

Desenvolvimento de *primers* para identificação e diferenciação de espécies de *Candida* em secreção vaginal por PCR em tempo real (qPCR)

Sabine Elisa Jackisch¹
Alessandra Koehler²
Bruna Roberta Toiller²
Danieli Rosane Dallemole³
Valeriano Antonio Corbellini⁴
Alexandre Rieger⁵

RESUMO

Infecções fúngicas são cada vez mais frequentes, principalmente relacionadas ao sistema geniturinário e causadas por *Candida* spp. A PCR mostra-se promissora para o diagnóstico e para sua aplicação faz-se necessário o desenvolvimento de *primers*. Para isso obteve-se sequências da região ITS do rDNA 18S de 5 espécies de *Candida*, alinou-se e verificou-se os tamanhos dos *amplicons* e as *Tms* teóricas. Cepas padrão e cepas cultivadas foram utilizadas como referência. Além disso, 67 amostras de DNA de secreção vaginal foram submetidas a qPCR e os resultados foram confirmados em gel de agarose 2%. Os testes *in silico* demonstraram a capacidade do par de *primers* em diferenciar as cinco espécies, o que foi confirmado após a amplificação das cepas padrão e de amostras de secreção vaginal, identificadas em 20 amostras. O limite de detecção foi de 58 células/mL para as cepas padrão de *C. albicans* e *C. tropicalis* e 29 células/mL para *C. parapsilosis*. A sensibilidade da qPCR frente ao teste de crescimento microbiológico foi de 68%, com especificidade de 90%. A técnica possui potencial de diagnóstico, porém precisa ser otimizada para testes quantitativos.

Palavras-chave: Infecção geniturinária. qPCR. *Candida* spp. *Desing* de *primers*.

ABSTRACT

Fungal infections are increasingly frequent, mainly related to the genitourinary system and caused by *Candida* spp. The PCR is promising for the diagnosis and for its application it is necessary the development of primers. For this purpose 18S rDNA ITS region sequences were obtained from 5 *Candida* species, aligned and the sizes of the amplicons and the theoretical Tms were verified. Standard and cultivated strains were used as reference. In addition, 67 samples of vaginal secretion DNA were subjected to qPCR and the results were confirmed on 2% agarose gel. In silico tests demonstrated the ability of the pair of primers to differentiate the five species, which was confirmed after amplification of standard samples and vaginal secretion (it was possible to identify the species in 20 samples). The detection limit was 58 cells/mL for the standard *C. albicans* and *C. tropicalis* strains and 29 cells/mL for *C. parapsilosis*. The sensitivity of qPCR to the microbiological growth test was 68%, with specificity of 90%. The technique has diagnostic potential, but needs to be optimized for quantitative tests.

¹Aluna do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.

²Alunas do Curso de Ciências Biológicas da Universidade de Santa Cruz do Sul.

³Técnica do Laboratório de Histologia e Patologia da Universidade de Santa Cruz do Sul.

⁴Professor do Departamento de Química e Física na Universidade de Santa Cruz do Sul.

⁵Professor do Departamento de Biologia e Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. <rieger@unisc.br>

Keywords: Genitourinary infection. qPCR. *Candida* spp. Primer design.

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são cada vez mais frequentes, principalmente aquelas relacionadas ao sistema genitourinário e cujo agente causal são as leveduras do gênero *Candida*. A falta de identificação correta dos patógenos e o uso de tratamentos empíricos vêm tornando-se os principais fatores envolvidos com o aumento da resistência dessas espécies aos antifúngicos, aliada à resistência intrínseca já existente.

O desenvolvimento de técnicas de detecção mais sensíveis e de rápida aplicação em relação ao método tradicional de cultivo microbiológico pode auxiliar na identificação do agente patogênico, permitindo que o tratamento seja espécie-específico, o que reduz a morbidade e mortalidade por infecções fúngicas. Nesse contexto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostra-se como uma promissora ferramenta de diagnóstico, pois o resultado é gerado em poucas horas, com especificidade, reprodutibilidade e alta sensibilidade.

A primeira etapa para a aplicação da técnica é o *design* de *primers* capazes de amplificar o material genético dos patógenos de interesse e diferenciar entre espécies do mesmo grupo taxonômico. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um par de *primers* e padronizar a técnica de qPCR para detecção de espécies de *Candida* em secreção vaginal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A candidíase e, principalmente, a candidemia são infecções fúngicas emergentes e de difícil tratamento na prática clínica. Os desafios vão desde a identificação do agente etiológico até a escolha do tratamento adequado, principalmente porque alguns isolados clínicos são resistentes aos antifúngicos (MULU et al., 2013).

Em 2013, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) divulgou um documento contendo a lista de agentes patológicos resistentes a antibióticos nos Estados Unidos. Nesse documento a espécie *Candida albicans* está descrita como resistente a fluconazol, o que é classificado como uma ameaça grave à saúde. Além disso, é relatado que outras espécies do gênero também são resistentes a antifúngicos de primeira e segunda ordem

e são responsáveis por 46.000 infecções a cada ano, sendo que 220 correspondem a casos fatais.

No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos e estão inseridos em artigos científicos com dados parciais, pois não há um programa de notificação nacional de doenças fúngicas (GIACOMAZZI et al., 2016). No entanto, em 2016, Giacomazzi e colaboradores analisaram dados bibliográficos juntamente com dados coletados em hospitais brasileiros, estimando que mais de 3,8 milhões de pessoas sofrem com doenças fúngicas no país a cada ano, das quais 2,8 milhões têm como patógeno as leveduras do gênero *Candida*.

Dessa forma, a identificação precoce das espécies de *Candida* é necessária, especialmente em pacientes imunossuprimidos, com neoplasias malignas e internados em unidades de tratamento intensivo (UTI), pois são mais suscetíveis a infecções oportunistas. A demora no diagnóstico e a administração de terapia tripla, constituída por antibióticos (para bactérias gram-negativas e gram-positivas) e antifúngicos, antes mesmo da identificação do patógeno, contribui para o incremento dos custos hospitalares, demora no tratamento e aumento da resistência fúngica (YAPAR, 2014; BEN-AMI et al., 2012).

O diagnóstico convencional de candidíases/candidemias inclui cultura de sangue, exame microscópico e identificação bioquímica (BOUCHARA et al., 1996; ALAM et al., 2014), sendo testes vagarosos e pouco precisos. Devido às limitações das técnicas convencionais para diferenciar as espécies, novas metodologias vêm surgindo. Estudos que descrevem ensaios de diagnóstico de *Candida* por detecção do DNA fúngico através da PCR são cada vez mais recorrentes. No entanto, essas técnicas ainda não atingiram sensibilidade e especificidade necessárias para serem definidas como metodologias padrão (AVNI; LEIBOVICI; PAUL, 2011).

Diversos testes de qPCR já foram desenvolvidos para a detecção do DNA de espécies de *Candida* (ARVANITIS et al., 2014; DUNYACH et al., 2008; HSU et al., 2003). Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual se utilizou três conjuntos de *primers* já descritos na literatura, foi verificado que estes apresentavam problemas de especificidade, além de serem necessárias várias reações de qPCR para a determinação da espécie (KOEHLER et al., 2016).

Diante dos resultados do estudo anterior, referenciado acima, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um único conjunto de *primers* capaz de identificar e diferenciar cinco espécies de *Candida* em amostras de secreção vaginal com apenas uma reação de qPCR, reduzindo os custos e o tempo de obtenção dos resultados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Construção dos *primers*

Obteve-se no banco de dados *GenBank* seqüências da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA 18S de cinco espécies do gênero *Candida*: *C. albicans* (KU729070.1) *C. glabrata* (KU729066.1), *C. krusei* (KU729099.1), *C. parapsilosis* (KU729052.1) e *C. tropicalis* (KU729064.1). Essas seqüências foram alinhadas no *software Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), sendo selecionadas as áreas conservadas comuns entre as espécies. A partir disso, construiu-se o par de *primers* CanF 5'-GGCATGCCTGTTTGAGCGTC-3' e CanR 5'-TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTA-3' (Figura 1).

Figura 1 – Alinhamento das seqüências (*primers* marcados em vermelho)

```

gb|KU729099.1| TCTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTT
gb|KU729066.1| CTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT
gb|KU729052.1| CTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT
gb|KU729070.1| CTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTT
gb|KU729064.1| CTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT
***** ** *
gb|KU729099.1| CCATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAGAGCGTCGGA
gb|KU729066.1| CCTTCTCAAACACGTTGTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTCGTTTTTGAGTTAACTTGAA
gb|KU729052.1| CTCCCTCAAACCTCTGGGTTTGGT-GTTGAGCGATACGCTGGGTTTGCTTGAAAGAAAGG
gb|KU729070.1| CTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGT-GTTGAGCAATACGACTTGGGTTTGCTTGAAAGACG
gb|KU729064.1| CTCCCTCAAACCCCGGTTTGGT-GTTGAGCAATACGCTAGGTTTGTGTAAGAAATTT
* ** *
gb|KU729099.1| GCTGCGACTCGCCTGAA-----AGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAAGCTAGACTTT
gb|KU729066.1| ATTGTAGGCCATATCAGTATGTGGGACACGAGCGCAAGCTTCTCTATTAACTGCTGCTC
gb|KU729052.1| CGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCA-----
gb|KU729070.1| GTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCTAACCAA--AAACATTGCT-
gb|KU729064.1| AACGT-----GGAAACTTATTTAAGCGACTTAGGTTTATCAA--AAACGCTTAT-
gb|KU729099.1| TTTTCAGGGACGCTTGCGGG-----
gb|KU729066.1| GTTTGCGCGAGCGGGGGGTTAATACTGTATTAGGTTTTACCAACTCGGTGTTGATCTA
gb|KU729052.1| ----CTCATTGGTA-----
gb|KU729070.1| ---TGCGGCGGTAAC-----
gb|KU729064.1| ---TTGCTAGTGGC-----
gb|KU729099.1| -----C-----CGAGAGCGAGTGTTGCGAGACAACAAAAAGCTCGACCT
gb|KU729066.1| GGGAGGGATATGTGAGTGTTTTGTGCGTGCTGGGCAGACAGACGCTTTAAGTTTGACCT
gb|KU729052.1| -----CAAACCCAAAATTCTTCAAATTCGACCT
gb|KU729070.1| -----GTCCACCACGTATATCTTCAAACCTTGACCT
gb|KU729064.1| -----CACCACAATTTATTTCAATACTTTGACCT
** *
gb|KU729099.1| CAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA
gb|KU729066.1| CAAATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA
gb|KU729052.1| CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAA---
gb|KU729070.1| CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATA-
gb|KU729064.1| CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA
*****

```

Após, os *primers* foram submetidos a alinhamento com as sequências das cinco espécies de *Candida* para verificar se os *amplicons* formados poderiam identificar e diferenciar as espécies. As temperaturas de *melting* (T_m) dos *amplicons* teóricos foram verificadas no software *uMELT* (<https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>). Além disso, os *primers* foram testados *in silico* nos softwares *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e *IDT Oligo Analyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), para verificar a especificidade e a formação de estruturas como dímeros, respectivamente.

3.2. Amostras e extração de DNA

Cepas padrão de *C. albicans* (NEWP 0031), *C. glabrata* (ATCC 2001) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), além de duas cepas cultivadas de *C. krusei* e *C. tropicalis* cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foram utilizadas como referência. A extração de DNA das cepas padrão seguiu o protocolo *in house* de Burke, Dawson e Stearns (2000) modificado por Lutz et al. (2013). Após a extração as amostras foram conservadas a -20°C para análises posteriores.

Além disso, foram utilizadas no estudo 67 amostras de DNA de secreção vaginal, sendo 33 positivas e 34 negativas para o crescimento microbiológico em ágar, fornecidas pelo grupo de pesquisa “Diagnóstico de Infecções Genitourinárias por FT-IR” da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

3.3. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

Curvas de *primers*, contendo três concentrações diferentes ($0.2\mu\text{M}$, $0.4\mu\text{M}$ e $0.6\mu\text{M}$) foram preparadas para cada uma das 5 cepas de referência. A partir disso, definiu-se a concentração de $0.2\mu\text{M}$ como a mais adequada para uma amplificação eficiente, sem excesso de *primers*, o que poderia ocasionar a formação de dímeros e anelamentos inespecíficos (BUSTIN et al., 2009).

O limite de detecção da técnica foi avaliado a partir de 15 diluições seriadas no intervalo de 60.000 células/mL a 3 células/mL das amostras de DNA de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A especificidade dos *primers* foi testada frente à DNA de *Staphylococcus* sp. e DNA humano.

Todas as cepas padrão e amostras foram submetidas à reação de qPCR no equipamento *DTprime (DT-96) Real-time Detection Thermal Cycler* (DNA-Technology[®]). O mix de reação continha 4µL de *5X Hot FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix* (Solis BioDyne[®]), 0,2 µM do *primer* senso, 0,2 µM do *primer* antisenso e 2µL de amostra de DNA, completando com água ultrapura para uma reação com volume final de 20 µL. As amplificações ocorreram após um ciclo inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 52°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. A curva de dissociação seguiu 100 ciclos com variação de 0,5°C de temperatura por ciclo de 15 segundos no intervalo de 40°C a 90°C. Os resultados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio, visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta 260nm.

Ainda, realizou-se teste de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia e classificação incorreta de acordo com os critérios de Guimarães (1985), para avaliar o desempenho da qPCR frente ao cultivo microbiológico.

4. RESULTADOS

Os testes *in silico* demonstraram a capacidade do conjunto de *primers* em diferenciar as cinco espécies, pois os *amplicons* teóricos gerados eram de tamanhos distintos (223pb para *C. albicans*, 304pb para *C. glabrata*, 233pb para *C. krusei*, 196pb para *C. parapsilosis* e 216pb para *C. tropicalis*), assim como as *Tms* teóricas (90,5°C para *C. albicans*, 91°C para *C. glabrata*, 92,5°C para *C. krusei*, 88°C para *C. parapsilosis* e 87°C para *C. tropicalis*).

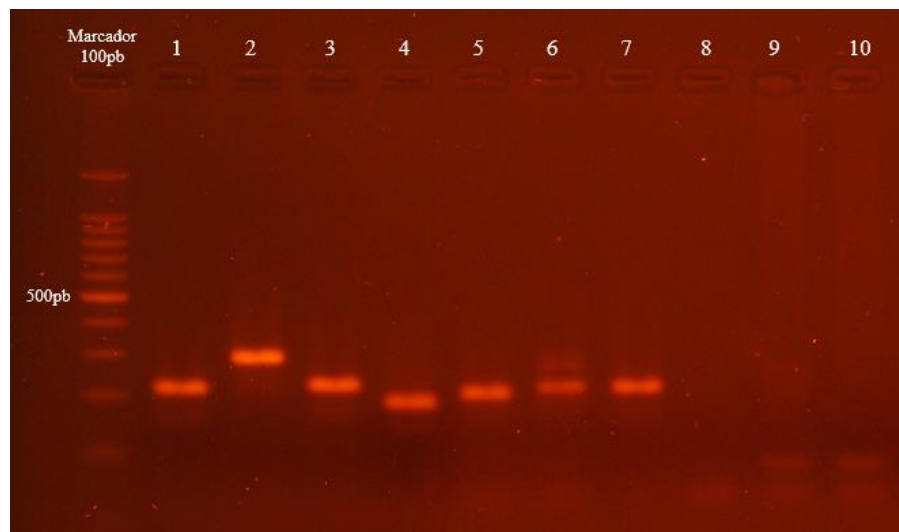
Nas análises de especificidade, não ocorreram alinhamentos com sequências de outras leveduras além do gênero *Candida* e outros organismos, o que foi confirmado pela falta de amplificação na qPCR contendo material genético humano e da bactéria *Staphylococcus* sp. (Figura 2). Além disso, alinhando-se os *primers* em sequências da região ITS do rDNA 18S de diversas cepas das cinco espécies, verificou-se que estes são complementares a elas, mostrando sua ampla capacidade de identificação. Em relação à análise de formação de homo e heterodímeros e *hairpins*, os *primers* construídos não exibem formação significativa dessas estruturas secundárias (dados não mostrados).

O limite de detecção da técnica foi de aproximadamente 58 células/mL para as cepas padrão de *C. albicans* e *C. tropicalis* e 29 células/mL para *C. parapsilosis*. Amostras de DNA

de secreção vaginal e de cepas padrão apresentaram amplificação, além de temperaturas de *melting* (T_m). No entanto, as curvas de dissociação das cepas padrão diferiram da T_m teórica, mas permitiram a distinção entre as espécies (Figura 3).

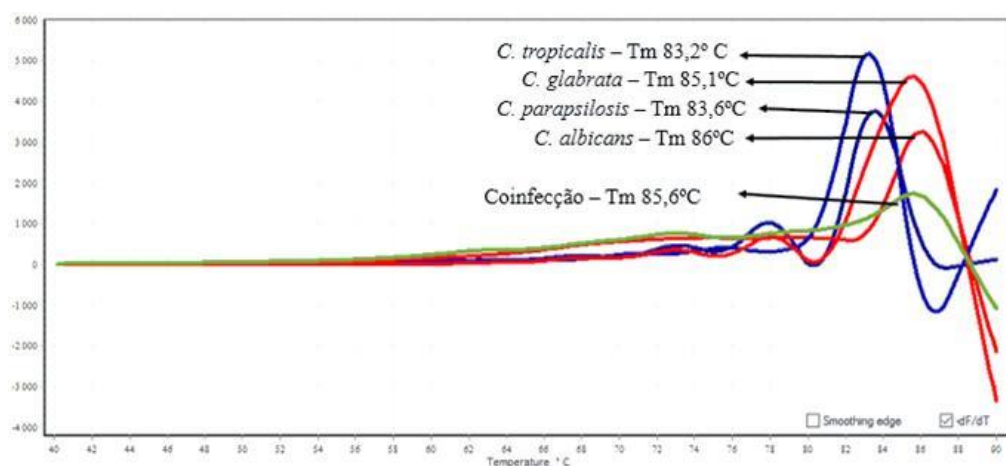
Apenas a curva de *melting* de *C. krusei* não apresentou dissociação característica. Contudo, após a eletroforese em gel agarose foi possível discriminá-la das demais espécies (Figura 2).

Figura 2 - Gel de agarose com o padrão de diferenciação das cinco espécies de *Candida*



1 – *C. albicans*; 2 – *C. glabrata*; 3 – *C. krusei*; 4 – *C. parapsilosis*; 5 – *C. tropicalis*; 6 – Coinfecção; 7 – Controle positivo; 8 – Controle negativo; 9 – DNA humano; 10 – DNA bacteriano.

Figura 3 - Curvas de *melting* características para cada uma das espécies de *Candida*



Comparando os resultados obtidos nos cultivos microbiológicos com a qPCR, identificou-se, dentre as 33 positivas para leveduras, 31 com amplificação de alguma espécie do gênero *Candida*. Nas 34 amostras negativas para leveduras, ocorreu amplificação

característica de alguma espécie do gênero em 14 delas, enquanto que em 20 amostras não houve detecção (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação da identificação do gênero *Candida* pela Microbiologia e qPCR

	qPCR Positivo		qPCR Negativo		Total
	n	%	n	%	
Microbiologia Positiva ^a	31	(93,9)	2	(6,1)	33
Microbiologia Negativa	14	(41,2)	20	(58,8)	34

^a Com crescimento de leveduras em ágar identificadas como gênero *Candida*.

Em vinte amostras positivas para a qPCR foi possível reconhecer a espécie presente na secreção vaginal, após confrontar os tamanhos de *amplicons* no gel de agarose e o valor de *Tm* com os resultados das cepas padrão. Dezesete amostras apresentavam curvas de dissociação incompatíveis com as *Tms* das cepas padrão e mais de um fragmento em gel de agarose, indicando coinfeção (Figuras 2 e 3). Algumas espécies não foram identificadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Diferenciação das espécies de *Candida* pela qPCR

Espécies	qPCR			
	Microbiologia Positiva ^a		Microbiologia Negativa	
	N	%	n	%
<i>C. albicans</i>	9	27,3	1	2,9
<i>C. glabrata</i>	3	9,1	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	1	3,0	1	2,9
<i>C. tropicalis</i>	5	15,2	2	5,9
<i>C. krusei</i>	2	6,1	-	-
Outras**	11	33,3	10	29,4

^a Com crescimento de leveduras identificadas como gênero *Candida*

**Apresentou perfil de amplificação diferente das cepas padrões.

A validade da qPCR como diagnóstico foi medida através do teste de sensibilidade frente ao crescimento microbiológico obtendo resultado de 68%, enquanto que o teste demonstrou 90% de especificidade. A prevalência de *Candida* spp. no grupo de estudo foi de 67,1%, com VPP igual a 93,9% e VPN de 58,8%. O valor da acurácia ficou em 76,1% na classificação correta e a classificação incorreta ficou em 23,8% (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados para cálculos dos testes de VPP, VPN, acurácia e classificação correta e incorreta

qPCR	Microbiologia		Total
	Presente	Ausente	
Positiva	31	2	33
Negativa	14	20	34
Total	45	22	67

5. DISCUSSÃO

Análises prévias *in silico* são instrumentos para delinear novas técnicas de diagnóstico. No entanto, os dados obtidos na prática podem divergir dos resultados teóricos. Isso foi constatado no presente estudo quanto aos tamanhos de *amplicons* e *Tms*. Essas discrepâncias, segundo Rasmussen, Saint e Monis (2007) estão associadas às condições das reações reais, as quais não são totalmente mimetizadas nos *softwares*. O corante intercalante e as concentrações de sais, por exemplo, provocam alterações nas temperaturas de dissociação. As diferenças nos tamanhos dos *amplicons* podem ocorrer devido a variações genéticas entre cepas da mesma espécie ou até mesmo por incoerências nas sequências depositadas nos bancos de dados. Apesar dessas inconsistências, a qPCR possibilitou a detecção qualitativa e identificação de *Candida* spp. mesmo quando presente em baixas concentrações.

Recentemente, Sampath et al. (2016) realizaram um estudo avaliando o uso de PCR *multiplex* na identificação de quatro espécies de *Candida* em amostras de enxágue oral concentrado. Para isso, foram utilizados quatro *primers* senso espécie-específicos e um *primer* antisense universal, diferentemente do presente trabalho, no qual apenas um par de *primers* foi usado para identificação de ao menos cinco espécies de *Candida*. Diversos outros estudos também já desenvolveram metodologias para identificação a partir de PCR ou técnicas derivadas (qPCR, qPCR-HRM, probe-based-qPCR), entretanto são utilizados mais de um par de *primers*, como citado acima, ou metodologias que elevam o custo para obtenção dos resultados (FRICKE et al., 2010; LEHMANN et al. 2011; NEMCOVA et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho tem como diferencial a utilização de um único par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para diagnóstico de 5 espécies de *Candida*, em uma única reação, além de detectar casos de coinfeção. No entanto, nosso estudo apresenta algumas limitações. Apesar de ter sido realizada qPCR e de as temperaturas de *melting* terem sido diferentes para cada espécie, foi necessário realizar eletroforese em gel de agarose para

confirmar a identificação a partir do tamanho dos *amplicons*. Cabe destacar, porém, que neste trabalho foram realizadas apenas as padronizações iniciais da técnica. A partir de uma maior otimização acredita-se que será possível identificar as espécies diretamente após a realização da qPCR pela análise das curvas de *melting*, que já mostraram ter padrões diferentes. Para isso, deve-se verificar a reprodutibilidade da *Tm* para uma mesma espécie, comparando também a *Tm* gerada pelo *primer* para outras espécies do gênero que ainda não foram testadas. Além disso, poderia ser utilizada a técnica de qPCR-HRM, que fornece temperaturas de *melting* mais precisas. De fato, conforme destacam Fricke et al. (2010), já há diversos trabalhos utilizando PCR para identificação de espécies de *Candida*, porém esses métodos necessitam de uma maior padronização, como as citadas acima, para serem utilizados na rotina clínica.

A capacidade de identificar coinfeções também é um aspecto positivo do nosso estudo, uma vez que a elucidação das espécies é importante para definir o tratamento. O reconhecimento de espécies que coabitam/coinfecam a secreção vaginal parece ser negligenciado, visto que esses dados são escassos na literatura. No entanto, Yan et al. (2011) e Sampath et al. (2016) relatam infecções por múltiplas espécies de *Candida* em amostras de secreções orais de pacientes com diabetes e Síndrome de Sjögren e apontam dificuldades no tratamento.

Comparando os resultados obtidos pelo método de referência (cultivo microbiológico) com a qPCR observou-se que o teste tem potencial para diagnóstico, pois este demonstrou alta especificidade (90%) e VPP (93,9%), indicando que consegue detectar amostras com infecção. Contudo, há a necessidade de aperfeiçoá-lo, pois a sensibilidade foi de apenas 68% e o valor preditivo negativo de 58,8% e isso reflete na ocorrência de amplificação em amostras negativas na microbiologia (em um total de 34, 14 delas foram positivas na qPCR). O aperfeiçoamento pode ser feito pelo teste dos *primers* contra outros patógenos e contra a microbiota natural presente em amostras de secreção vaginal, que também poderiam estar sendo amplificadas. Além disso, devem ser testadas diferentes diluições para que seja montada uma curva para realização de um teste quantitativo. Isso permitiria o estabelecimento de um limite entre o que é microbiota natural e o que é infecção de fato, evitando falsos positivos.

Os mesmos problemas ocorreram no estudo de Mutschlechner et al. (2016), no qual afirma-se que é difícil interpretar clinicamente a amplificação de amostras negativas para *Candida* em cultura. Possivelmente, isso decorre da alta capacidade da técnica de qPCR, que

pode detectar até mesmo a microbiota encontrada normalmente em amostras de secreção vaginal, como é o caso do presente estudo. Esta é outra limitação da metodologia aqui desenvolvida, uma vez que nos testes iniciais realizados os *primers* não mostraram poder de detecção quantitativa pela qPCR. A partir da quantificação seria possível definir um limiar que determina o que é normal e o que é patogênico nas amostras testadas, conforme citado acima. São necessárias validações posteriores para verificar o poder quantitativo dos *primers* construídos. Além disso, um teste quantitativo é importante para acompanhar a resposta ao tratamento da infecção (WATZINGER; EBNER; LION, 2006).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o conjunto de *primers* desenvolvido nesse estudo apresenta potencial para a detecção e diferenciação, em uma única reação e com a confirmação em gel de agarose, de pelo menos cinco espécies de *Candida* em amostras de secreção vaginal. A formação de *amplicons* com tamanhos diferentes daqueles esperados para as cepas padrão testadas demonstra que, se otimizado, o mesmo conjunto de *primers* pode ser aplicado para a identificação de outras espécies do gênero.

Além disso, a capacidade de amplificação do DNA de leveduras extraído de uma amostra biológica tão complexa como a secreção vaginal, permite extrapolar o uso da metodologia do presente trabalho para a identificação desses patógenos em outros fluidos. No entanto, testes de padronizações são necessários, antes da utilização desse método para diagnóstico qualitativo. Para isso também é fundamental correlacionar a amplificação de material genético de *Candida* nas amostras de secreção vaginal e a presença/ausência de sintomas a fim de determinar o limite de detecção da microbiota natural e as possíveis infecções.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), ao CNPq, ao Laboratório de Micologia da UFRGS, ao grupo de pesquisa “Diagnóstico de Infecções Genitourinárias por FT-IR”, ao Laboratório de Histologia e Patologia (UNISC), ao Laboratório de Genética e Biotecnologia (UNISC) e ao PGTEC - Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico e de Alternativas Terapêuticas para Câncer e Infecções Oportunistas, pelo apoio e oportunidade de realização da pesquisa. Agradecemos também a Bruna Lutz e

ao Clairton Edinei dos Santos, pela contribuição a esta pesquisa através da concessão de dados parciais que acrescentaram muito ao presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. Z. et al. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, New York, v.30, n.5, p.1437–1451, 2014. Acesso em: 24 fev. 2017. DOI: 10.1007/s11274-013-1574-z
- ARVANITIS, M. et al. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.27, n.3, p.490–526, 2014. Acesso em: 23 fev. 2017. DOI: 10.1128/CMR.00091-13
- AVNI, T.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.49, n.2, p.665-70, 2011. Acesso em: 02 mar. 2017. DOI: 10.1128/JCM.01602-10
- BEN-AMI, R. et al. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Washington, v.56, n.5, p.2518-2523, 2012. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/56/5/2518.full>. Acesso em: 27 fev. 2017. DOI: 10.1128/AAC.05947-11
- BOUCHARA, J.P. et al. Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. *Clinical Microbiology and Infection*, New York, v.2, n.3, 202–208, 1996. Acesso em: 13 fev. 2017. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1198-743X\(14\)65143-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1198-743X(14)65143-0)
- BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. *Methods in Yeast Genetics: a Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2000.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009. Acesso em: 02 mai. 2017. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- CDC, Center of Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance Threats in the United States, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 05 mar. 2017.
- DUNYACH, C. et al. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, New York, v.60, n.3, p.263–271, 2008. Acesso em: 01 mar. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.014>
- FRICKE, S. et al. A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *J Appl Microbiol*. V.109, n.4, p. 1150-8, 2010. Acesso em: 27 fev. 2017. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04736.x

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serous human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, Malden, v.59, n.3, p.145-150, 2016. Acesso em: 26 fev. 2017. DOI: 10.1111/myc.12427

GUIMARÃES, M. C. S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.18, n.2, p.117-120, 1985. Acesso em: 04 mar. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821985000200009>

HSU, M. C. et al. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology*, London, v.52, p.1071–1076, 2003. Acesso em: 04 mar. 2017. DOI: 10.1099/jmm.0.05302-0

KOEHLER, A. et al. Identificação de três espécies de *Candida* por PCR em tempo real. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, v.6, n.1, p.58-73, 2016. Acesso em: 05 mar. 2017. DOI: 10.17058/rjp.v6i1.7341

LEHMANN, L. E. et al. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast® real-time PCR. *PLoS One*, San Francisco v.6, n.2, p.e17146, 2011. Acesso em: 05 mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017146>

LUTZ, B. S. et al. Padronização das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para diagnóstico de *Candida albicans*. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, v.3, n.1, p. 51-66, 2013. Acesso em: 26 fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017146>

MULU, A. et al. Frequent detection of ‘azole’resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. *BMC Infectious diseases*, London, v.13, n.1, p.82, 2013. Acesso em: 26 fev. 2017. DOI: 10.1186/1471-2334-13-82

MUTSCHLECHNER, W. et al. Mammary candidiasis: molecular-based detection of. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Wien, v.35, n.8, p.1309-1313, 2016. Disponível em: <http://connection.ebscohost.com/c/articles/116858760/mammary-candidiasis-molecular-based-detection-candida-species-human-milk-samples>. Acesso em: 26 fev. 2017.

NEMCOVA, E. et al. Rapid Identification of Medically Important *Candida* Isolates Using High Resolution Melting Analysis. *PLoS One*, San Francisco, v.10, n.2, p.e0116940, 2015. Acesso em: 26 fev. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0116940

RASMUSSEN, J. P.; SAINT, C. P.; MONIS, P. T. Use of DNA melting simulation software for in silico diagnostic assay design: targeting regions with complex melting curves and confirmation by real-time PCR using intercalating dyes. *BMC Bioinformatics*, London, v.8, n.1, p.107, 2007. Acesso em: 03 mar. 2017. DOI: 10.1186/1471-2105-8-107

SAMPATH, A. et al. A sensitive and a rapid multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Candida* species in concentrated oral rinse specimens in patients with diabetes. *Acta Odontologica Scandinavica*, Berlin, v.75, n.2, p. 1-10, 2016. Acesso em: 23 fev. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00016357.2016.1265146>

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, v.27, n.2, p.254-298, 2006. Acesso em: 05 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.001

YAN, Z.; YOUNG, Andrew L.; HUAYAN, Hong; et al. Multiple Oral *Candida* Infections in Patients with Sjögren's Syndrome - Prevalence and Clinical and Drug Susceptibility Profiles. *The Journal of rheumatology*, Toronto, v.38, n.11, p.2428-2431, 2011. Acesso em: 05 mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3899/jrheum.100819>

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, Aberdeen, v.10, n.95, p.105, 2014. Acesso em: 05 mar. 2017. DOI: 10.2147/TCRM.S40160

Como citar este documento: JACKISCH, Sabine Elisa et al. Desenvolvimento de primers para identificação e diferenciação de espécies de *Candida* em secreção vaginal por PCR em tempo real (qPCR). **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 7, n. 1, jan. 2017. ISSN 2237-048X. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/9337>>. Acesso em: ... doi: <http://dx.doi.org/10.17058/rjp.v7i1.9337>.