

PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DE *Candida albicans*

Bruna Schwengber Lutz¹
Gabriela Kniphoff da Silva²
Valeriano Antonio Corbelini³
Jane Dagmar Pollo Renner⁴
Lia Gonçalves Possuelo⁵
Andréia Rosane de Moura Valim⁶

RESUMO

Candida albicans é a espécie mais frequente em micoses hospitalares. O difícil diagnóstico relacionado com a baixa sensibilidade e o tempo longo para apresentação dos resultados são os principais fatores relacionados às recidivas e dificuldades na terapia. O objetivo desse estudo foi padronizar técnicas de PCR convencional e em tempo real (RT-PCR) e determinar a sensibilidade e especificidade na detecção de *C. albicans*. As extrações de DNA foram realizadas utilizando método *in house*. Os primers utilizados foram baseados na região NTS para a PCR convencional e na região espaçadora interna transcrita (ITS2) do gene de rRNA de *C. albicans* para a RT-PCR. A PCR convencional apresentou sensibilidade de 100 pg e baixa especificidade, sendo positiva também para a cepa de *S. cerevisiae*. A sensibilidade da RT-PCR foi de 0,1 fg e especificidade questionável. As duas técnicas tiveram tempo de execução menor em relação ao padrão-ouro. Concluímos que a PCR convencional apresentou limitações e a RT-PCR foi mais sensível na detecção de *C. albicans*. As técnicas devem ser aperfeiçoadas para testes com amostras clínicas, mas apresentam grande potencial no diagnóstico de *C. albicans*, visto que a sensibilidade, especificidade e tempo de execução se apresentam superiores à técnica padrão-ouro.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Diagnóstico. PCR convencional. RT-PCR.

¹ Acadêmica do curso de Farmácia e bolsista do Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Bolsista (PIBITI/CNPq) <bruna_lutz@yahoo.com.br> *

² Mestre em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS e professora da UNIVATES, <gabriela.kniphoff@gmail.com>*

³ Doutor em Química UFRGS e professor do Departamento de Química e Física da UNISC. <valer@unisc.br>

⁴ Doutora em Biologia Celular e Molecular pela PUCRS e professora do Departamento de Biologia e Farmácia da UNISC. <janerenner@unisc.br>

⁵ Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela UFRGS e professora do Departamento de Biologia e Farmácia da UNISC. <liapossuelo@unisc.br>

⁶ Doutora em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS e professora do Departamento de Biologia e Farmácia da UNISC. <avalim@unisc.br>

*Ambas autoras tiveram igual participação na redação do artigo.

ABSTRACT

Candida albicans is the most frequent species in nosocomial mycosis. The hard diagnosis related to low sensitivity and the long time to obtain results are the main factors to cause recurrence and difficulties in therapy. This study aimed to develop conventional and real time PCR (RT-PCR) techniques and determine the sensitivity and specificity for *C. albicans* detection. The DNA extractions were performed with an in house method. The primers used were specific for the NTS region using the conventional PCR and for the internal transcribed spacer (ITS2) region of the *C. albicans* rRNA gene using RT-PCR. The conventional PCR showed sensitivity of 100 pg and low specificity, being positive also for the *S. cerevisiae* strain. The RT-PCR had the sensitivity of 0.1 fg and questionable specificity. Both techniques were less time consuming than the current gold-standard diagnosis. We conclude that the conventional PCR presented limitations and the RT-PCR technique was more sensitive for *C. albicans* detection. The techniques should be improved for tests with clinical samples, but have great potential in *C. albicans* diagnosis, since the sensitivity, specificity and runtime are already above the gold-standard technique.

Keywords: *Candida albicans*. Diagnosis. Conventional PCR. RT-PCR.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana sendo encontradas na pele, orofaringe, mucosa vaginal e trato gastrointestinal (CANTÓN; VIUDES; PEMÁN, 2001). Esses organismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, causando diversos tipos de infecção (EVANS, 2010).

Dentre as infecções consideradas invasivas, a candidemia caracteriza-se por presença de *Candida* spp. na corrente sanguínea, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequentemente isolada (PFALLER; DIEKEMA, 2007; HORN et al., 2009; SILVA, 2012). Existem mais de 150 espécies de *Candida* sendo que as mais comumente encontradas incluem *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliemondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida lipolytica*, *Candida kefyr*, *Candida inconspicua*, *Candida norvergensis* e *Candida catenulata* (ANVISA, 2013). Casos de candidemia têm sido observados principalmente em pacientes hospitalizados por longos períodos que tenham sido expostos a antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral e diversos procedimentos médicos invasivos (COLOMBO et al., 2006; OSTROSKY-ZEICHNER; PAPPAS, 2006).

Apesar de todos os avanços nas últimas décadas, infecções hospitalares causadas por fungos têm-se constituído em um problema crescente de saúde pública, devido à alta morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, além do alto custo para manter esses pacientes (MALUCHE; SANTOS, 2008). Um estudo realizado por Colombo e col. (2006) em 11 centros médicos, demonstrou a alta incidência de candidemia no Brasil, com taxas de 2,49 casos/1000 admissões, o que é de 2 a 15 vezes maior do que em países do hemisfério norte, como Estados Unidos, Canadá e países da Europa (COLOMBO et al., 2006).

O difícil diagnóstico, relacionado principalmente com a baixa sensibilidade dos testes e o tempo demasiadamente longo para o isolamento e identificação laboratorial da levedura, apresenta-se como o principal fator relacionado ao aparecimento de recidivas e aumento da resistência das leveduras aos antifúngicos (AVNI; LEIBOVICI; PAUL, 2011). A hemocultura, atual padrão-ouro em casos de candidemia, tem baixa sensibilidade, sendo que a elevada taxa de resultados falso-negativos já foi demonstrada pela detecção da infecção fúngica em menos de 50% dos pacientes com infecção por *Candida* spp. (EINSELE et al., 1997; OSTROSKY-ZEICHNER; PAPPAS, 2006; EVANS, 2010). Além disso, o diagnóstico por hemocultura pode demorar 3 a 5 dias em sistemas automatizados, tempo demais para se começar a terapia antifúngica. Estudos têm demonstrado ainda que a variabilidade intrínseca existente entre as diferentes espécies de *Candida* influencia na escolha do antifúngico, o que intensifica a necessidade de um diagnóstico preciso e confiável (FISHER et al., 2011; KAUFFMAN, 2006).

Devido a atrasos na identificação convencional e limitações para diferenciar espécies, novas metodologias têm sido propostas. Diversos estudos descrevendo ensaios de diagnóstico de *Candida* por detecção do DNA fúngico, através de técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram descritos. Porém, as técnicas descritas até agora não atingiram sensibilidade e especificidade suficientes para serem definidas como padrão (AVNI; LEIBOVICI; PAUL, 2011). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e padronizar, através da utilização das técnicas moleculares, um método de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade para detecção de *C. albicans*.

2 METODOLOGIA

2.1 Cepas

Para padronização das técnicas de diagnóstico molecular utilizou-se a cepa de *C. albicans* (NEWP0031) como controle positivo das reações. Outras espécies de *Candida* e outros gêneros de fungos e bactérias foram testados a fim de garantir a especificidade dos métodos. Foram utilizadas cepas de *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *Saccharomyces cerevisiae* (XV185-14C), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (NEWP0022), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (ATCC 9290) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As cepas foram obtidas junto à coleção de microrganismos de microbiologia industrial (CMMI) da UNISC.

2.2 Extração de DNA

A extração de DNA fúngico das cepas foi realizada utilizando o protocolo adaptado descrito por Burke, Dawson e Stearns (2000). O processo de extração partiu de um meio de cultivo líquido contendo glicose, peptona e cloranfenicol, onde as amostras foram inoculadas por 48 horas. Após, foi realizada centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* de células foram lavados em 1 mL de água deionizada autoclavada e o processo de centrifugação foi repetido.

Os *pellets* foram então ressuspensos em 500 µL de tampão (100 mM Tris pH 7,5 e 50 mM EDTA), seguidos pela adição de 3,5 µL de mercaptoetanol e então incubados com agitação a 37°C por aproximadamente 30 minutos. Após, houve centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado para ressuspender os *pellets* novamente, agora em 200 µL de tampão. Nesta etapa adicionou-se 20 µL de liticase (5 unidades/µL) para posterior incubação com agitação a 37°C por 40 minutos. Então, foi adicionado 20 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e agitou-se em vórtex até que a solução ficasse viscosa. O mesmo foi realizado com 80 µL de acetato de potássio (KOAc) 5 M, seguido pela incubação em gelo por 30 minutos.

Passados os 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, precipitando o DNA

com 320 μL de isopropanol. Depois, centrifugou-se novamente a 14000 rpm, agora por 15 minutos e os *pellets* foram lavados com 20 μL de etanol 70% e centrifugados por mais 5 minutos. Deixou-se os *pellets* secarem ao ar por aproximadamente 24 horas e ressuspendeu-se em 50 μL de Tris 10 mM. Por fim, os microtubos ficaram em banho-maria a 65°C por 30 minutos.

A extração de DNA bacteriano procedeu-se com o kit comercial DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Para a quantificação das extrações, utilizou-se o aparelho NanoDrop 2000.

2.3 PCR Convencional

A PCR foi realizada com um master mix preparado em um microtubo de 1,5 mL contendo para cada amostra 14,5 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$, 2,5 μL de tampão 10x (Ludwig), 2 μL de dNTP 2,5 mM (Fermentas), 1,5 μL de MgCl_2 1,5 mM (Ludwig), 1 μL do Primer PspA1 10mM, 1 μL do Primer PspA2 10mM e 0,5 μL de *Taq DNA Polimerase* 2,5 U (Ludwig). A sequência dos *primers* utilizados é específica para a região espaçadora não transcrita (NTS) de *C. albicans*, e foi descrita no trabalho de Holmes e colaboradores (1994).

O volume total da reação foi de 25 μL utilizando 2 μL de DNA da amostra ou 2 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ no controle negativo. Como controle positivo utilizou-se de 2 μL de DNA genômico da cultura da cepa *C. albicans* NEPW 0031 em um dos tubos.

A amplificação do fragmento de 684 pares de bases (pb) ocorreu em termociclador (Applied Bio-systems 2720) com as seguintes condições: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguidos por 35 ciclos sendo 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para o anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72°C para extensão; além de uma extensão final por 5 minutos a 72°C, baseado em Holmes et al. (1994), com modificações. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% com o auxílio de um marcador de 100 pb (Ludwig).

2.4 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) foi padronizada com a utilização de *primers* e sondas específicos para a região espaçadora interna transcrita (ITS2) do gene de rRNA de *C. albicans*, previamente descritos por Guiver, Levi e Oppenheim

(2001). Para isso foi utilizado o equipamento StepOnePlus (AppliedBiosystems). Após diferentes testes de concentração de *primers* e sondas foram definidas para utilização as concentrações de 0,05 μM de cada primer e 0,1 μM de sonda TaqMan (AppliedBiosystems). Foram utilizados 5 μL de TaqMan PCR Universal MasterMix (AppliedBiosystems), conforme recomendação do fabricante, 2 μL de amostra e o restante de água. A reação foi padronizada para um volume final de 10 μL .

As condições de temperatura utilizadas foram: um passo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em todas as reações foram utilizados controles positivos (cepa de *C. albicans*) e controles negativos a fim de evitar possíveis contaminações. O *threshold* foi definido automaticamente pelo programa, sendo ajustado para a fase exponencial da reação quando necessário.

2.5 Teste de sensibilidade

Para analisar a sensibilidade das técnicas moleculares foi realizada uma diluição seriada a partir de uma concentração conhecida de DNA de *C. albicans*. Uma cepa referência de *C. albicans* teve o DNA extraído, quantificado, e foi realizada uma diluição seriada de 10 vezes a partir da concentração de 100ng/ μL . Todas as diluições foram testadas pelas técnicas de PCR convencional e RT-PCR.

2.6 Teste de especificidade

Para testar a especificidade dos testes de diagnóstico foram selecionadas cepas referência de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* e *S. aureus*. Cada microrganismo foi cultivado em meio específico e o DNA foi extraído conforme descrito anteriormente.

O DNA extraído foi quantificado e diluído para a concentração de 10 ng/ μL . Foram realizadas reações de PCR convencional e RT-PCR para todas as amostras, juntamente com a cepa referência de *C. albicans* na mesma concentração.

3 RESULTADOS

3.1 Teste de sensibilidade

Os resultados do teste de sensibilidade feitos pela técnica de PCR convencional demonstraram que foi possível obter diagnóstico positivo em amostras de *C. albicans* em concentrações de 100 ng até 100 pg. As amostras com concentrações menores foram negativas, como pode ser observado na Figura 1.

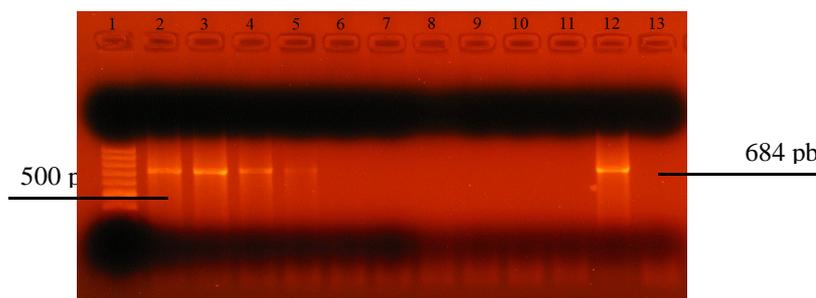


Figura 1 - Gel de agarose com os resultados do teste de sensibilidade pela técnica de PCR convencional. Na canaleta 1 está o marcador de peso molecular de 100 pb. Nas canaletas de 2 a 11 estão indicadas as amostras de *C. albicans* nas diferentes concentrações: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, respectivamente. Canaleta 12: controle positivo e canaleta 13: controle negativo.

Na RT-PCR, o *threshold*, que é definido como o ponto de corte entre amostras positivas e negativas de acordo com a fluorescência emitida por cada amostra, foi definido em um valor de 0,06432. O valor de Ct é o ciclo da PCR na qual cada amostra passou no *threshold*. As amostras de *C. albicans*, nas diferentes concentrações obtiveram valores de Ct que variaram de 16 a 38 ciclos. Como pode ser observado na Figura 2, as amostras com maior concentração obtiveram um Ct mais baixo, indicando que o resultado positivo aconteceu mais cedo. E as amostras com menor concentração demoraram mais para emitir fluorescência, indicando resultado positivo em um ciclo posterior. Mesmo assim, todas as concentrações testadas de *C. albicans* demonstraram resultado positivo pela técnica de RT-PCR, de acordo com os valores apresentados na Tabela 1.

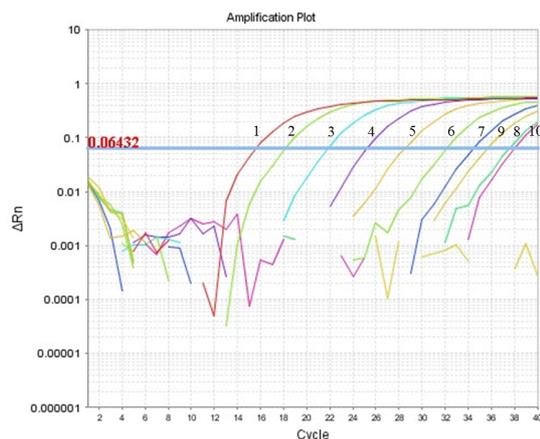


Figura 2 - Gráfico do teste de sensibilidade emitido pelo software do equipamento StepOnePlus (AppliedBiosystems). O eixo vertical indica a média de fluorescência emitida e o eixo horizontal indica os ciclos da reação de PCR, a linha azul horizontal indica o *threshold*. 1: 100 ng, 2: 10 ng, 3: 1 ng, 4: 100 pg, 5: 10 pg, 6: 1 pg, 7: 100 fg, 8: 10 fg, 9: 1 fg e 10: 0,1 fg.

Tabela 1 - Comparação entre os resultados obtidos no teste de sensibilidade pelas técnicas de PCR convencional e RT-PCR, para diagnóstico de *C. albicans*.

	PCR convencional	RT-PCR
<i>C. albicans</i> (100 ng)	Positivo	Positivo (Ct=16)
<i>C. albicans</i> (10 ng)	Positivo	Positivo (Ct=18)
<i>C. albicans</i> (1 ng)	Positivo	Positivo (Ct=22)
<i>C. albicans</i> (100 pg)	Positivo	Positivo (Ct=25)
<i>C. albicans</i> (10 pg)	Negativo	Positivo (Ct=29)
<i>C. albicans</i> (1 pg)	Negativo	Positivo (Ct=32)
<i>C. albicans</i> (100 fg)	Negativo	Positivo (Ct=34)
<i>C. albicans</i> (10 fg)	Negativo	Positivo (Ct=38)
<i>C. albicans</i> (1 fg)	Negativo	Positivo (Ct=36)
<i>C. albicans</i> (0,1 fg)	Negativo	Positivo (Ct=38)

3.2 Teste de especificidade

No teste de especificidade realizado pela técnica de PCR convencional para as diferentes espécies de *Candida* foi possível observar amplificação de um fragmento de 684 pb apenas para a amostra de *C. albicans* (Figura 3).

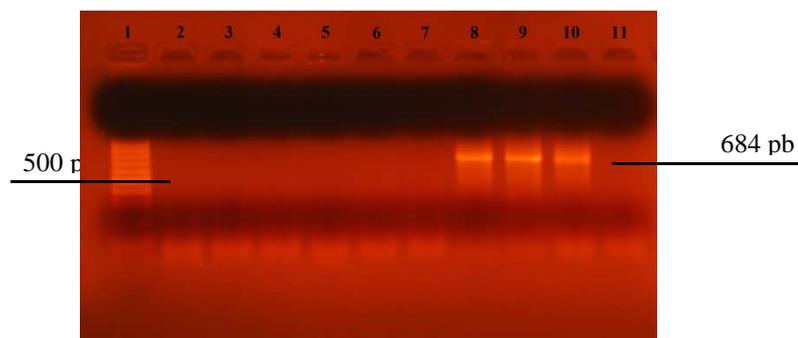


Figura 3 - Gel de agarose com os resultados do teste de especificidade pela técnica de PCR convencional (em duplicata). Na canaleta 1 está o marcador de peso molecular de 100pb, 2 e 3: *C. parapsilosis*, 4 e 5: *C. tropicalis*; 6 e 7: *C. glabrata*; 8 e 9: *C. albicans*; 10: Controle positivo, 11: Controle negativo.

No teste de especificidade feito utilizando diferentes microrganismos é possível observar um fragmento de 684 pb para as amostras contendo DNA de *C. albicans* e de *S. cerevisiae*. Além disto, a amostra de *P. aeruginosa* gerou um fragmento de aproximadamente 2500 pb (Figura 4).

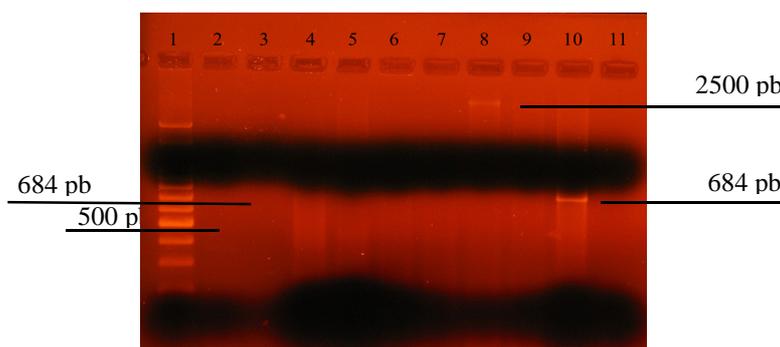


Figura 4 - Gel de agarose com os resultados do teste de especificidade pela técnica de PCR convencional. Na canaleta 1 está o marcador de peso molecular de 100pb, 2: *S. cerevisiae*, 3: *S. enteritidis*, 4: *L. monocytogenes*, 5: *A. baumannii*, 6: *E. coli*, 7: *S. aureus*, 8: *P. aeruginosa*, 9: *E. faecalis*, 10: Controle positivo, 11: Controle negativo.

Os resultados obtidos no teste de especificidade na RT-PCR demonstraram que a amostra de *C. albicans* foi positiva com Ct=18. As outras espécies de *Candida* foram positivas com valores de Ct entre 32 e 33. As amostras de *A. baumannii*, *E. coli*, *S. cerevisiae* e *S. aureus* foram positivas com Ct entre 34 e 35. As demais amostras,

pertencentes a diferentes bactérias, foram positivas com valores de Ct entre 37 e 38 (Figura 5).

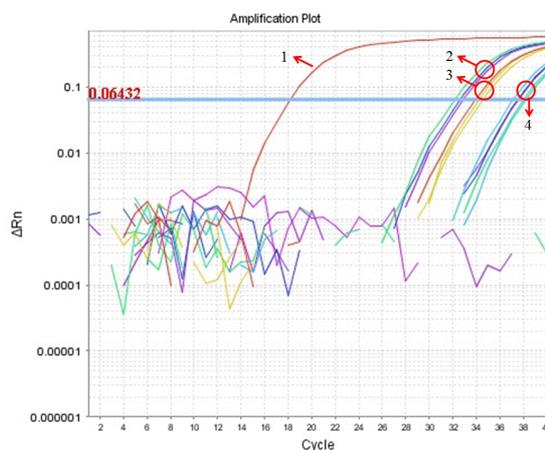


Figura 5 - Gráfico do teste de especificidade emitido pelo software do equipamento StepOnePlus (AppliedBiosystems). O eixo vertical indica a média de fluorescência emitida e o eixo horizontal indica os ciclos da reação de PCR, a linha azul horizontal indica o *threshold*. 1: *C. albicans*; 2: cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, 3: cepas de *A. baumannii*, *E. coli*, *S. cerevisiae* e *S. aureus*, 4: demais bactérias.

3.3 Tempo de execução dos métodos de diagnóstico

O tempo necessário para realizar o processo de extração de DNA foi de 8 horas, considerando-se que a cultura tenha sido previamente preparada; caso contrário, deve-se adicionar mais 48 horas. A técnica de PCR convencional e a análise do resultado, que é feita por eletroforese em gel de agarose, demoram cerca de 4 horas para serem concluídas. O processo total utilizando a técnica de PCR convencional demora aproximadamente 12 horas. Quando utilizada a RT-PCR, o diagnóstico de *C. albicans* foi possível em um tempo total de 10 horas.

4 DISCUSSÃO

Com o crescente número de infecções fúngicas, principalmente os casos mais graves que acometem pacientes imunodeprimidos, há também a busca de novos métodos diagnósticos, visando técnicas com maior sensibilidade, especificidade e menor tempo de execução (CAVALCANTI; LORENA; GOMES, 2008). O gênero *Candida* sp. é o mais frequente dentre as infecções fúngicas e, embora haja um aumento

de casos de candidíases causadas por outras espécies, a *C. albicans* ainda é responsável pela grande maioria dos casos (HORN et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2007). O presente artigo explorou duas técnicas moleculares como alternativa para um novo método diagnóstico de *C. albicans*, tendo sido testadas metodologias de PCR convencional e RT-PCR.

Utilizando a técnica de PCR convencional com o par de *primers* selecionados foi possível amplificar amostras contendo DNA extraído da cepa referência de *C. albicans* nas concentrações de 100 ng, 10 ng, 1 ng e 100 pg. Porém, ao compararmos com a técnica de RT-PCR, a última demonstrou ter sensibilidade maior. Embora as amostras contendo menor concentração de DNA de *C. albicans* tenham emitido fluorescência nos ciclos finais da reação da RT-PCR, todas foram positivas. Dessa maneira, a técnica de RT-PCR demonstrou sensibilidade de 0,1 fg, ou seja, a técnica foi capaz de detectar DNA de *C. albicans* em uma concentração 6 vezes menor do que a técnica de PCR convencional, que obteve a sensibilidade de 100 pg (Tabela 1).

Mirhendi e Makimura (2003) desenvolveram uma técnica de PCR convencional capaz de amplificar até 1 pg de DNA de *C. albicans*. Já o ensaio de PCR multiplex descrito por Tarini et al. (2010) detectou até 4 pg de DNA de *C. albicans*. Estes resultados demonstram que a técnica de PCR convencional padronizada no presente estudo apresentou menor sensibilidade. Quanto a RT-PCR, Hsu et al. (2003), utilizando fluoróforos SYBR Green, obtiveram a sensibilidade de 1 pg. Pryce et al. (2003), por sua vez, detectaram um limite de 10 fg com a utilização de sondas para *C. albicans*. Bu et al. (2005), através de multiplex RT-PCR, detectaram até 0,1 pg de DNA de *C. albicans*. Desta forma, nossos dados demonstraram maior sensibilidade na RT-PCR em relação aos estudos já publicados.

No teste de especificidade padronizado através da técnica de PCR convencional foram testadas diferentes amostras, havendo amplificação do fragmento de interesse nas amostras contendo DNA extraído da cepa de *C. albicans* e de *S. cerevisiae*, demonstrando que a técnica não foi específica. Estudos publicados anteriormente, com diferentes variações da técnica de PCR convencional, obtiveram especificidade de 100% para os microrganismos testados (AHMAD, 2002; LAU et al., 2010; TARINI et al., 2010).

Em contrapartida, na técnica de RT-PCR, os resultados obtidos a partir do teste de especificidade demonstraram positividade para a amostra contendo DNA extraído da cepa de *C. albicans* em um ciclo logo no início da reação de PCR (Ct=18). Entretanto,

as demais amostras também emitiram fluorescência. As outras espécies de *Candida* testadas foram positivas entre os Ct 32 e 33. As amostras de *A. baumannii*, *E. coli*, *S. cerevisiae* e *S. aureus*, foram positivas com valores de Ct entre 34 e 35 e as demais amostras, que foram extraídas a partir de cepas de bactérias, obtiveram positividade entre os ciclos 37 e 38. Isto pode ser explicado pela alta sensibilidade do teste. Esses resultados dificultam a análise, pois embora a amostra de *C. albicans* apresente um resultado muito distinto das demais amostras, o ideal seria não haver nenhuma amplificação em amostras de outros gêneros e espécies. Outros trabalhos publicados utilizando a técnica de RT-PCR realizaram teste de especificidade utilizando amostras clínicas e obtiveram de 96 a 100% de especificidade (MAAROUFI et al., 2003; BU et al., 2005; KLINGSPOR; JALAL, 2006; KHAN; MUSTAFA; ALAM, 2009; KHLIF et al., 2009). Estudos que testaram a especificidade utilizando cepas de diferentes microrganismos relataram 100% de especificidade (LOEFFLER et al., 2000; PRYCE et al., 2003).

O resultado obtido no teste de especificidade é atualmente a limitação do método e o problema se torna ainda maior se analisarmos juntos os dados dos testes de sensibilidade. Considerando que o objetivo de padronizar uma nova técnica de diagnóstico é usar posteriormente para amostras clínicas, caso ocorra emissão de fluorescência de uma amostra clínica no ciclo 32 da reação (Ct=32), por exemplo, ficará difícil definir se o resultado se refere a uma amostra positiva para *C. albicans* com baixa concentração de DNA (1 pg) ou se houve positividade para outra espécie de *Candida*.

A técnica de PCR convencional pode ser executada durante um período de aproximadamente 12 horas, incluindo o método de extração. Como a técnica de RT-PCR não necessita dos procedimentos pós-PCR, o tempo necessário para realizar toda técnica é de cerca de 10 horas. Uma alternativa para reduzir ainda mais o tempo de execução dos testes é a utilização de um kit comercial para a extração de DNA fúngico.

5 CONCLUSÃO

O atual método considerado padrão-ouro para diagnóstico de fungos na rotina laboratorial é feito através de exame direto, cultivo da amostra em meio específico e, após crescimento das culturas, são realizadas análises de macro e micromorfologia, além do teste do tubo germinativo que confirma a espécie *C. albicans*. Todo esse processo demora em média uma semana; assim sendo, ambas as técnicas padronizadas

apresentam um tempo de execução bem menor do que a técnica considerada padrão-ouro em diagnóstico. Além disso, a sensibilidade obtida nos métodos moleculares é muito maior do que no método padrão-ouro, onde a sensibilidade alcança apenas 50% das amostras, ou seja, metade das amostras analisadas recebe o resultado de falso-negativo.

Em suma, a técnica de PCR convencional não demonstrou ser específica, visto a amplificação de *S. cerevisiae*. Já a RT-PCR, além de ser mais sensível, permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases da reação. Como o procedimento é automatizado, requer menor manipulação das amostras e dos produtos de amplificação, reduzindo o risco de contaminação e o tempo para execução da análise. Neste sentido, embora a RT-PCR ainda precise ser estudada mais detalhadamente a fim de aumentar a especificidade, já se demonstra como uma boa alternativa para futuramente ser testada utilizando amostras clínicas.

Essas são as perspectivas futuras do presente estudo. Serão feitos novos testes de sensibilidade e especificidade com diferentes metodologias, utilizando as sequências específicas de *Candida* clonada em plasmídeos. Pois só com as técnicas padronizadas para diagnóstico de amostras clínicas, com alta sensibilidade e especificidade, poderemos obter um diagnóstico de *C. albicans* confiável e possível de ser executado em um tempo menor. Dessa maneira, pacientes com candidíases graves internados em UTIs poderão receber um diagnóstico mais rápido (em torno de 10 a 12 horas), além de terapia adequada, o que aumentará as chances de cura e diminuirá o tempo de internação hospitalar, reduzindo também as recidivas e a resistência aos antifúngicos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, A. S.; KHAN, Z. U. Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification. *J. Clin. Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 483-2489, 2002.

ANVISA. Disponível em: <www.portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 mar. 2013.

AVNI, T.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol*, v. 49, n. 2, p. 665-670, 2011.

BU, R.; SATHIAPALAN, R. K.; IBRAHIM, M. M.; AL-MOHSEN, I.; ALMODAVAR, E.; GUTIERREZ, M. I.; BHATIA, K. Monochrome LightCycler PCR

assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 243–248, 2005.

BURKE D., DAWSON D., STEARNS T. *Methods in Yeast Genetics a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press 2000.

CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol*, v. 18, p. 51-55, 2001.

CAVALCANTI, M. de P.; LORENA V. M. B. de; GOMES, Y. de M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 8, p. 2816-23, 2006.

EINSELE, H.; HEBART, H.; ROLLER, G.; LOFFLER, J.; ROTHENHOFER, I.; MULLER, C. A.; BOWDEN, R. A.; VAN BURIK, J.; ENGELHARD, D.; KANZ, L.; SCHUMACHER, U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*, v. 35, n. 6, p. 1353-60, 1997.

EVANS, S. E. Coping with *Candida* infections. *Proc Am Thorac Soc*, v. 7, n. 3, p. 197-203, 2010.

FISHER, J. F.; SOBEL, J. D.; KAUFFMAN, C. A.; NEWMAN, C. A. *Candida* urinary tract infections—treatment. *CID*, v. 52, n. S6, p. S457-S466, 2011.

GUIVER, M.; LEVI, K.; Oppenheim B. A. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol*, v. 54, p. 362–366, 2001.

HOLMES, A. R.; CANNON, R. D.; SHEPHERD, M. G.; JENKINSON, H. F. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol*, v. 32, n. 1, p. 228-31, 1994.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *CID*, v. 48, p. 1695-1703, 2009.

HSU, M.; CHEN, K.; LO, H.; CHEN, Y.; LIAO, M.; LIN, Y.; Li, S. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 1071-1076, 2003.

KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 3, p. 35-40, 2006.

KHAN, Z.; MUSTAFA, A. S.; ALAM, F. F. Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect.*, v. 42, p. 290-295, 2009.

KHLIF, M.; MARY, C.; SELLAMI, H.; SELLAMI, H.; DUMON, H.; AYADI, A.; RANQUE, S. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. *Clin Microbiol Infect*, v. 15, p. 656-661, 2005.

KLINGSPOR, L.; JALAL, S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *CMI*, v. 12, n. 8, p. 745-753, 2006.

LAU, A.; HALLIDAY, C.; CHEN, S. C.-A.; PLAYFORD, E. G.; STANLEY, K.; SORRELL, T. C. Comparison of Whole Blood, Serum, and Plasma for Early Detection of Candidemia by Multiplex-Tandem PCR. *J. Clin. Microbiol*, v. 48, n. 3, p. 811-816, 2010.

LOEFFLER, J.; HENKE, N.; HEBART, H.; SCHMIDT, D.; HAGMEYER, L.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the Light Cycler system. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 586-590, 2000.

MAAROUFI, Y., HEYMANS, C.; BRUYNE, J.; DUCHATEAU, V.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; AOUN, M.; CROKAERT, F. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J. Clin. Microbiol*, v. 41, n. 7, p. 3293-3298, jul. 2003.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. *Rev Bras Anal Clin*, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MIRHENDI S. H., MAKIMURA K. PCR- Detection of *Candida albicans* in Blood Using a New Primer Pair to Diagnosis of Systemic Candidiasis. *Iranian J Publ Health*, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2003.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med*, v. 34, n. 3, p. 857-63, 2006.

PASSOS, X. S.; SALES, W. S.; MACIEL, P. J.; COSTA, C. R.; MIRANDA, K. C.; LEMOS, J. de A.; BATISTA, M. de A.; SILVA, M. do R. R. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 925-928, 2005.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PRYCE, T. M.; KAY, I. D.; PALLADINO, S.; HEATH, C. H. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 47, p. 487-496, 2003.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, v. 36, p. 288-305, 2012.

TARINI, N. M. A.; WAHID, M. H.; IBRAHIM, F.; YASMON, A.; DJAUZI, S. Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida* spp. *Med J Indones*, v. 19, n. 2, p. 83-88, 2010.