. Análise por Qpcr

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite identificar espécies baseadas no DNA (NEJAD et al., 2020). Variações da técnica permitem que os produtos da PCR ou amplicons sejam quantificados a cada ciclo e em tempo real, através de corantes fluorescentes que se ligam a sua dupla fita (SEXTON et al., 2018).

Para extração do DNA das cepas isoladas, foram preparadas suspensões das colônias em 20 µL de tampão de lise (125 µL de SDS 10 %; 100 µL de NaOH 0,05 N; H<sub>2</sub>O qsp 5000 µL) e, em seguida, foram aquecidas a 94 °C por 5 min.



Posteriormente, foram adicionadas 180  $\mu$ L de água mili-Q estéril e as suspensões foram centrifugadas a 16.000 g por 5 min (DORNELAS, 2011). A mistura da PCR foi preparada utilizando 3 $\mu$ L do DNA extraído, 1 $\mu$ L (10 pmol) de primers senso (Fw) e antisenso (Rev) específicos para cada microrganismo e 5 $\mu$ L de mix (Luminaris Hi-Green qPCR Master Mix, ThermoScientific, MA, USA), totalizando um volume de 10 $\mu$ L. Abaixo seguem as sequências de nucleotídeos dos primers utilizados (Tabela 1).

**Tabela 1. Sequência de primers utilizado para cada levedura estudada no presente trabalho.**

Levedura	Orientação	Sequência	Referência	
<i>C. albicans</i>	Fw	ATGTGGCACGGCTTCTGCTG	Ogata <i>et al.</i> , 2015	
	Rev	TAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGG		
<i>C. glabrata</i>	Fw	TTCGTGTACTGGAATGCACC		
	Rev	ATAGAACCAAACGTCCTATTCC		
<i>C. krusei</i>	Fw	CTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACG		
	Rev	CGGTGTTGCGCCGTTCTGC		
<i>C. tropicalis</i>	Fw	ATTTTGTATGTTACTTCTTCG		
	Rev	TAGGCTGGCAGTATCGACGAAGG		
<i>C. parapsilosis</i>	Fw	ATTTTGTATGTTACTCTCTCG		
	Rev	TGCCAACATCCTAGGCCGAAGC		
<i>C. guilhiermondi</i>	Fw	GTCAAACCTTGGTCATTA		Neulfeld <i>et al.</i> , 2009
	Rev	TTGGCCTAGAGATAGGTTGG		

O protocolo de ciclagem foi realizado no termociclador em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems) da seguinte forma: 1 ciclo de 5min a 95°C, 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 60°C e 30s a 72°C e 1 ciclo de 7 min a 72°C. Ao término, a temperatura foi elevada gradativamente para definir a curva de dissociação ou curva de melting (CvDiss) e determinar a temperatura de melting (Tm).

### 2.3. Conservação e manutenção das leveduras

As cepas foram armazenadas e conservadas de acordo com o método de Castellani (CASTELLANI, 1939). Todas as cepas tiveram um fragmento do meio onde cresceram transferidas para tubos estéreis, contendo 5 mL de água destilada estéril, em duplicata. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente (24°C  $\pm$  2) e sob refrigeração entre 2°C e 8°C.



## 2.4. Análises estatísticas

O teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram usados para determinar a correlação entre metodologias. Valores estatisticamente significantes:  $p < 0.05$ . GraphPad Prism foi usado para a construção gráfica.

## 3. Resultados e Discussão

As cepas estudadas foram obtidas de 142 amostras clínicas de 83 pacientes. Essas amostras foram armazenadas por anos, e 30 cepas perderam sua viabilidade. Devido à riqueza de biodiversidade, a partir de 2008 elas foram reunidas e recuperadas através de subcultivos em ágar BDA para compor a coleção de leveduras do IBEx. De 142 amostras foram recuperadas 112 cepas de leveduras para o estudo proposto. As cepas foram isoladas a partir de amostra biológica humana, sendo 1 de líquido abdominal (0,9%), 1 de líquido pleural (0,9%), 1 de cateter (0,9%), 2 de doadores de sangue (1,8%) e 107 de sangue (9,5%). As amostras foram identificadas por Vitek 2 Systems, tanto no LBM/HAS de origem, quanto no LNB2/IBEx.

### 3.1. Identificação das leveduras baseado em características fenotípicas - PBioq e TCro

Os resultados de identificação estão listados na Tabela 1, onde constam as quantidades de cada cepa e suas respectivas porcentagens obtidas nas análises realizadas em ambos os laboratórios, bem como a porcentagem de concordância dos resultados. As cepas ATCC de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram usadas como referência, sendo identificadas corretamente pela mesma metodologia. Em ambos os laboratórios participantes deste estudo identificou 12 cepas de leveduras diferentes, das quais quatro cepas apresentaram 100% de concordância entre a primeira e segunda análise pelo Vitek 2, mesmo com amostragem pequena. De modo geral, os resultados foram consistentes, apresentando mais de 94% de concordância na IdLev mais comuns, como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A identificação realizada no NB2/IBEx demonstrou que as espécies de *Candida* mais prevalentes nas infecções sistêmicas foram *C. tropicalis* (27,9%), complexo *C. albicans* (21,6%), complexo *C. parapsilosis* (20,7%), complexo *C. glabrata* (16,2%), *C. krusei* (3,6%) e *C. haemuloni* (1,8%). Dentre as espécies com o menor percentual de isolamento, foi encontrado *C. dubliniensis*, *C. famata*, complexo *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. utilis* e outras espécies de leveduras.





Contudo, algumas discordâncias dos resultados foram observadas entre as análises para nove amostras, como por exemplo duas amostras de *C. famata* identificadas no LNB2/IBEx como *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, indicando baixa discriminação entre *C. famata/lusitaniae* (50%) pelo Vitek 2. Outros exemplos foram duas amostras de *C. guilliermondii* identificadas como *C. utilis* e *C. albicans*. Neste caso, 23 amostras de *C. albicans* haviam sido identificadas inicialmente, porém a amostra de líquido abdominal foi reclassificada, posteriormente, como *C. albicans* totalizando 24 amostras dessa espécie. Por fim, duas amostras antes identificadas como *C. krusei* foram reclassificadas como *C. glabrata* e *Issatchenkia orientalis* e uma amostra de *C. glabrata* passou a ser *C. famata*. Vale destacar que a identificação não foi consistente, dentro da mesma metodologia, para as amostras de *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. utilis*, embora relatos de identificação correta tenham sido observadas (VIJGEN et al., 2011; KUMAR et al., 2013).

**Tabela 2 - Identificação de leveduras através de provas bioquímicas, usando Vitek 2 Systems, realizado no LBM de origem e no LNB2 do IBEx.**

Levedura	LBM/HAS		Reanálise no NB2/IBEx		Concordância
	Quantidade	%	Quantidade	%	%
<i>C. albicans</i>	23	20,5	24	21,6	95,8
<i>C. dubliniensis</i>	1	0,9	0	0,0	0,0
<i>C. famata/lusitaniae</i>	2	1,8	1	0,9	50,0
<i>C. glabrata</i>	17	15,2	18	16,2	94,4
<i>C. guilliermondii</i>	3	2,7	1	0,9	33,3
<i>C. haemuloni</i>	2	1,8	2	1,8	100,0
<i>C. krusei</i>	6	5,4	4	3,6	66,7
<i>C. parapsilosis</i>	22	19,6	23	20,7	95,7
<i>C. pelliculosa</i>	1	0,9	1	0,9	100,0
<i>C. tropicalis</i>	30	26,8	31	27,9	96,8
<i>C. utilis</i>	0	0,0	1	0,9	0,0
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2	1,8	2	1,8	100,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	2,7	3	2,7	100,0
Total	112	100,0	111	100,0	

Observação: não foi possível identificar a *C. dubliniensis* no LBN2 por esta metodologia, por isso a quantidade total de reanálises foi 111 amostras.

O uso de cartões diferentes nas análises realizadas pelos laboratórios participantes deste estudo pode ser apontado como justificativa para as identificações discordantes entre si. O cartão YBC usado no LBM/HAS foi descontinuado, sendo substituído pelo cartão YST nas análises realizadas no LNB2/IBEx, o qual tem capacidade discriminatória superior (LOÍES, et al., 2006; MELHEM et al., 2013). É importante que os usuários de sistemas comerciais





estejam cientes dos resultados errôneos nos sistemas de identificação comerciais (MELETIADIS et al., 2011).

Conseqüentemente, a incapacidade de discriminar espécies dentro dos complexos *C. albicans/dublinskiensis/africana*, *C. glabrata/nivariensis/bracarensis*, e *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis* pode comprometer o manejo clínico e as análises epidemiológicas (POSTERARO et al., 2015). Segundo SANTOS et al. (2011), em casos de espécies raras, tecnologias mais precisas devem ser empregadas. A busca por metodologias de maior precisão deve ser priorizada nos laboratórios, tendo em vista que o gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em ambientes de saúde e constitui causa relevante de infecções sanguíneas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NEUFELD, 2009).

Com relação aos resultados dos TCro, constantes da Figura 1 e da Tabela 3, as características morfotintoriais das leveduras foram equivalentes às especificações do teste, para identificação precisa de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em contrapartida, as colônias de *C. krusei* apresentaram coloração bege com borda lilás, quando deveriam ser rosas claro a rosas pink e foscas, podendo desenvolver bordas esbranquiçadas, semelhantes ao que foi observado para *C. haemuloni* e *C. parapsilosis*, que também apresentaram coloração bege. A maior diferença entre estas espécies e a *C. krusei* está na textura da colônia. A *C. krusei* apresentou um aspecto de colônia mais seco, permitindo assim sua fácil evidênciação.

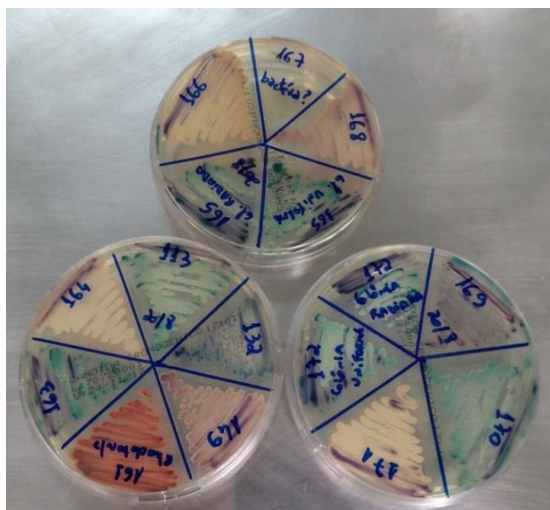


Figura 1. Identificação de leveduras através de características morfo-tintoriais usando meio CHROMagar®-Candida. As colônias isoladas apresentaram colorações variadas, dependendo da espécie. Colônias verdes indicam *C. albicans* enquanto colônias azuis são *C. tropicalis*.



O meio cromogênico identifica somente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Entretanto, o teste sugere possibilidades e recomenda testes adicionais para confirmação. São os casos da *C. dubliniensis* e *C. glabrata*. As colônias de *C. dubliniensis* apresentaram coloração verde claro indistinguíveis do complexo *C. albicans*, diferentes das tonalidades de verde mais escuro reportadas por Hospenthal e colaboradores (2006), a partir de isolados primários. Já o complexo *C. parapsilosis*, de cor marfim, também não permitiu sua distinção frente a outras espécies de *Candida* não-*albicans*. O complexo *C. glabrata* quando, eventualmente, produz cor rosa, pode ser diferenciado das demais espécies pelo tamanho das colônias, que são menores. Desta forma, é possível concluir que a autenticidade dos isolados de leveduras pelo meio cromogênico depende de testes adicionais, como tem sido descrito na literatura (ODDS; BARNARTS, 1994; HOSPENTHAL et al., 2006).

**Tabela 3. Características morfológicas das colônias de leveduras crescidas em meio cromogênico CHROMagar®-*Candida*.**

Espécie	Número de isolados	Coloração e textura colonial
<i>C. albicans</i>	23	Verde; colônia cremosa
<i>C. dubliniensis</i>	1	Verde claro
<i>C. famata</i>	2	Rosada com as bordas em lilás
<i>C. glabrata</i>	16	Rosa
<i>C. guilliermondii</i>	3	Lilás, tendendo um pouco para o rosa (2 isolados) / verde claro (1 isolado)
<i>C. haemuloni</i>	2	Bege claro
<i>C. krusei</i>	6	Bege com as bordas lilás; colônia ressecada
<i>C. parapsilosis</i>	22	Bege com as bordas lilás
<i>C. tropicalis</i>	31	Azul-petróleo; colônia mucóide
<i>C. pelliculosa</i>	1	Rosada tendendo para o lilás; colônia seca
<i>R. mucilaginosa</i>	2	Alaranjada, cor original do microrganismo
<i>S. cerevisiae</i>	3	Lilás escuro
<b>Total</b>	<b>112</b>	-

### 3.2. Identificação de leveduras através da caracterização estruturas fisiológicas e morfológicas

No presente estudo, a produção de TG e PCEsp foi considerada como testes preliminares. TG são prolongações para formar hifas que pode ser usado para diferenciar *C. albicans* pode ser diferenciada de outras espécies (DORNELAS-RIBEIRO, 2011). Por outro lado, quando submetidas a condições desfavoráveis de crescimento, as *C. albicans* formam estruturas vegetativas resistentes, os CEsp que a ajudam a sobreviver durante o estresse (LEE et al., 2017).



Todas as 112 amostras identificadas previamente no LBM/HAS foram submetidas às provas fisiológicas de produção de TG (Figura 2A) e CEsp (Figura 2B). As estruturas formadas estão indicadas por setas pretas. Resultado positivo para ambos os testes é presuntivo de *C. albicans*. A técnica foi capaz de identificar 24 cepas como *C. albicans* e uma cepa como *C. dubliniensis*. Estudos mostram que existe uma diferença de indução na produção de TG entre *C. albicans* e a *C. dubliniensis*, sendo essa indução mais lenta na espécie não-albicans (DAVIS, et al., 2005). No presente estudo, essa diferença não foi evidenciada com o período de incubação em que foram submetidas as amostras.

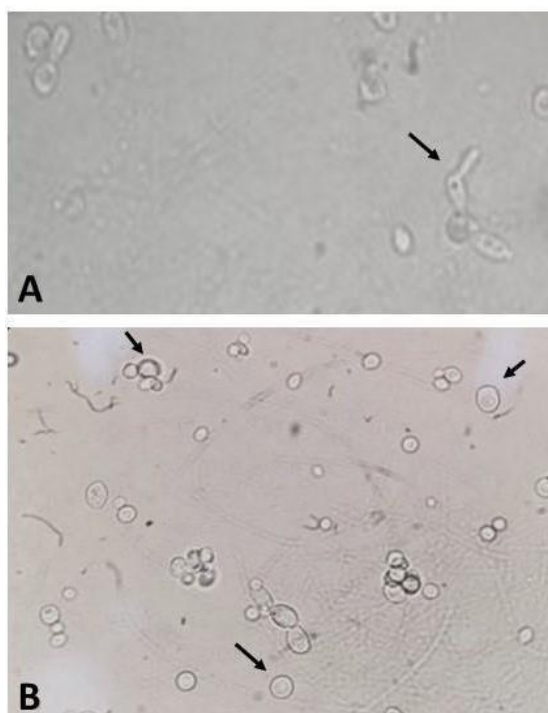


Figura 2. Estruturas reprodutivas e de resistência produzidas por *C. albicans*. Visualização por microscopia optica com aumento de 40x. A. Produção de TG indicado pela seta preta. B. Produção de CEsp indicado pela seta preta.

### 3.3. Identificação de leveduras por métodos moleculares baseados em proteômica e qPCR

Os MS representativos de leveduras isoladas estão ilustrados na Figura 3. Diferenças entre os espectros de *C. albicans* (Fig. 3A), Candidas não albicans (Fig. 3B) e outras leveduras (Fig. 3C) podem ser observadas. *Candida sp.* apresentam um aglomerado de proteínas entre 3500 e 7000 Da, não sendo observado para *I. orientalis*, *S. cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus*. *C. albicans* apresenta picos definidos, de intensidade relativamente baixa, entre

4200 e 5500 Da, que não estão presentes nos espectros de outras *Candida*. *C. glabrata* apresentou picos distintos, evidenciados pelas intensidades altas em azul, sendo o pico de aproximadamente 11082 Da, único nesta espécie.

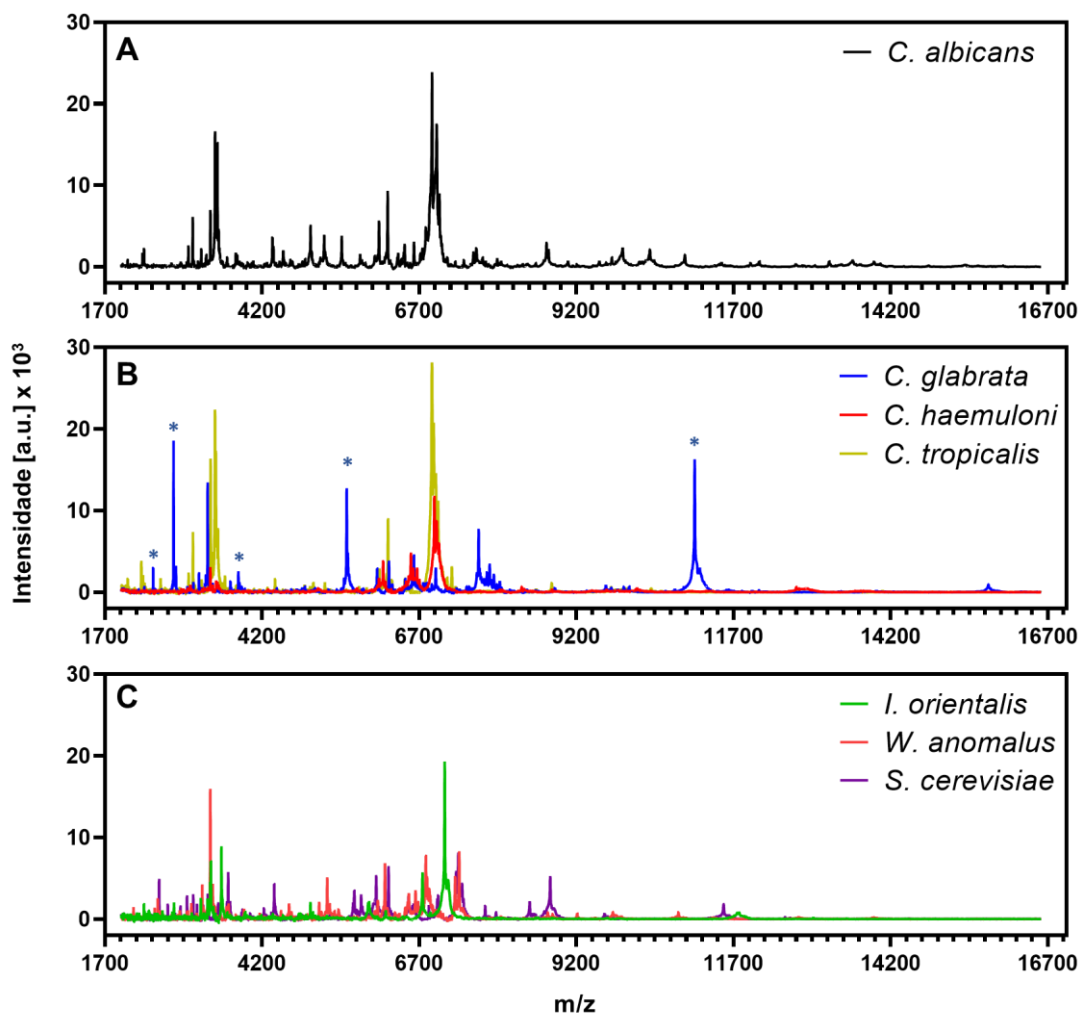


Figura 3. Espectro de massa de diferentes leveduras obtido por MALDI-TOF MS. Todos os espectros foram subtraídos da linha de base. Os espectros proteômicos correspondem a *C. albicans* (A), espécies de *Candida* não *albicans* (B) e espécies diferentes de *Candida*. (C). A grande maioria das proteínas com intensidades mais altas estão concentradas entre 2000 e 7500 Da. Da = daltons.

O espectro de cada cepa foi confrontado com os espectros referência existentes no banco de dados do software para procurar padrões de reconhecimento ou de impressão digital e encontrar a correspondência mais próxima (KASSIM et al., 2017). O grau de correspondência é baseado no valor de score gerado pelo programa, onde valor  $\geq 1,7$  é considerado confiável para identificar espécies. Todas as amostras testadas apresentaram scores

confiáveis. As cepas de leveduras identificadas estão listadas na Tabela 4, bem como análise comparativa entre as metodologias.

**Tabela 4 - Identificação de leveduras através MALDI-TOF-MS.**

Espécie	MALDI-TOF		Vitek 2 (NB2/IBEx)		Concordância <i>p</i> valor*
	Quantidade	%	Quantidade	%	
<i>C. albicans</i>	24	21,4	24	21,6	-
<i>C. dublinienses</i>	1	0,9	1	0,9	-
<i>C. famata/lusitaniae</i>	0	0	1	0,9	0,19
<i>C. glabrata</i>	19	17	18	16,2	0,76
<i>C. guilliermondii/M. guilliermondi</i>	1	0,9	1	0,9	-
<i>C. haemuloni</i>	2	1,8	2	1,8	-
<i>C. krusei/I. orientalis</i>	4	3,6	4	3,6	-
<i>C. metapsilosis</i>	2	1,8	0	0	0,12
<i>C. orthopsilosis</i>	2	1,8	0	0	0,12
<i>C. parapsilosis</i>	19	17	23	20,7	0,38
<i>C. pelliculosa/W. anomalus</i>	1	0,9	1	0,9	-
<i>C. tropicalis</i>	31	27,7	31	27,9	-
<i>C. utilis/C. jadinii</i>	1	0,9	1	0,9	-
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2	1,8	2	1,8	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	2,7	3	2,7	-
Total	112	100,0	112	100,0	

Observação: não foi possível identificar a *C. dublinienses* no LBN2, mas consideramos a identificação positiva para esta espécie realizada no LBM de origem por esta metodologia.

Para 10 espécies (66,6%) as identificações usando MALDI-TOF MS ou Vitek 2 foram concordantes. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a identificação das espécies de leveduras nas duas técnicas avaliadas. Os resultados obtidos demonstram uma superioridade da análise por MALDI-TOF MS em relação ao Vitek 2, para diferenciar as espécies do complexo *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*. A análise pelo equipamento Vitek 2 havia identificado, inicialmente, 23 cepas de *C. parapsilosis* lato sensu. Entretanto, a MS separou o complexo *C. parapsilosis*, totalizando 19 amostras de *C. parapsilosis* sensu stricto, duas amostras de *C. orthopsilosis* e duas de *C. metapsilosis*. Clinicamente, a discriminação entre essas três espécies é importante devido as diferenças na virulência e susceptibilidade antimicrobiana (BERTINI et al., 2013). A *C. orthopsilosis* apresenta um comportamento similar ao da *C. parapsilosis*, enquanto a *C. metapsilosis* pode apresentar um potencial de virulência reduzido (BERTINI et al., 2013). A metodologia também permitiu a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dublinienses* e identificou outras espécies raras de *Candida*. Em laboratórios



de microbiologia clínica, o MALDI-TOF MS representa uma alternativa promissora para a identificação, não apenas de espécies de leveduras comumente encontradas, mas também para espécies pertencentes aos complexos *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa*, entre outras leveduras menos incidentes (CHAO et al., 2014).

O resultado do MALDI-TOF MS está diretamente relacionado com os solventes orgânicos usados para desestabilizar a membrana celular das leveduras, expondo as proteínas (KRAKOVÁ et al., 2018). Aqui, a extração direta com ácido fórmico a 85% foi suficiente para acessar o conteúdo proteico. Contudo, quando o fungo tem membranas mais complexas, parede celular e cápsulas, como *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, é necessário utilizar uma combinação de solventes com polaridades diferentes para obter melhores resultados (LEE et al., 2017).

A utilização desta técnica em BioB contribui não só para a identificação, mas também para estudar mudanças no perfil proteico das leveduras durante estresse fisiológico ou para descobrir novas moléculas antimicrobianas, como por exemplo, peptídeos bioativos (MIRZAEI et al., 2021).

Por fim, foi realizada PCR de colônia para identificar as principais espécies de leveduras, usando os primers escolhidos. Para os testes de identificação por qPCR foram selecionadas seis espécies de leveduras, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, totalizando 98 amostras. Inicialmente, 83 espécies foram caracterizadas. Após nova extração de DNA das amostras que não amplificaram, foi possível expandir a identificação de 98 leveduras. O protocolo de extração do DNA deve ser robusto o suficiente para um desempenho adequado do método. As cepas ATCC de referência também foram usadas nesta análise.

O gráfico de amplificação que relaciona o sinal de fluorescência em função do número de ciclos está representado na Figura 4. O valor de  $\Delta Rn$  representa a subtração das fluorescências obtidas na presença e ausência do alvo ou template. Quanto maior o número de cópias iniciais da sequência alvo, mais rápido será percebido o aumento da fluorescência. Cada grupo de cores representa as curvas para cepas da mesma espécie.

Observa-se perfis de amplificação distintos, com curvas iniciadas entre os ciclos 9 e 30 e apresentando características de reação exponencial condizente com a amplificação do template. *C. tropicalis* apresentou amplificação mais tardia. A PCR para *C. guilliermondii* falhou comprometendo a identificação dessa espécie. Novos pares de primers deverão ser testados.





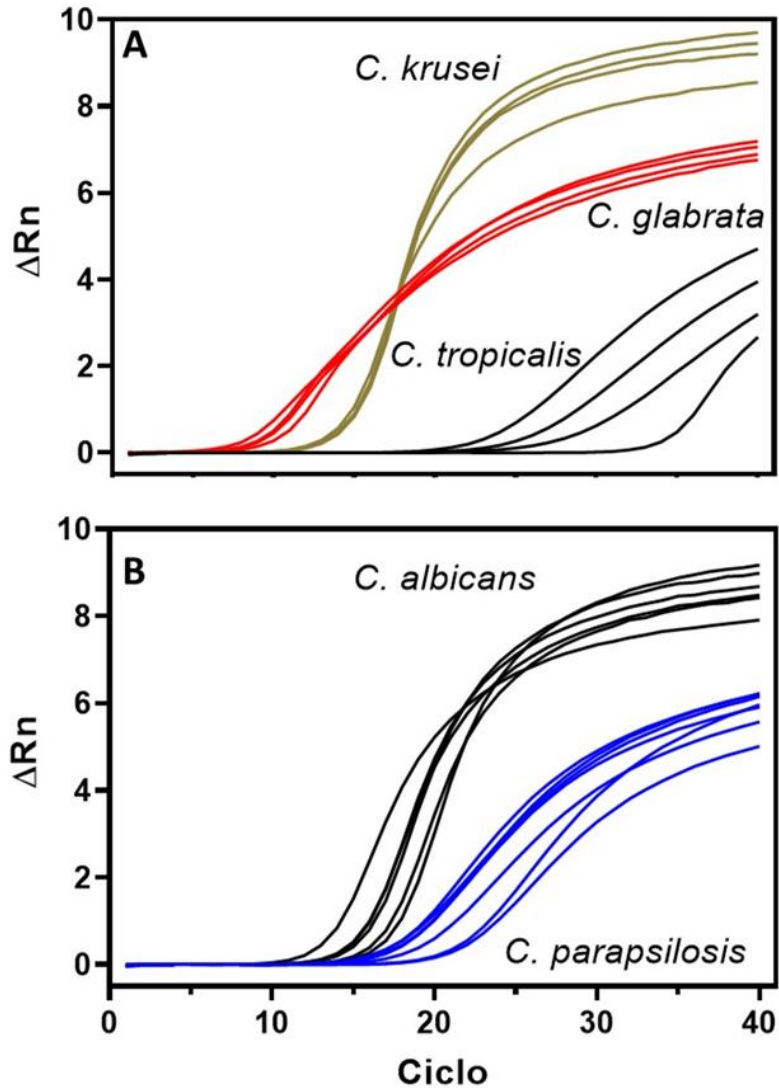


Figura 4. Gráfico de amplificação das amostras analisadas. A. Curva na cor bege: *C. krusei*, curva na cor vermelha: *C. glabrata* e curva na cor preta: *C. tropicalis*; B. Curva na cor preta: *C. albicans* e curva na cor azul: *C. parapsilosis*.

A CvDiss dos produtos de amplificação está ilustrada na Figura 5, apresentando um padrão semelhante para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Um pico único pode ser observado, indicando homogeneidade no tamanho dos fragmentos e boa especificidade dos primers utilizados. A exceção foi a curva para *C. glabrata*, apresentando dois picos, sendo um majoritário permitindo a identificada adequadamente. As  $T_m$  para as *Candida spp.* foram diferentes indicando que a metodologia foi capaz de diferenciar as espécies.





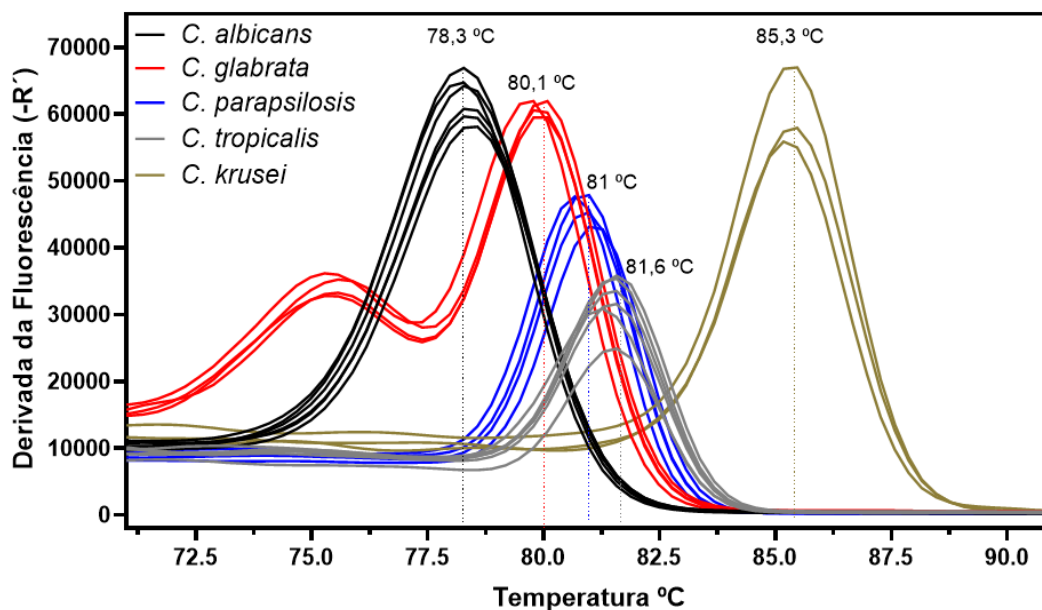


Figura 5. Curvas de melting ou CvDiss dos produtos de PCR de diferentes leveduras. As linhas tracejadas representam o  $T_m$  para cada grupo de espécies e as temperaturas precisas estão indicadas no topo das curvas.

Comparando as metodologias MALDI-TOF MS e qPCR baseadas na Tabela 5, observamos que ambas identificaram o mesmo número de cepas dentro de cada espécie. Apenas a *C. parapsilosis* divergiu, apresentando diferença não significativa ( $p=0,47$ ).

**Tabela 5 – Correlação entre os resultados obtidos através do MALDI-TOF MS e qPCR.**

Espécies	MALDI-TOF	qPCR	<i>p</i> valor*
<i>C. albicans</i>	24 (100,0)	24 (100,0)	-
<i>C. glabrata</i>	19 (100,0)	19 (100)	-
<i>C. krusei/I. orientalis</i> <sup>1</sup>	4 (100,0)	4 (100,0)	-
<i>C. metapsilosis</i>	2 (100,0)	**	-
<i>C. orthopsilosis</i>	2 (100,0)	**	-
<i>C. parapsilosis</i>	19 (82,6)	21 (100,0)	0,47
<i>C. tropicalis</i>	31 (100,0)	31 (100,0)	-
<b>Total</b>	<b>101 (100,0)</b>	<b>99 (100,0)</b>	

<sup>1</sup>Identificada por MALDI-TOF.

\*Teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Valores estatisticamente significativos:  $p < 0,05$

\*\* Não foram utilizados *primers* específicos para *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, porém obteve-se amplificação de *C. orthopsilosis* utilizando o *primer* de *C. parapsilosis*.



## 4. Conclusão

No presente trabalho, seis metodologias com diferentes princípios foram usadas para IdLev. *C. tropicalis* foi a espécie mais prevalente nas hemoculturas. MALDI-TOF MS apresentou maior poder discriminativo que os métodos fenotípicos, aumentando a gama de leveduras identificadas com maior precisão a nível de espécie. Apesar do alto custo inicial do equipamento, a facilidade de manuseio, menor tempo de execução, baixo custo por teste e a precisão na identificação, constituem uma mudança de paradigma no campo de diagnóstico microbiológico. qPCR permitiu a IdLev mais prevalentes neste estudo, apresentando a boa concordância com MALDI-TOF MS.

O conjunto de técnicas analisadas podem ser empregadas para autenticação de leveduras no Biobanco do IBEx, uma vez que é de extrema relevância para a instituição, dada a necessidade de organização e conhecimento para atender às demandas da defesa biológica do Exército. Os resultados obtidos proporcionaram a construção de protocolos técnicos para a caracterização e preservação do BioB de leveduras do IBEx, para atender a demanda de pesquisa na área.

## Agradecimentos

Ao Dr. Ranieri Leitão, diretor médico do Hospital Adventista Silvestre, pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004.

BERTINI, A., DE BERNARDIS, F., HENSGENS, L. A., SANDINI, S. SENESI, S. e colaboradores. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. **Int. J Med Microbiol.**, v. 303, n. 98, p.1-3, 2013.

CAMPANHA, N.H., NEPPELENBROCK, K.H., SPOLIDORIO, D.M.P., SPOLIDORIO, L.C., PAVARINA, A.C. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. **Oral Diseases**, v. 11, p. 392-398, 2005.

CHAO, Q. T.; LEE, T. F.; TENG, S. H.; PENG, L. YH.; CHEN, P. H.; TENG, L. J.; HSUEH, P. R. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis



for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, e109376.2014.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 24, p. 270-276, 1939.

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** *Dissertação de Mestrado em Ciências da Faculdade de Medicina da USP*. 2010.

DAVIS, L. ED.; SHIELDS, C. E. & MERZ, W. G. Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 5, p. 2465-2466, 2005.

DORNELAS-RIBEIRO, M. **Caracterização do efeito "trailing" em cepas de *Candida tropicalis* e sua influência na morfologia, ultraestrutura e expressão de aspartil peptidases.** Tese de Doutorado. IMPPG-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. 83p. 2011.

DORNELAS-RIBEIRO, M.; PINHEIRO, E. O.; GUERRA, C.; BRAGA-SILVA, L. A.; CARVALHO, S. M. F.; SANTOS, A. L. S.; ROZENTAL, S.; FRACALANZZA, S. E. L. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online)*, v. 107, p. 31-38, 2012.

HOSPENTHAL, D. R.; BECKIUS, M. L.; FLOYD, K. L.; HORVATH, L. L.; MURRAY, C. K. Presumptive identification of *Candida species other than C. albicans, C. krusei, and C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar-Candida. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, n. 5, p. 1-5, 2006.

H. S. LEE, J. H. SHIN, M. J. CHOI, E. J. WON, S. J. KEE, S. H. KIM, M. G. SHIN AND S. P. SUH. Comparison of the BrukerBiotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry systems using a formic acid extraction method to identify common and uncommon yeast isolates. *Ann Lab Med.*, n. 37, p. 223-230, 2017.

KASSIM, A., VALENTIN PFLÜGER, ZUL PREMJI, CLAUDIA DAUBENBERGER AND GUNTURU REVATHI. Comparison of biomarker-based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *BMC Microbiology*, n. 17, v. 128. DOI 10.1186/s12866-017-1037-z. 2017.

KRAKOVÁ, L., ŠOLTYS, K., OTLEWSKA, A., PIETRZAK, K., PURKRTOVÁ, S., SAVICKÁ, D., PUŠKÁROVÁ, A., BUČKOVÁ, M., SZEMES, T., BUDIŠ, J., DEMNEROVÁ, K., GUTAROWSKA, B., PANGALLO, D. Comparison of methods for identification of microbial communities in book collections: Culture-dependent (sequencing and MALDI-TOF MS) and culture-independent



(Illumina MiSeq). *International Biodeterioration & Biodegradation*, n. 131, p. 51-59, 2018.

KUMAR, S.; VYAS, A.; KUMAR, M.; MEHRA, S. K. Application of CHROMagarCandida for identification of clinically important *Candida* species and their antifungal susceptibility pattern. *International Journal of Biological and Medical Research*, Iran, v. 4, n. 4, p. 3600-3606, 2013.

LOÍES, G., WALLETE, F., SENDID, B., COURCOL, R. J. Evaluation of Vitek 2 colorimetric cards versus fluorimetric cards for identification of yeasts. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, n. 56, p. 455-457, 2006.

MELETIADIS, J.; ARABATZIS, M.; BOMPOLA, M.; TSIVERIOTIS, K.; HINI, S.; PETINAKI, E.; VELEGRAKI, A.; ZERVA, L. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 49, n. 7, p. 2722-2727, 2011.

MELHEM, M. S. C.; BERTOLETTI, A.; LUCCA, H. R. L.; SILVA, R. B. O.; MENEGHIN, F. A.; SZESZS, M. W. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1257- 1266, 2013.

MIRZAEI, M., SHAVANDI, A., MIRDAMADI, S., SOLEYMANZADEH, N., MOTAHARI, P., MIRDAMADI, N., MOSER, M., SUBRA, G., ALIMORADI, H., GORIELY, S. Bioactive peptides from yeast: A comparative review on production methods, bioactivity, structure-function relationship, and stability. *Trends in Food Science & Technology*, n. 118, Part A, p. 297-315, 2021.

MONTEIRO, A. C. M., FORTALEZA, C. M. C. B., FERREIRA, A. M., CAVALCANTE, R. S., MONDELLI, A. L., BAGAGLI, E. AND CUNHA, M. L. R. S. Comparison of methods for the identification of microorganisms isolated from blood cultures. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v. 15, n. 45. DOI 10.1186/s12941-016-0158-9. 2016.

NATH, R., BORA, R. BORKAKOTY, B, SAIKIA, L., PARIDA, P. Clinically Relevant Yeast Species Identified by Sequencing the Internal Transcribed Spacer Region of r-RNA Gene and Vitek 2 Compact (YST card) Commercial Identification System: Experience in a Tertiary Care Hospital in Assam, Northeast India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 588-592, 2017.

NEJAD, E.E., ALMANI, P. G.N., MOHAMMADI, M.A., SALARI, S. Molecular identification of *Candida* isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *J Clin Lab Anal*, n. 34, e23444, 2020.



NEUFELD, P. M. **Caracterização taxonômica e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de infecção hospitalar.** Tese de Doutorado. INCQS/Fiocruz, 2009.

NEUFELD, P. M.; MELHEM, M. S. C.; SZESZS, M. W.; Dornelas-Ribeiro, M. ; AMORIM, E. L. T. ; SILVA, M. ; Lazéra, M. S. Nosocomial Candidiasis in rio de janeiro state: distribution and fluconazole susceptibility profile. **Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)**, v. 46, p. 477-484, 2015.

ODDS, F. C AND R. BERNAERTS. CHROMagarCandida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. **J. Clin. Microbiol.**, n. 32, p. 1923-1929, 1994.

OGATA, K. , MATSUDA, K., TSUJI, H & NOMOTO, K. Sensitive and rapid RT-qPCR quantification of pathogenic Candida species in human blood. **Journal of Microbiological Methods**, n. 117, p. 128-135. 2015.

POSTERARO, B., EFROMOV, L., LEONCINI, E., AMORE, R., POSTERARO, P., RICCIARDI, W. AND SANGUINETTI, M. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A meta-analysis of their accuracy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53, n. 8, p. 2439-2450, 2015.

RIBEIRO, P. M., KOGA ITO, C. Y., JUNQUEIRA, J. C., JORGE, A. O. C. Isolamento de Candida spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar Candida. **Braz Dent Sci.**, out./dez., v. 12, n. 4, p. 40-45, 2009.

SANTOS, C., LIMA, N., SAMPAIO, P., PAIS, C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic Candida species. **Diag Microbiol Infect Dis**, n. 71, p. 304-308, 2011.

SEXTON, D.J., KORDALEWSKA, M., BENTZ, M.L., WELSH, R.M., PERLIN, D.S., LITVINTSEVA, A.P. Direct detection of emergent fungal pathogen Candida auris in clinical skin swabs by SYBR green-based quantitative PCR assay. **J Clin Microbiol**, v. 56, e01337-18, 2018.

VIJGEN, S., NYS, S., NAESENS, R., MAGERMAN, K., BOEL, A., CARTUYVELS, R. Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and SensititreYeastOne antifungal testing. **Med Mycol.**, v. 49, n.1, p. 107-110, doi: 10.3109/13693786.2010.494255, 2011.

