



DETECÇÃO DE *Candida albicans* POR REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

Santos, V. P.¹; Tavares, E.²; Azevedo, C.³;
Santos, M. P.⁴ Yamauchi, L. M.⁵;
Yamada-Ogatta, S.F.⁵

RESUMO: As infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* vêm causando grande preocupação devido ao aumento de sua incidência. Apesar de fazer parte da microbiota normal do homem, em situações debilitantes esses fungos podem causar infecções oportunistas. Os grupos de risco para essas infecções compreendem os indivíduos imunossuprimidos, aqueles que receberam procedimentos invasivos ou longos períodos de internação, além dos idosos e crianças. Neste sentido, este diagnóstico baseado em PCR é rápido e específico o que possibilita uma terapia mais adequada. O objetivo deste trabalho foi padronizar as condições da PCR para detecção da *C. albicans*. Os iniciadores foram deduzidos através das sequências consenso para espécie utilizando-se o programa Bioedit. Os microrganismos foram crescidos em caldo Sabraud e o material genético foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio-álcool. Foram avaliadas diferentes temperaturas para hibridação dos iniciadores. Após análise dos resultados, concluiu-se que a temperatura ótima de hibridação é de 70°C. A reação é específica para *C. albicans* e capaz de detectar até 1 pg de DNA.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida albicans*; detecção; PCR

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções causadas por fungos do gênero *Candida* tem sido cada vez maior, fato este que tem despertado grande preocupação entre os especialistas da área. O aumento do uso de fármacos terapêuticos, antineoplásicos, antifúngicos e terapias imunossupressoras contribui para o aumento no número dessas infecções. Pacientes imunossuprimidos em decorrência do câncer, AIDS, queimaduras, transplantes ou, até mesmo, idosos e recém-nascidos, apresentam maior pré-disposição a esse tipo de infecção (CLARK & HAJJEH, 2002).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente encontrada em infecções fúngicas e vários estudos mostram a maior prevalência global dessa espécie nesse tipo de infecção (KWAMIN et al., 2013). Essa

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica da Fundação Araucária virginiaprezzisantos@gmail.com

²Acadêmica de Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia elianandro.tavares@gmail.com

³Acadêmico do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia carolineldb@hotmail.com

⁴ Acadêmica do Mestrado em Microbiologia da Universidade Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, departamento de Microbiologia polle_myrella@hotmail.com

⁵ Professora Dra. da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. lionilmy@uel.br

⁶Orientadora. Professora Dra. da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. ogatta@uel.br

espécie também é a mais patogênica dentro do seu gênero, possuindo a maior taxa de mortalidade devido às infecções (AHMAD *et al.*, 2012)

C. albicans é um fungo polimórfico capaz de causar infecções superficiais, como candidíase oral ou vaginal, e infecções sistêmicas, que podem atingir diversos órgãos e causar a morte desses pacientes. Essa espécie possui diferentes fatores que contribuem para infectar seu hospedeiro, incluindo a transição morfológica entre levedura e formas de hifas, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, secreção de enzimas hidrolíticas e a formação de biofilmes (MAYER; 2013).

A diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas é baseado na detecção do microrganismo através de microscopia direta em amostras clínicas, isolamento, crescimento e identificação do patógeno em cultura, técnicas essas consideradas como padrão ouro. No entanto, a obtenção do material biológico para análise ainda apresenta dificuldades. Devido a esse fato, outros métodos sem necessidade de cultivo do microrganismo, como a de antígenos, material genético ou metabólitos tem sido desenvolvidos (KIEDZIERSKA *et al.*, 2007).

Ensaio baseado no DNA para detecção e identificação de espécies fúngicas fornecem uma alternativa altamente sensível e específica em relação aos métodos convencionais. As técnicas moleculares, como o uso de hibridações com ácidos nucleicos, a técnica de PCR e sequenciamento, têm como uma das vantagens a capacidade de detecção do agente fúngico, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos, e, conseqüentemente, podem facilmente ser utilizadas no acompanhamento de pacientes de risco, como transplantados (BADIEE, *et al.*, 2007).

Uma dificuldade no desenvolvimento de metodologias para a detecção molecular de fungos patogênicos é a falta de informação quanto à variabilidade nas sequências nucleotídicas usadas para a construção das sondas específicas. Em fungos, os genes que codificam para os RNAs ribossomais são constantemente utilizados para o desenvolvimento de reações de detecção molecular. Os genes ribossomais estão presentes em todos os organismos e em grande número de cópias, característica que contribui para o aumento da sensibilidade da reação de PCR.

Esse trabalho teve como objetivo padronizar um método para identificação molecular de *Candida albicans*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção do material genômico a ser utilizando nas reações de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR), *Candida albicans* ATCC 26790, fornecida pelo Laboratório de Microrganismos de Referência-FIOCRUZ, foram crescidas em meio Sabouraud a 37°C por 48 horas. As leveduras foram ressuspensas em tampão de lise TENTS (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8.0; 10 mM acetato de sódio; 2% de Triton X-100; 1% SDS, RNase 1 mg/mL) e rompidas por choque físico, seguido pela remoção da fase orgânica pela adição de fenol/clorofórmio (Ausubel *et al.*, 1999). O produto extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA) pela mensuração da absorbância a 260 nm e todas as amostras foram padronizadas para uma quantidade de 100ng/μL. Para a primeira reação de amplificação foram utilizado 10 ng de DNA dos fungos como molde, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (*sense* e *anti-sense*), e 0,65 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Foram realizadas PCRs para cada um dos pares de oligonucleotídeos e as temperaturas de hibridação variaram entre 62°C e 72°C. Após a amplificação com as diferentes temperaturas de hibridação, foi realizada uma PCR seguindo o seguinte perfil: 3 minutos a 95 °C para uma desnaturação inicial; seguida de 45 ciclos, com desnaturação

a 95°C por 1 min, hibridação dos oligonucleotídeos de 60°C a 70°C, variando de 2 °C, por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. !00ng de DNA de *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatos*, *Aspergillus niger*, *Fusarium proteus*, *Fusarium oxys*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Homo sapiens* foram utilizadas para determinação de especificidade do iniciadores. Para o teste de sensibilidade foi utilizado o DNA da levedura em diferentes concentrações (100ng, 10ng, 1ng, 100 pg, 10pg, 1pg e 100fg). Os produtos da PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose 1%, corados com gel red e visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a primeira reação de amplificação com as diferentes temperatura de hibridação, observou-se um fragmento de 302 pares de bases em todas as temperaturas testadas, sendo esse fragmento do tamanho esperado. Entretanto, a melhor temperatura para o hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores foi de 70°C. Uma maior temperatura de hibridação dos iniciadores aumenta a restringência destes, aumentando, assim, a especificidade da reação.

A reação de especificidade dos iniciadores mostrou amplificação do fragmento nas amostras correspondentes ao DNA de *C. albicans*, não havendo amplificação correspondente aos demais microrganismos testados. Com estes resultados podemos inferir que os indicadores, bem como a região estudada, bem com a região estudada, são específica para o fungo estudado, podendo ser utilizada para a identificação da espécie. Devido às diferenças na patogenicidade e perfil de sensibilidade aos antifúngicos nas várias espécies de *Candida*, a sua identificação é essencial para um tratamento adequado das infecções.

Os resultados da reação de sensibilidade dos iniciadores estudados mostraram que mesmo com quantidades reduzidas de DNA (1pg) foi possível obter amplificação e visualização desse material genético.

4. CONCLUSÃO

A identificação de *Candida albicans* por PCR utilizando os iniciadores desenhados a partir da região NTS1 mostrou-se específica e sensível.

5. REFERENCIAS

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

BADIEE, P.; KORDBACHEH, P.; ALBORZI, A.; MALEKHOSEINI, S.; ZEINI, F.; MIRHENDI, H.; MAHMOODI, M. Prospective Screening in Liver Transplant Recipients by Panfungal PCR-ELISA for Early Diagnosis of Invasive Fungal Infections. Liver Transplan. 13(7): 1011-1016, 2007.

CLARK, T.A.; HAJJEH, R.A. Recent Trends in the Epidemiology of Invasive Mycoses. Curr Opin Infect Dis. 15: 569-574, 2002.

KĘDZIERSKA, A.; KOCHAN, P.; PIETRZYK, A.; KĘDZIERSKA, J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1→3)-β-D-glucan antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 755 – 766, 2007.

MAYER, F., L.; WILSON, D.; HUBE, B.: *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4:2, 1–10; February 15, 2013; © 2013 Landes Bioscience.

Anais Eletrônico

VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar
Editora CESUMAR
Maringá – Paraná – Brasil