VII EAITI 2017 ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA | 09 e 10 de novembro de 2017

# ÚTILIZAÇÃO DA REGIÃO IGS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Candida albicans* ATRAVÉS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS DE OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO.

Anna Paula Silva Olak (PIBITI/CNPQ/Universidade Estadual de Londrina), Lucy Megumi Yamauchi, lionylmy@uel.br

Universidade Estadual de Londrina/Departamento de Microbiologia

**Área: Microbiologia Aplicada**

Palavras Chave: *Candida albicans, IGS, diagnóstico molecular.*

## Resumo

Nesse trabalho, os iniciadores para a região espaçadora intergênica (IGS) 2 do DNA ribossomal de *C. albicans* foram delineados e testados quanto a sua especificidade, utilizando diferentes microrganismos e a sensibilidade dos iniciadores utilizando diferentes concentrações de DNA genômico obtido por extração por fervura, por fenol/clorofórmio (F/C) e por PCR direta. Os resultados mostram que a reação de amplificação com os iniciadores mostra-se sensível e específica para *C. albicans*.

## Introdução

As espécies de *Candida* são microrganismos comensais, que podem se tornar invasivas em pacientes imunossuprimidos[1]. Os métodos de identificação da levedura baseiam-se em testes fenotípicos, que são demorados e podem não dar o diagnóstico correto[2], podendo acarretar na resistência aos antifúngicos. A identificação molecular se mostra mais rápida e precisa, principalmente quando a região DNA ribossomal é utilizada, pois se mostra mais precisa[3]. O objetivo foi verificar a sensibilidade e especificidade dos iniciadores de *C. albicans* em reações de amplificação do DNA genômico.

## Material e Métodos

Todos os microrganismos (tabela 1) foram crescidos em Sabouraud dextrose agar a 37 ºC por 24 h. Para a extração de DNA por fervura, 1 mL da cultura foi ressuspendida em água ultrapura e colocada à 95°C por 5 minutos. O sobrendante contendo o DNA foi reservado. Para o método de extração por F/C, a suspensão celular foi lisada com tampão TENTS e purificada com soluções de F/C. O DNA foi lavado em etanol e ressuspendido em água ultra-pura.

Para a reação foram utilizados 100 ng de DNA ou uma diluição seriada de células, dNTP, oligonucleotídeos específicos, tampão de PCR 10x e *Taq* polimerase. As incubações foram: 3 min a 95 ºC, 1 min a 95 ºC, 30 seg a 70 ºC, 1 min a 72 ºC, 4 min a 72 ºC, por 35 ciclos. Os amplicons foram separados em eletroforese em gel de agarose 1,5%, e visualizadas em um transiluminador de luz UV.

## Resultados Obtidos

Os ensaios de PCR para especificidade mostram que só houve amplificação para *C. albicans*, e não para as outras espécies de *Candida* e outros fungos testados. (tabela 1) Para os ensaios envolvendo diferentes métodos de extração, houve amplificação de até 10 células/mL na extração por fervura, no processo de PCR direta amplificou até 50 células/reação e no processo de extração por F/C houve amplificação de até 1pg/mL de DNA. Interessantemente é que utilizando a PCR direta o processo de identificação levou 27,5 horas, já com a técnica de fervura, 29 horas e o procedimento levou 55 horas quando utilizamos a extração F/C.

**Tabela 1.** Especificidade das reações de amplificação dos iniciadores de *Candida albicans*

| Microrganismos | Origem | CaNTS2 |
|---|---|---|
| *C. albicans* ATCC 26790 | Fiocruz[a] | + |
| *C. tropicalis* ATCC 28707 | Fiocruz[a] | - |
| *C. parapsilosis* ATCC 1975 | Fiocruz[a] | - |
| *C. glabrata* PT 518 | UMinho[b] | - |
| *C. krusei* ATCC 520 | Fiocruz[a] | - |
| *C. dubliniensis* ATCC 974 | Fiocruz[a] | - |
| *C. guilliermondii* PT822 | UMinho[b] | - |
| *C. lusitaneae* PT1007 | UMinho[b] | - |
| *C. metapsilosis* PT2263 | UMinho[b] | - |
| *C. orthopsilosis* PT2259 | UMinho[b] | - |
| *C. bracarensis* PT1217 | UMinho[b] | - |
| *C. neoformans* ATCC 66031 | Fiocruz[a] | - |
| *C. gattii* ATCC 56990 | Fiocruz[a] | - |
| *P. brasiliensis* | EJV[c] | - |
| *Sporothrix* sp. | EJV[c] | - |
| *H. capsulatum* IMT/HC128 | EJV[c] | - |
| *T. rubrum* | EJV[c] | - |
| *A. niger* | EJV[c] | - |
| *A. fumigatus* | EJV[c] | - |

[a]Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz.
[b]UMinho: Universidade de Minho, Braga, Portugal.
[c]Dr. Emerson José Venancio laboratory.

## Conclusão

Os iniciadores CaNTS2 amplificam especificamente *Candida albicans*. Não há reatividade cruzada com outras espécies de *Candida* ou outros fungos.

Os métodos alternativos de extração do DNA são aplicáveis na amplificação do DNA de *C. albicans*.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa, à orientadora Lucy Megumi Yamauchi Lioni, à PROPPG e à UEL, pelo incentivo e oportunidade.

[1] Pfaller MA, Diekema, DJ. Clin Microbiol Rev. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. 2007; 20(1):133-163..

[2] Alam MZ, Alam Q, Jiman-Fatani A, Kamal MA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Akram M, Haque A. Candida identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. World J Microbiol Biotechnol. 2014, 30(5): 1437-51.

3 Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. Clin Chest Med. 2009, 30(2): 391-408.