



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Eliane Olmo Pinheiro

**Identificação genotípica e fenotípica de leveduras de importância
clínica para autenticação em banco de leveduras de Instituição
Militar de Saúde**

Rio de Janeiro

2019

Eliane Olmo Pinheiro

Identificação genotípica e fenotípica de leveduras de importância clínica para autenticação em banco de leveduras de Instituição Militar de Saúde

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P654 Pinheiro, Eliane Olmo.
Identificação genotípica e fenotípica de leveduras de importância clínica para autenticação em banco de leveduras de Instituição Militar de Saúde / Eliane Olmo Pinheiro. – 2019.
139 f.

Orientador: Paulo Murillo Neufeld

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Candida - Teses. 2. Hemocultura. 3. Infecção hospitalar - Teses. 4. Leveduras. I. Neufeld, Paulo Murillo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-022.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Eliane Olmo Pinheiro

Identificação genotípica e fenotípica de leveduras de importância clínica para autenticação em banco de leveduras de Instituição Militar de Saúde

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de março de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld (Orientador)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

A DEUS, que é criador e mantenedor de todas as coisas que se importou e se inclinou para mim, me concedendo a dádiva de realizar mais este sonho.

AGRADECIMENTOS

Expressar em palavras os sentimentos vivenciados durante a construção e realização deste sonho não foi fácil. A conciliação entre trabalho, vida pessoal e estudos tornou essa caminhada muito desafiadora, mas a presença de pessoas especiais em minha vida me fortaleceu e possibilitou essa conquista. Este espaço é dedicado a vocês:

Agradeço, incondicionalmente, ao meu marido Marcos, meu parceiro de uma vida, meu amigo, colaborador e revisor nesse trabalho, sem o qual seria impossível a conclusão do mesmo. Em todos os momentos difíceis desse projeto, ele esteve comigo e me ajudou a mudar os contextos desfavoráveis. Divido com ele essa conquista.

Agradeço aos meus pais Adalto e Elizete por me ensinarem desde cedo a importância do estudo. Com muito sacrifício e renúncias pessoais me permitiram conquistar a formação universitária que, a partir daí, me permitiu caminhar com meus próprios passos, na realização de outros sonhos.

Agradeço a minha irmã Kelly e meu cunhado Francisco pela amizade, incentivo e exemplo, mostrando que seria possível dar um passo a mais no caminho dessa vitória e, especialmente, por me presentear com uma linda sobrinha, Manuela, que traz muita alegria e inspiração para nossas vidas.

Agradeço a minha sogra Idair, que considero uma segunda mãe, por suas orações e carinho.

Faço uma homenagem especial ao meu sogro Sebastião *"in memoriam"*, sempre muito atencioso e preocupado com a nossa caminhada espiritual.

Agradeço a toda família do meu marido, a qual eu muito me orgulho de fazer parte.

Agradeço ao meu orientador Prof. Paulo Murillo Neufeld, que me apresentou a área fascinante da Micologia. Seus ensinamentos me permitiram ser uma profissional mais capacitada e, por isso, muitos doentes foram auxiliados, por meio de corretos diagnósticos micológicos cuja base foram os conhecimentos adquiridos. Me sinto honrada por essa convivência profissional e de sincera amizade.

Agradeço ao Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza pela disponibilidade em fazer parte da banca avaliadora e também por fazer parte de vitórias conquistadas por meu marido. Todo meu respeito e admiração a esse profissional brilhante e dedicado ao ensino. Agradeço também pelo carinho, que lhe é peculiar, dispensado a nós, alunos.

Aproveito a oportunidade para agradecer a todas as Instituições e pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho:

Ao Programa de Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, sob a direção do Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, pela competência e missão de transferir o conhecimento e formar profissionais mais habilitados e qualificados para o desempenho das atividades profissionais.

Agradeço a todos os professores e demais profissionais que nos trataram de forma respeitosa, permitindo um período muito agradável de convivência. Especialmente à Simone Souza por sua paciência, apoio e disponibilidade em nos atender, ao Prof. Dr. Alexandre Bello, por seus ensinamentos, por sua presteza em aceitar participar da banca avaliadora e por seu diferencial calmo e carinhoso no convívio com os alunos e ao Prof. Dr. Jose Firmino Neto, por seus ensinamentos na disciplina de Patologia Clínica e por sua participação na banca avaliadora.

Agradeço aos meus colegas de Mestrado, pelo apoio e companheirismo.

Agradeço ao Prof. Dr. Arnaldo César Couto, pela participação nesse projeto, realizando a análise estatística e discussão dos dados.

Agradeço ao amigo Marcos Flávio, assessor científico da Becton Dickinson, pelo treinamento do MALDI-TOF MS e participação ativa na elucidação de dúvidas durante a execução do trabalho.

Agradeço de forma especial ao Instituto de Biologia do Exército - IBEX, na pessoa do seu diretor, Cel Alberto Magno Lobo Colares, pela permissão concedida para o desenvolvimento de toda a parte prática do presente projeto, disponibilizando materiais e meios e pessoal para a execução das análises.

Agradeço fraternamente ao meu colaborador e revisor Maj Dornelas e ao Cap Guedes, que considero um amigo, por suas participações direta no desenvolvimento do projeto. Agradeço também a Maj Tatiana pelo apoio na disciplina de Biologia Forense e também por sua participação no projeto, estendendo meus agradecimentos a toda a equipe da Divisão de Ensino e Pesquisa do IBEX.

Agradeço ao Hospital Adventista Silvestre, na pessoa do Diretor Dr. Ranieri Leitão, por ter sido a minha primeira oportunidade profissional e que, ao longo de muitos anos, forneceu o rico material analisado no presente estudo, possibilitando a criação de um banco de leveduras.

Uma homenagem especial à Gerência de Diagnóstico do Hospital Adventista Silvestre, na pessoa do Dr. Marcos Dornelas e as amigas: Eliete, Fabiana, Carol, Maria do Espírito Santo, Claudinha e Ana Paula. Aproveito ainda para agradecer a Maria Manuela por ter me apresentado o hospital onde iniciei minha carreira profissional.

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro, por meio do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, local onde desempenho minhas atividades profissionais, na pessoa do Dr. Eduardo Pernambuco, assim como às amigas do setor de Bacteriologia, Alessandra, Marcinha e demais profissionais, que sempre me apoiaram.

Gratidão é o sentimento que levo comigo a todos que, direta ou indiretamente, participaram da realização desse sonho.

Não é o crítico que importa, nem aquele que mostra como o homem forte tropeça, ou onde o realizador das proezas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que se encontra na arena, com o rosto manchado de poeira, suor e sangue; que luta com valentia; que erra e tenta de novo e de novo; [...] que conhece os grandes entusiasmos e as grandes devoções; que se sacrifica por uma causa nobre; que ao menos conhece, no final, o triunfo de uma grande realização; e que, na pior das hipóteses, se fracassar, pelo menos fracassou ousando grandes coisas; e por isso, o seu lugar não pode ser junto àquelas almas tímidas e frias que não conhecem nem vitórias nem derrotas.

Theodore Roosevelt

RESUMO

PINHEIRO, Eliane Olmo. **Identificação genotípica e fenotípica de leveduras de importância clínica para autenticação em banco de leveduras de Instituição Militar de Saúde**. 2019. 139f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Candidíases invasiva continua sendo prevalente causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Essa forma de candidíase é um dos aspectos mais polimórficos das micoses sistêmicas e, em muitos casos, é um achado terminal. Nas últimas décadas, as tecnologias para identificação de leveduras têm avançado significativamente, com métodos bioquímicos automatizados, ensaios baseados em análise de ácidos nucleicos e proteômicos. Particularmente a proteômica na sua versão 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 recuperação de leveduras isoladas de amostras clínicas, a partir de frascos de hemocultura, provenientes do serviço de microbiologia de um hospital privado no Rio de Janeiro, e re-identificação das mesmas, através de métodos fenotípicos, utilizando meio cromogênico e o equipamento vitek 2, assim como o teste de formação de tubo germinativo e produção de clamidósporos para *C. albicans* e *C. dubliniensis*. MALDI-TOF MS e PCR em tempo real também foram utilizados para autenticação das cepas e criação de um banco de leveduras, para fins de pesquisa científica e atividade de ensino. Foi selecionado o método de Castellani, para a manutenção e conservação dos microrganismos na Coleção de Leveduras. Nesse estudo, foram analisados 112 isolados de leveduras, sendo 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. Através dessa pesquisa, foram elaborados os protocolos técnicos, formulários e bem como 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 à demanda de pesquisa do Instituto de Biologia do Exército.

Palavras-chave: Candidíase sistêmica. Hemocultura. Identificação de leveduras. MALDI-TOF MS. PCR em tempo real. Banco de leveduras.

ABSTRACT

PINHEIRO, Eliane Olmo. **Genotypic and phenotypic identification of yeasts of clinical importance for authentication in a yeast bank of a Military Health Institution.** 2019. 139f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Invasive candidiasis continues to be 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, is a terminal finding. In the last decades, yeast identification technologies have advanced significantly, with automated biochemical methods, assays based on nucleic acid and proteomic analysis. Particularly the proteomics in its version Mass Spectrometry by Time of Flight (MALDI-TOF MS), has been presented as a promising alternative for the identification in the routine of species of yeasts. The objective of this study was to recover isolated yeasts from clinical samples from blood culture bottles from the microbiology department of a private hospital in Rio de Janeiro, and to re-identify them using phenotypic methods using chromogenic medium and vitek 2 equipment, as well as the test of germ-tube formation and production of chlamydozoospores for *C. albicans* and *C. dubliniensis*. MALDI-TOF MS and real-time PCR were also used for strains authentication and creation of a yeast bank for purposes of scientific research and teaching activity. The Castellani method was selected for the maintenance and conservation of the microorganisms in the Yeast Collection. In the present study, 112 isolates of yeasts were analyzed. Among the species, the following recovery rates were observed: *C. tropicalis* (27.7%), *C. albicans* complex (21.6%), *C. parapsilosis* complex (20.7%), *C. glabrata* complex (16.2%), *C. krusei* (3.6%), *C. haemuloni* (1.8%). Among the species with the lowest percentage of isolation were: *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. utilis* (0.9%) and other species of yeasts (4.5%). It was possible to verify the good performance of MALDI-TOF MS against the phenotypic methods for the characterization of yeasts as well as their good correlation with real-time PCR. Through this research, the technical protocols, forms and as well as Compendium of Methods and Good Practices in Yeast Culture Collection were elaborated. The present study allowed the recovery of yeast strains of clinical interest for authentication through phenotypic and genotypic methodologies and creation of a microorganism bank to meet the research demand of the Institute of Biology of the Army.

Keywords: Systemic candidiasis. Blood culture. Identification of yeasts. MALDI-TOF MS. Leveduras bank.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas no processo de formação de um biofilme	20
Figura 2 –	Frascos de hemocultura automatizada do presente estudo, mantidos à temperatura ambiente.....	37
Figura 3 –	Vitek 2 e cartão para identificação de leveduras.....	39
Figura 4 –	<i>Primer</i> de <i>C. albicans</i>	41
Figura 5 –	Equipamento de PCR em tempo real Step One Plus utilizado para o estudo, Applied Biosystems-Thermo Fisher.....	42
Figura 6 –	Fundamento da metodologia de Espectrometria de Massas Por Tempo de Voo	43
Figura 7 –	Equipamento de Espectrometria de Massas Por Tempo de Voo utilizado no estudo - Microflex LT MALDI-TOF MS da Bruker Daltonik, Biotyper (Fremont, CA).....	43
Figura 8 –	Cepas de leveduras mantidas pelo método de Castellani.....	44
Figura 9 –	Tubo germinativo da amostra 259 de nosso estudo.....	49
Figura 10 –	Produção de clamidósporos da amostra 259 de nosso estudo.....	49
Figura 11 –	Amostras de leveduras do estudo em meio cromogênico.....	50
Figura 12 –	Espectros obtidos para leveduras do presente estudo.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Amplificação das amostras analisadas.....	55
Gráfico 2 –	Padrão de curva de melting a 77,1 °C. para <i>C. albicans</i>	55
Gráfico 3 –	Curvas de melting das reações de qPCR correspondentes a detecção das leveduras <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida krusei</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos Primers.....	41
Tabela 2 – Caracterização dos microrganismos no laboratório de origem.....	45
Tabela 3 – Produção de tubo germinativo e clamidósporos dos isolados de leveduras estudadas.....	50
Tabela 4 – Características coloniais em meio cromogênico dos isolados de leveduras.....	51
Tabela 5- Resultados e comparação de metodologias fenotípicas de identificação de leveduras.....	53
Tabela 6 – Resultados e comparação dos resultados fenotípicos e molecular de identificação dos isolados de leveduras.....	54
Tabela 7 – Concordância entre os resultados obtidos pelo Vitek 2 no laboratório de origem e os estudos realizados no IBEX.....	57
Tabela 8 – Correlação entre os resultados obtidos através do MALDI-TOF MS e Vitek 2.....	58
Tabela 9 – Correlação entre os resultados obtidos através do MALDI-TOF MS e qPCR.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Ágar Batata Dextrosado
C	Candida
CCML	Coleção de Cultura de Micologia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBEx	Instituto de Biologia do Exército
KDa	Kilo Daltons
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization -Time of Flight
MS	Mass Spectrometry
NaOH	Hidróxido de sódio
PCR	Polymerase Chain Reaction [Reação em Cadeia da Polimerase]
P	Probabilidade de um evento ocorrer ao acaso
qPCR	PCR em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SYBR Green	Corante de cianino assimétrico
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
YBC	Yeast Biochemical Card
YST	Yeast – ID

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
pmol	Picomol
m/z	massa/carga
α	alfa
g	Unidade de aceleração
mL	Mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Infecções fúngicas	18
1.1.1	<u>Fatores predisponentes</u>	18
1.2	Principais leveduras de interesse clínico	21
1.2.1	<u>Espécies do gênero <i>Candida</i></u>	21
1.2.2	<u>Leveduras não pertencentes ao gênero <i>Candida</i></u>	24
1.3	Candidíase sistêmica	26
1.4	Identificação de leveduras	27
1.4.1	<u>Caracterização fisiológica e morfológica</u>	28
1.4.2	<u>Métodos fenotípicos</u>	28
1.4.2.1	Teste cromogênico.....	28
1.4.2.2	Análise por Bioquímica Automatizada: Vitek 2.....	29
1.4.3	<u>Análise Proteômica: Espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS)</u>	30
1.4.4	<u>Análise molecular: PCR em Tempo Real</u>	31
1.5	Coleção de cultura de microrganismos	32
1.6	Métodos de preservação de leveduras: Método de Castellani	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo Geral	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Origem das culturas	36
3.2	Identificação dos isolados de leveduras	37
3.2.1	<u>Prova da Produção do Tubo Germinativo</u>	38
3.2.2	<u>Prova da Produção de Clamidósporos</u>	38
3.2.3	<u>Prova Bioquímica Automatizada: Vitek 2</u>	39
3.2.4	<u>Teste Cromogênico</u>	39
3.2.5	<u>Análise molecular: PCR em tempo real</u>	40
3.2.6	<u>Análise proteômica: MALDI-TOF MS</u>	42

3.3	Manutenção de isolados autenticadas	44
3.3.1	<u>Método de Castellani</u>	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Amostras avaliadas	45
4.2	Identificação dos isolados de leveduras	45
4.2.1	<u>Provas da Produção de Tubo Germinativo e Clamidósporos</u>	49
4.2.2	<u>Teste cromogênico</u>	50
4.2.3	<u>Prova Bioquímica Automatizada: Vitek 2</u>	51
4.2.4	<u>Análise proteômica: MALDI-TOF MS</u>	51
4.2.5	<u>Análise molecular: PCR em tempo real</u>	53
4.3	Comparação entre os métodos utilizados para identificação de isolados	56
5	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A – Banco de Cultura de Leveduras do IBEX.....	86
	APÊNDICE B – Compêndio de métodos e de boas práticas em coleção de cultura de leveduras do IBEX.....	87
	ANEXO - Documento interno de criação da Coleção de Cultura de Leveduras do IBEX	139

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. Dentre os agentes fúngicos, *Candida spp* é, sem dúvida alguma, o microrganismo mais frequentemente envolvido em casos de infecção, em pacientes imunocomprometidos. Além disso, essas leveduras têm se mostrado mais resistentes às drogas antifúngicas de uso clínico, principalmente quando espécies de *Candida não-albicans* estão presentes. Importa mencionar que, de fato, qualquer organismo fúngico que apresente algum fator de patogenicidade, potencialmente, poderá causar infecção, a princípio, em hospedeiros com alteração de seu estado imune e/ou naqueles que pertençam a populações vulneráveis. (DORNELAS-RIBEIRO et al., 2012; NEUFELD et al., 2015).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Infecções fúngicas

As infecções fúngicas são a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com malignidades hematológicas e outras patologias onde há um comprometimento imunológico, sendo as candidíases e aspergiloses as mais prevalentes (cerca de 90%), nessa população de pacientes (RUHNKE & MASCHMEYER, 2002). No entanto, há consenso na literatura sobre a alteração no espectro dos agentes etiológicos e o aumento na incidência das infecções fúngicas invasivas por fungos, até então, pouco relatados (NEUFELD, 2009).

Apesar do complexo *C. albicans* permanecer como o principal agente responsável por infecções relacionadas à assistência a saúde, espécies de *Candida* não-*albicans*, como complexo *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, complexo *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* e *C. krusei* têm emergido como significantes patógenos oportunistas. Dada a inerente variabilidade nos perfis de susceptibilidade antifúngica das espécies de *Candida* e a emergência de infecções por mais de uma espécie, a efetiva identificação fúngica é fundamental para a melhor decisão terapêutica (CHAO et al., 2014). O espectro de fungos oportunistas, agentes de infecções hospitalares, tem expandido progressiva e constantemente, incluindo diversas espécies do gênero *Candida* menos comuns e outras leveduras como *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e outros (DEL NEGRO, 2008; FERREIRA, 2016).

1.1.1 Fatores predisponentes

Muitos fatores são relacionados como facilitadores para o desenvolvimento de infecções fúngicas oportunistas. Entre esses fatores, podem ser citados o advento e uso intensivo de antibióticos, corticoides, drogas citostáticas, procedimentos invasivos, tais como as intervenções cirúrgicas, que exigem a cateterização dos pacientes, transplantes de órgãos, implantação de próteses e ainda doenças de

base, como o alcoolismo, diabetes e doenças hematológicas. Fatores ligados ao hospedeiro como idade e estado nutricional têm sido também descritos como agentes predisponentes de infecções (NEUFELD, 2009; DORNELAS-RIBEIRO, 2011).

Os avanços tecnológicos que permitiram o prolongamento da vida de indivíduos submetidos a terapias agressivas para tratamento de patologias primárias, tornaram os mesmos susceptíveis às infecções fúngicas (HIGASHI et al., 2015).

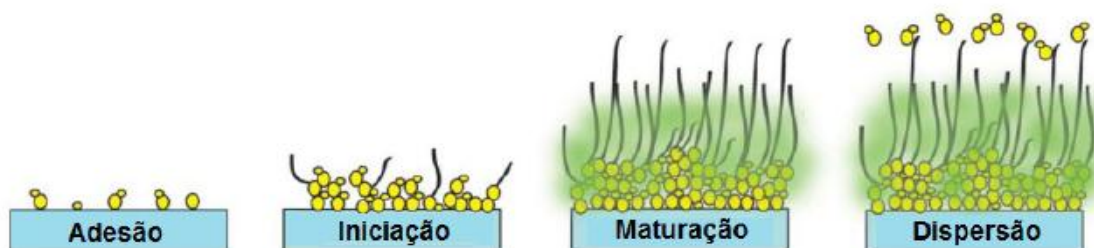
Pacientes hospitalizados estão entre aqueles com maior risco para desenvolver infecções invasivas por *Candida*. Infecções sistêmicas por *Candida* spp podem ser adquiridas através do contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres vasculares centrais, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contendo patógenos (HINRICHSEN et al., 2008). A imunossupressão causada por neutropenia, malnutrição, quimioterapia e radioterapia, podem ter como rota de infecção, o uso de cateter, queimaduras e colonização prévia, constituindo fatores de risco importantes para o desenvolvimento de candidemias. Recém-natos também podem desenvolver infecções por *Candida*, devido a uma série de fatores como: prematuridade, baixo peso ao nascer, nutrição parenteral, cateter intravenoso e estágio de desenvolvimento da imunidade (DORNELAS-RIBEIRO, 2011).

Candida spp pertencem à microbiota do trato gastrointestinal e genital e, portanto, apresentam baixo grau de virulência. Todavia, ocasionalmente, modificações nos mecanismos de defesa do hospedeiro poderão resultar em um processo infeccioso (DORNELAS-RIBEIRO, 2011). Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação de *Candida* do trato gastrointestinal (JUYAL et al., 2013). Desse modo, as candidemias são infecções fúngicas predominantemente endógenas e de caráter oportunista e o desenvolvimento da infecção é desencadeado por distúrbios na defesa imunológica de base celular, alterações fisiológicas, quebra de barreiras naturais ou, ainda, na ocorrência de desequilíbrio na microbiota do hospedeiro (FERREIRA, 2016).

A invasão dos microrganismos ao tecido hospedeiro pode ser facilitada pela: capacidade de aderência às células epiteliais e endoteliais, através da ligação às proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e laminina, a produção de enzimas extracelulares, como fosfolipases, proteinases e plasma-coagulase, a

formação de tubo germinativo, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Importa mencionar que a quantidade de microrganismos associada ao processo infeccioso, seja adquirida por via endógena ou via exógena (como por exemplo a formação de biofilme, em pacientes usando cateter) também tem papel significativo no desenvolvimento e persistência das infecções fúngicas (SENET, 1997; RODRIGUES et al., 2003). Os biofilmes são definidos como uma estrutura microbiana comunitária que adere a superfícies e fica revestida em uma matriz de material exopolissacarídico (RAMAGE et al., 2005; DURAN et al., 2007). Isolados do complexo *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e complexo *C. glabrata*, dentre outros, possuem menor desenvolvimento de biofilme, comparados com o complexo *C. albicans* (DOUGLAS L. J., 2002; WEBER et al., 2008). Segundo SARDI et al (2013), um biofilme é uma associação organizada de comunidades de células, geralmente incorporadas em uma matriz extracelular. Os biofilmes de *Candida* podem ser constituídos por células de diferentes morfologias: hifas e células leveduriformes (blastósporos) exceto os do complexo *C. glabrata*, constituídos apenas por blastósporos (FINKEL & MITCHELL, 2011; RODRIGUES, SILVA, & HENRIQUES, 2014; SARDI et al., 2013). A Figura 1, descreve o processo de formação de um biofilme.

Figura 1 - Etapas no processo de formação de um biofilme



Fonte: Adaptado de Finkel & Mitchell, 2011 e copiado de Vieira, F. M. R. M., 2016.

Inicialmente, a adesão das células leveduriformes a um substrato é possibilitada pela ocorrência de processos físico-químicos e pela presença de adesinas (BRUNKE & HUBE, 2013; GIOLO & SVIDZINSKI, 2010). Em seguida, no processo de iniciação, a proliferação das células leveduriformes e formação dos tubos germinativos refletem-se na formação de estruturas filamentosas (hifas e/ou

pseudo-hifas) na parte superficial do biofilme (FINKEL & MITCHELL, 2011; MAYER et al., 2013). Com a maturação do biofilme ocorre o acúmulo dos constituintes que formam a matriz extracelular, tornando a estrutura mais resistente à terapia antifúngica. As células não aderentes, podem colonizar outras superfícies (FINKEL & MITCHELL, 2011).

1.2 Principais leveduras de interesse clínico

1.2.1 Espécies do gênero *Candida*

Complexo ***Candida albicans*** – Microrganismo mais frequentemente isolado de infecções superficiais e invasivas. *C. albicans* é a espécie com maior conhecimento acerca de sua capacidade patogênica, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. Diante de condições predisponentes, *C. albicans* pode passar da forma leveduriforme para a filamentosa, aumentando a sua virulência, pela produção de metabólitos tóxicos, podendo, por isso, ocasionar diferentes quadros de fungemia, endocardite, processos pulmonares e abscessos (renais, cerebral, etc.) (LONDERO et al., 2004). Essa espécie é naturalmente sensível às drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes expostos prolongadamente a esses fármacos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; MAGEE & MAGEE, 2005; TIRASCHI et al., 2007). Estudos mostraram, baseados em evidências filogenéticas, que *Candida dubliniensis* e *Candida africana* passaram a pertencer ao complexo *C. albicans* (ABASTABAR et al., 2016)

Candida auris - Levedura emergente, que representa grave ameaça à saúde global e que por sua multirresistência a poliênicos, azólicos e derivados de pneumocandina/equinocandina, foi isolada, pela primeira vez, em 2009, como causadora de doença em humanos, após sua recuperação no canal auditivo externo de um paciente japonês (ANVISA, 2017). *C. auris* é de transmissão fácil entre pacientes hospitalizados, assim como a sua capacidade de se manter viável em superfícies ambientais. A associação com alta mortalidade e persistência de

candidemia, inconsistência nos resultados dos testes de susceptibilidade, identificação incorreta pelos sistemas de identificação comercial disponíveis, dificultam seu manejo e detecção (SEKYERE, 2017). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou um comunicado de risco, em janeiro de 2017, relatando surtos de *Candida auris* em serviços de saúde na América Latina.

Candida dubliniensis - Levedura semelhante à *C. albicans* nas suas características fenotípica, genotípica e filogenéticas. Está comumente associada à mucosa oral, a pacientes com HIV e a pacientes diabéticos. A *C. dubliniensis* é responsável por cerca de 2% das candidemias. Recentemente, mostrou-se que a *C. dubliniensis* tem capacidade reduzida de produzir hifas, o que pode resultar em menores níveis de colonização e invasão tecidual (SULLIVAN et al., 1999; MORAN et al., 2004; McMANUS et al., 2008; BARBEDO & SGARBI, 2010). Essa espécie passou a pertencer ao complexo *C. albicans*.

Candida famata – Fungo leveduriforme que habita a cavidade oral do ser humano como comensal. Normalmente encontrada em alguns alimentos, incluindo os laticínios, *C. famata* é responsável por cerca de 0,2 a 2 % das fungemias. A *C. famata* é menos suscetível aos derivados azólicos, em comparação com o complexo *C. albicans* (CARRASCO et al., 2005; GUPTA et al., 2006; PISA et al., 2007).

Complexo ***Candida glabrata*** - Levedura considerada como sapróbia na microbiota de indivíduos sadios. Sua significância, como agente de infecções fúngicas em seres humanos, tem aumentado, em especial, como consequência do uso de drogas imunossupressoras e do advento da Aids. Esse agente apresenta taxas de mortalidade de 50%, em pacientes com câncer, e de até 100%, quando em complicações de transplante de medula óssea (RAY et al., 2007). Predominantemente, tem sido isolada de pacientes com antecedentes de profilaxia antifúngica, utilizando fluconazol, mas sem o uso do cateter (CANTÓN, VIUDES & PEMÁN, 2001). O complexo *C. glabrata* tem menor sensibilidade ao fluconazol e à anfotericina B do que outras espécies de *Candida* (PAPPAS et al., 2004; PFALLER et al., 2002; PFALLER et al., 2004). O complexo é formado por *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* e *Candida nivariensis* (BARCELOS & AQUINO, 2018).

Complexo ***Candida guilliermondii*** – Frequentemente, está associada a quadros de onicomicoses, pacientes com câncer, neutropênicos, transplantados e em pacientes na terapia intensiva. Observa-se semelhança morfológica e bioquímica

com *C. famata* (PFALLER et al., 2006; LAN et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007). Essa levedura tem sido considerada emergente, e apresentando resistência in vitro aos derivados azólicos e à anfotericina B (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; CANTÓN et al., 2006; GIRMENIA et al., 2006).

Candida haemulonii – Esse fungo foi descoberto em 1962, a partir do isolamento do intestino de *Haemuloniscirus*, um trematódeo. O microrganismo também foi isolado a partir da pele de golfinhos e água do mar, na costa de Portugal. Esse fungo está normalmente associado a pacientes apresentando doenças como câncer, diabetes e anemia megaloblástica e à utilização de cateter. *C. haemulonii* mostra semelhança fenotípica com *C. famata* e o complexo *C. guilliermondii*. A levedura tem apresentado aumentada resistência para fluconazol, itraconazol e anfotericina B, porém é suscetível ao voriconazol, 5-fluorocitosina e caspofungina (RODERO et al., 2002; KHAN et al., 2007). A *C. haemulonii* é filogeneticamente relacionada com *C. auris*, que também é conhecida por sua resistência à anfotericina B e fluconazol (ALMEIDA et al., 2012).

Candida krusei - Levedura que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com baixa sensibilidade para anfotericina B e para a 5-fluorocitosina (PAPPAS et al., 2004). Contudo, apresenta sensibilidade ao voriconazol e às equinocandinas. *Candida krusei* exibe uma plasticidade com respeito ao desenvolvimento de resistência a antifúngicos, sendo importante seu monitoramento, incluindo nesse procedimento o complexo *C. glabrata* (SHEMER et al., 2001; PFALLER et al., 2008; BARBEDO & SGARBI, 2010).

Complexo ***Candida parapsilosis*** – O microrganismo foi descrito por Roy & Mayer (1998), como agente etiológico de vaginite, fungemia e endocardite, em pacientes neutropênicos. É um fungo ubíquo, comumente isolado do ambiente, solo e água e de plantas. As espécies do complexo *Candida parapsilosis* se apresentam como patógenos nosocomiais, associadas a cateteres, com manifestações clínicas que incluem fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites, bem como estão relacionadas a procedimentos invasivos ou dispositivos protéticos. Espécies frequentemente isoladas da corrente sanguínea, particularmente de pacientes neonatos, transplantados e pacientes que recebem nutrição parenteral. O complexo *C. parapsilosis* pode ser dividido em três grupos distintos, com base nos aspectos genotípicos, proteicos, isoenzimas e sequência de DNA mitocondrial em *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (COLOMBO &

GUIMARÃES, 2003; LAFFEY & BUTLER, 2005; LOGUE et al., 2005; GULLU et al., 2008; KOCSUBÉ et al., 2007).

Candida tropicalis – Essa levedura é considerada a segunda ou a terceira causa de candidemias em adultos, principalmente, em pacientes com linfoma, leucemia, complicações hematológicas malignas, diabetes mellitus e câncer. Apresenta capacidade invasiva maior do que a do complexo *C. albicans* e estima-se que 50-60% de pacientes com condições predisponentes, quando colonizados, desenvolvem candidíase invasiva. As infecções sistêmicas por *C. tropicalis* estão associadas a taxas mais altas de mortalidade e disseminação que o complexo *C. albicans* e complexo *C. parapsilosis* (CANTÓN, VIUDES & PEMÁN, 2001; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; ZAUGG et al., 2001; ROILIDES et al., 2003; VANDEPUTTE et al., 2005).

Candida utilis - Levedura empregada na indústria, principalmente em reações de fermentação não alcoólica. É capaz de utilizar álcoois como fonte de carbono. Agente extremamente raro em fungemias, pode ser encontrada no trato digestivo de pacientes hospitalizados (HAZEN et al., 1999; FUJINO et al., 2006).

Complexo ***Candida rugosa*** - Levedura considerada um patógeno emergente, envolvida em raros casos de infecção invasiva. *Candida rugosa* coloniza, frequentemente, pacientes de alto risco e exibe uma redução da sensibilidade a poliênicos e ao fluconazol, podendo ser transmissível de pessoa a pessoa, no ambiente hospitalar, e ser endêmica, em certas instituições (HERNANDES et al., 2004; PFALLER et al., 2006).

1.2.2 Leveduras não pertencentes ao gênero *Candida*

Cryptococcus spp – Representado por duas espécies, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e que podem ser distinguidas de outras leveduras patogênicas, como *Candida*, pela presença de uma cápsula polissacarídica (KWON-CHUNG et al., 2014). A primeira espécie possui distribuição cosmopolita e pode ser encontrada em excretas de aves, principalmente pombos, porém, acomete mais frequentemente indivíduos imunossuprimidos, comumente HIV positivos, enquanto que a segunda espécie é mais frequente em áreas tropicais e subtropicais, sendo

observada no ambiente rural, na floração dos eucaliptos, ocos e troncos de árvores, acometendo indivíduos imunocompetentes. A transmissão da doença ocorre pela inalação das células fúngicas (blastósporos e basidiósporos), sendo os principais órgãos comprometidos o pulmão e o sistema nervoso central, devido ao neurotropismo do agente. Os antifúngicos mais utilizados para o tratamento da criptococose são a anfotericina B, fluconazol e voriconazol. Os derivados das pneumocandinas/equinocandinas não tem ação sobre o fungo em decorrência da composição de sua parede celular (PERFECT et al., 2010; ALMEIDA & MACHADO, 2014).

Rhodotorula spp - Levedura comumente encontrada no meio ambiente (solo, ar e água), sendo também encontrada em produtos de origem animal como leite e queijo. Esse fungo tem emergido como um patógeno oportunista devido a sua habilidade de colonizar e causar infecções em pacientes suscetíveis. Na verdade, todavia, são comensais e participam da microbiota da pele, unhas e mucosas no homem.

O gênero inclui 8 espécies, porém, apenas *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *R. minuta* são conhecidas como agentes de doença em humanos. A *Rhodotorula* produz colônias alaranjadas, sendo uma característica peculiar desse grupo (WIRTH & GOLDANI, 2012)

Saccharomyces cerevisiae - Microrganismo conhecido por sua ampla utilização industrial em panificação, produção de etanol e vinhos (SCHADEN et al., 2010; SILVA et al., 2011). O gênero *Saccharomyces* pode estar presente como colonizante na mucosa gastrointestinal, respiratória e urinária, em pacientes com doenças de base. É reconhecido como patógeno emergente, apresentando uma incidência que pode chegar a 4% dos isolados fúngicos em hemoculturas. Acredita-se que sua entrada no organismo seja predominantemente por via gastrointestinal, contudo há relatos de contaminação de cateteres, através de mãos contaminadas (ENACHE-ANGOULVANT & HENNEQUIN, 2005; AUCOTT et al., 1990; CASSONE et al., 2003; SILVA et al., 2011).

Trichosporon spp - As infecções fúngicas pelo gênero *Trichosporon* comumente são classificadas como micoses superficiais, de natureza benigna e que acometem, preferencialmente, o couro cabeludo, as axilas e a região pubiana (SILVESTRE JUNIOR, MIRANDA & CAMARGO, 2010; MATTEDE et al., 2015).

Recentemente tem sido reportado que o gênero *Trichosporon* pode também acometer o ser humano em infecções sistêmicas. Nos últimos anos, esse fungo tem apresentado aumento na incidência de infecções hospitalares, principalmente em pacientes graves, imunossuprimidos, sujeitos a longos períodos de internação e submetidos a procedimentos invasivos (NUCCI et al., 1995)

Geotrichum spp - Fungo ubiquitário, que pode também ser encontrado na microbiota humana, sendo isolado de pele, escarro e fezes. Esse microrganismo pode causar infecções graves em imunocomprometidos. O *Geotrichum candidum* é a espécie normalmente mais associada à infecção em humanos (BOUZA & MUNOZ, 2004; BUCHTA et al., 2001; D'ANTONIO et al., 1996; MARTINO et al., 2004; TURDA, 2013).

1.3 Candidíase sistêmica

A candidíase sistêmica é uma das formas micóticas mais polimórficas de todas as micoses e, em muitos casos, é um achado terminal. Essa condição apresenta-se com sinais e sintomas inespecíficos, provas sorológicas inconclusivas e requerendo equipamentos específicos para o isolamento do microrganismo (LONDERO et al., 2004; FIGUERAS et al., 2011). Além disso, o tratamento é de alto custo e existe uma elevada taxa de mortalidade (COLOMBO et al., 2006).

Vários fatores são atribuídos ao risco de desenvolvimento de candidíase invasiva. A candidemia é observada, particularmente, entre pacientes hospitalizados por longos períodos de tempo, em tratamento com antibióticos de amplo espectro, em quimioterapia, submetidos à transplantes e procedimentos invasivos, cateterizados, em nutrição parenteral, neutropênicos e imunossuprimidos (TUMBARELLO et al., 2007; VIGOURUX et al., 2006).

Candida albicans ainda é considerada a espécie mais encontrada em casos de candidemias, porém, o aumento das taxas de candidemia por *C. tropicalis*, complexo *C. parapsilosis*, complexo *C. glabrata* e *C. krusei* tem sido relatado em todo mundo. A razão para emergência de espécies não-*albicans* não está ainda completamente elucidada, mas algumas condições médicas podem produzir impacto no risco de desenvolvimento de candidemia por essas espécies. O complexo *C.*

parapsilosis é responsável por candidemias relacionadas mais ao uso de cateteres e nutrição parenteral, *C. tropicalis* está mais associada à neoplasias e neutropenias, *C. krusei* e o complexo *C. glabrata* estão mais associadas à prévia exposição a azólicos (COLOMBO et al., 2006).

Diversas espécies de *Candida* isoladas de sangue apresentam sensibilidade à anfotericina B e ao fluconazol, porém, existem algumas exceções, como os isolados de *C. krusei*, que são intrinsicamente resistentes ao fluconazol, e alguns do complexo *C. glabrata*, que possuem sensibilidade reduzida. A correta identificação da espécie e o resultado do teste de susceptibilidade para antifúngicos são dados fundamentais para o adequado manejo das candidemias (SANDVEN, 2000).

1.4 Identificação de leveduras

Nas últimas décadas, as tecnologias para identificação de leveduras vêm apresentando grande avanço no que se refere à sua capacidade de discriminação dos isolados. Métodos de ensaios bioquímicos automatizados, ensaios baseados em análise de ácidos nucleicos e ensaios baseados em análise proteômica têm sido desenvolvidos. Com o uso de métodos laboratoriais convencionais, a identificação de espécies de leveduras geralmente é laboriosa e demorada. Além disso, alguns desses métodos não apresentam eficácia na identificação de espécies menos comuns. As técnicas moleculares, embora tenham aumentado consideravelmente a capacidade de identificação de leveduras, muitas estão associadas com custos aumentados, complexidade de execução e necessidade de um conhecimento técnico específico. Diante desse quadro, a Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) se apresenta como uma alternativa promissora para a identificação rotineira de espécies de leveduras (CHAO et al., 2014).

1.4.1 Caracterização fisiológica e morfológica

Prova da Produção de Tubo Germinativo: *Candida albicans* tem a capacidade de produzir tubos germinativos, que representam a iniciação de uma hifa, a partir de uma célula de levedura, na presença de soro humano ou meio hiperproteico, incubado à temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 2-3 horas (DORNELAS-RIBEIRO, 2011; BARCELOS & AQUINO, 2018). Essa prova é econômica e de baixa complexidade e é adequada para triagem e identificação de *C. albicans*. Aproximadamente 96% dessas linhagens produzem tubo germinativo, contudo, *C. tropicalis* também é capaz de induzir crescimento de hifas, nas mesmas condições que o complexo *C. albicans* (CAMPANHA et al., 2005).

Prova de Produção de Clamidósporos: *C. albicans* pode produzir clamidósporos, que são estruturas arredondadas e refringentes com parede celular espessa, sob condições não ótimas de crescimento (LEE et al., 1999).

Diversos meios de cultura são propostos para a indução de clamidósporos, sendo que os mais comuns possuem um baixo valor nutricional e altas taxas de carbono/nitrogênio. Para que haja a diminuição da tensão superficial, agentes como o Tween 80 são adicionados. O meio de ágar milho suplementado com Tween 80 tem sido o meio de eleição para a produção desses elementos (DORNELAS-RIBEIRO, 2011; BARCELOS & AQUINO, 2018).

1.4.2 Métodos fenotípicos

1.4.2.1 Teste Cromogênico

O teste cromogênico é realizado em um meio de cultura seletivo, que facilita o isolamento e a identificação presuntiva de algumas espécies de levedura clinicamente importantes, a partir da coloração de suas colônias (ODDS & BERNAERTS, 1994).

O meio cromogênico permite a identificação primária de leveduras a partir da utilização de substratos cromogênicos, adicionados ao meio, resultando em colônias de cor caracteristicamente única para cada espécie. Apesar de útil, o uso desse meio é limitado, pois sua capacidade discriminativa é restrita a um pequeno número de espécies de leveduras (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) e também porque múltiplas espécies de leveduras podem desenvolver cores semelhantes, afetando assim, a especificidade (BUCHAN & LEDEBOER, 2013).

O meio modifica a coloração das colônias para verde se for *C. albicans*, para azul-petróleo se for *Candida tropicalis* e para rosa se for *Candida krusei* (RIBEIRO et al., 2009). Outras espécies de *Candida* desenvolvem coloração entre branca e malva.

1.4.2.2 Análise por Bioquímica Automatizada: Vitek2

O Vitek 2 é um sistema automatizado correntemente empregado em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica. O equipamento realiza automaticamente os processos necessários para a identificação bioquímica de microrganismos e os procedimentos necessários para determinação da susceptibilidade a antimicrobianos, utilizando um inóculo primário de culturas positivas. Embora os métodos de identificação clássicos ainda sejam considerados Padrão Ouro, esses métodos consomem tempo e são passíveis de interpretações subjetivas. A utilização do sistema Vitek 2 reduz o tempo necessário para identificação e permite a padronização dos resultados inter e intra laboratórios, o armazenamento de resultados, a emissão de relatórios epidemiológicos e a realização de testes simultâneos de susceptibilidade antimicrobiana (MONTEIRO et al., 2016).

Esse sistema automatizado utiliza cartões com substratos bioquímicos liofilizados para a identificação taxonômica, tendo como base a assimilação de carboidratos e nitratos (ARAÚJO et al., 2005).

O equipamento apresenta um banco de dados que tem sido progressivamente atualizado, para abranger leveduras comuns e incomuns de espécies clínicas (POSTERARO et al., 2015).

1.4.3 Análise Proteômica: Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS)

A Espectrometria de Massas, em sua configuração MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*), do perfil proteico intracelular de microrganismos, é um método analítico desenvolvido em meados de 1988, que evoluiu rapidamente para espectros de "impressão digital" para vários microrganismos, incluindo bactérias e fungos. Os bancos de dados foram posteriormente desenvolvidos e adotados em laboratórios de microbiologia clínica. Esses bancos de dados empregam o conceito de reconhecimento de padrões ou de "impressão digital", onde o espectro de massa obtido de uma bactéria ou levedura é comparado com espectros existentes, para encontrar a correspondência mais próxima (KASSIM et al., 2017).

Nesse sistema, os agentes microbianos são colocados em uma placa com uma matriz constituída de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). A placa é irradiada com um laser que vaporiza a amostra (dessorção), ionizando as moléculas, que serão conduzidas por uma diferença de potencial elétrico a uma região livre de campos elétricos, no tubo de voo. Nessa região, ocorre a distinção dos íons de acordo com as suas velocidades, que são inversamente proporcionais às respectivas relações massa/carga. Os íons são detectados após sua chegada no final do tubo, com registro do seu tempo de voo, associando-se tal parâmetro indiretamente à massa molecular da proteína (KARAS & HILLENKAMP, 1988; GROSS, 2006; STEVENSON et al., 2010; DENIS et al., 2017).

A abordagem do biomarcador para a identificação de microrganismos utiliza as proteínas específicas encontradas dentro da célula. As proteínas ribossomais tornaram-se um dos principais biomarcadores porque são abundantes, altamente conservadas e codificadas por genes cromossômicos. Essas proteínas têm massas moleculares que se enquadram entre 4 a 30 KDa (KASSIM et al., 2017).

Um obstáculo para a identificação de isolados de leveduras, empregando MALDI-TOF MS, é a presença de uma robusta parede celular, que inibe a análise direta de leveduras. Essa dificuldade analítica têm sido superada usando uma variedade de abordagens de pré-processamentos, destinadas a liberar as proteínas

intracelulares, que são a base para a identificação por essa metodologia (BUCHAN & LEDEBOER, 2013).

O MALDI-TOF-MS se apresenta como uma alternativa promissora para a identificação rotineira de espécies de leveduras, por ser um sistema que providencia a correta identificação das espécies, consumindo alguns minutos para realização da identificação, sendo ainda as análises relativamente de baixo custo (CHAO et al., 2014).

1.4.4 Análise molecular: PCR em Tempo Real

O PCR em Tempo Real combina a química com uma sonda fluorescente, para a detecção do produto amplificado na mesma reação. A avaliação da fluorescência é obtida pela plataforma do equipamento em cada ciclo de amplificação. Em geral, a reação ocorre em menos de uma hora, sendo consideravelmente mais rápida que as técnicas de PCR convencionais (ESPY et al., 2006).

Esse tipo de detecção do amplicon constitui um avanço significativo na química dos ácidos nucleicos, por ser mais rápido do que os métodos tradicionais de detecção de amplicons. Além disso, há uma redução significativa na chance de contaminação do amplicon no laboratório, pois não se necessita abrir o tubo de reação para se analisar o amplicon. Atualmente existem diferentes plataformas disponíveis para a amplificação de ácidos nucleicos em tempo real (FOY & PARKES, 2001).

Diferentes moléculas fluorogênicas podem ser usadas para a detecção dos ácidos nucleicos amplificados, numa reação homogênea ou em tempo real. Essas moléculas podem ser inespecíficas e detectar qualquer tipo de ácido nucleico amplificado (SYBR GREEN) ou específicas, o que significa que elas são oligonucleotídeos e se hibridizam a uma sequência específica, presente no amplicon (sondas) (KONEMAN et al., 2008).

O SYBR Green é um corante que se liga ao sulco menor do DNA de dupla hélice, emite pouca fluorescência, quando no estado não ligado, mas gera uma fluorescência consideravelmente maior, quando ligado ao DNA. Essa propriedade o

torna útil para a determinação da presença de um produto de DNA amplificado (KONEMAN et al., 2008).

1.5 Coleções de Culturas de Microrganismos

As coleções de culturas de microrganismos representam instituições de guarda cujo objetivo precípua é a preservação do patrimônio microbiológico de uma região. Essas coleções estão, frequentemente, associadas às atividades de uma organização parental, como, por exemplo, centros acadêmicos ou de pesquisa científica, mantendo organismos que podem ser utilizados para fins distintos (CONSENSO, 2006).

Coleções de culturas de microrganismos são instituições de conservação da biodiversidade, encarregadas de coletar e disponibilizar organismos de relevância para a pesquisa científica, bem como são centros de aplicação tecnológica e de atividade de ensino. A preservação e a manutenção de culturas deve ser realizada de forma a garantir a sobrevivência, pureza e estabilidade morfológica e fisiológica do microrganismo, bem como suas características genéticas, durante períodos prolongados (CAVALCANTI, 2010).

Existem diversos tipos de coleções microbiológicas *ex-situ*, que são classificadas de acordo com o atendimento prestado. As coleções de trabalho são aquelas mantidas nos laboratórios e utilizadas em linhas específicas de pesquisa; coleções institucionais abastecem diversas linhas de pesquisa de uma única instituição; coleções de serviço possuem acervo abrangente, curadoria profissional e têm papel fundamental na aquisição, caracterização taxonômica e tecnológica, manutenção e distribuição de microrganismos para toda a comunidade, para fins industriais ou de pesquisa (ANDRADE et al., 2008).

Os métodos de preservação de culturas microbianas podem ser divididos de acordo com o tempo máximo no qual os isolados podem permanecer sem serem manipulados, desse modo, tem-se métodos de curto prazo (subcultivos periódicos), métodos de médio prazo (preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada e congelamento a -20°C) e métodos de longo prazo (liofilização e criopreservação) (SOLA et al., 2012; SOUSA et al., 2017).

Subcultivos periódicos e sucessivos de isolados fúngicos podem acarretar o aparecimento de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além do elevado risco de contaminação. Desse modo, diversas coleções de culturas têm utilizado metodologias de preservação de longo prazo, contudo não há um método universal para todos os tipos de fungos (BUTTERFIELD et al., 1974; MCGINNIS et al., 1974; QIANGQIANG et al., 1998; CAVALCANTE et al., 2007).

O Brasil dispõe de diversas coleções de culturas, 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; SILVA et al., 2006).

1.6 Métodos de preservação de Leveduras: Método de Castellani

A importância da manutenção e preservação de microrganismos, caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização desses recursos biológicos a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (GUIMARÃES, 2011). Dessa forma, conhecer a melhor maneira de preservar culturas e dispor de técnicas simples e eficientes, reveste-se de grande valia aos laboratórios de microbiologia (SOLA et al., 2012).

Diversos métodos vêm sendo empregados para preservação de fungos, porém, em virtude da biodiversidade desses microrganismos, não existe uma técnica padrão, que seja capaz de preservá-los de forma generalizada (DELLARETTI, 2014).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada nas características do agente em estudo, assim como nas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível e nos recursos financeiros de cada instituição (SOLA et al., 2012; DELLARETTI, 2014). O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e, principalmente, proporcionar estabilidade genética ao microrganismo armazenado, pelo maior tempo possível, evitando, assim, a formação excessiva de mutações que alterem suas características fundamentais (ABREU & TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Diferentes métodos têm sido propostos para a manutenção de organismos em coleções de culturas de fungos, tais como preservação em óleo mineral estéril, congelamento, congelamento em temperatura ultra-baixa, preservação em água destilada estéril (MÉTODO DE CASTELLANI) e liofilização (McGINNIS, PADHYE & AJELLO, 1974). O método de Castellani é um método simples, economicamente viável e adequado aos objetivos de uma coleção de culturas de microrganismos (RODRIGUES, LIRIO & LACAZ, 1992; FIGUEIREDO, 2001; CANHOS, 2003; NAKASONE et al., 2004).

O método de Castellani consiste no armazenamento de microrganismos em água esterilizada ou solução salina esterilizada, sendo indicado na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (PIMENTEL & FIGUEIREDO, 1989; COSTA & FERREIRA, 1991; NEULFELD & OLIVEIRA, 2008). O método se baseia na transferência de culturas para frascos contendo água estéril, com posterior armazenamento sob temperatura ambiente. As suspensões de células deverão ser bem concentradas, a partir de um crescimento em meio sólido ou poderão ser introduzidos blocos de ágar contendo crescimento microbiano. Uma vantagem desse método é requerer um pequeno espaço físico para o acondicionamento dos frascos (SOLA et al., 2012).

Segundo McGINNIS, PADHYE & AJELLO, 1974, o método de manutenção de culturas de fungos em água destilada estéril, por longos períodos de tempo, é simples, econômico e confiável. A técnica de revitalização é menos laboriosa quando comparada com as culturas preservadas em óleo mineral estéril.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar por diferentes metodologias as principais leveduras de importância clínica, para criar um Banco de Leveduras.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- a) autenticar por diferentes técnicas as principais espécies de leveduras:
 - produção de tubo germinativo e clamidósporos;
 - técnicas fenotípicas: identificação cromogênica e Vitek 2;
 - análise molecular: PCR em tempo real;
 - análise proteômica: espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS);
- b) avaliar o desempenho e a correlação do método de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) comparado ao Vitek 2 e PCR em tempo real;
- c) preservar e estocar as leveduras na Coleção de Cultura do IBEX através da técnica de Castellani;
- d) elaborar protocolos técnicos para caracterização e preservação das leveduras na Coleção de Cultura de Leveduras do Instituto de Biologia do Exército;
- e) elaborar um Compêndio de Métodos e de Boas Práticas em Coleção de Cultura de Leveduras do Instituto de Biologia do Exército.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados

Os microrganismos utilizados no presente estudo foram isolados durante os procedimentos diagnósticos de rotina no Serviço de Micologia do Laboratório de Bacteriologia/Micologia de um hospital privado na cidade do Rio de Janeiro, no período de 2004 até 2017, e incorporados ao acervo do Instituto de Biologia do Exército (IBEX).

Nas rotinas laboratoriais utilizadas para hemocultivo, os espécimes clínicos foram inoculados em frascos contendo meios líquidos para sistema de hemocultura automatizado (Fig. 2). Para a recuperação dos isolados nas amostras clínicas, dois equipamentos de automação foram utilizados (Bactec - Becton Dickinson e Bact/Alert - Biomerieux) utilizando frascos de hemocultura aeróbio adulto e frasco Myco/F. As amostras que apresentaram positividade foram subcultivadas para meios de cultura enriquecidos (ágar sangue e ágar chocolate) e meio de cultura diferencial (ágar Mac Conkey) e incubadas em estufa à temperatura de 35^o C, por um período não inferior à 48 horas. Sangue e líquidos biológicos estéreis compuseram os principais sítios anatômicos processados.

Figura 2 - Frascos de hemocultura automatizada



Fonte: A autora, 2018.

3.2 Identificação dos isolados de leveduras

Um total de 112 cepas de leveduras isoladas de 83 pacientes adultos, principalmente da corrente sanguínea, foram analisadas. Os frascos foram subcultivados em placas de ágar batata dextrosado (ágar BDA), para avaliação da viabilidade dos isolados. A partir do crescimento obtido, foram realizadas as provas de identificação, bem como a conservação das cepas em água destilada estéril.

As amostras foram identificadas, inicialmente no Laboratório de origem, através da metodologia automatizada “Vitek 2”, utilizando o cartão para identificação de leveduras YBC. A confirmação da identidade dos isolados e a autenticação das cepas foram realizadas no Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB2) do Centro de Estudos em Biodefesa do Instituto de Biologia do Exército - IBEX.

A reavaliação dos isolados foi procedida empregando a prova de produção de tubo germinativo, prova de produção de clamidósporos, teste cromogênico, provas bioquímicas automatizadas de assimilação de carboidratos, análise proteômica por espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS) e análise molecular por PCR em tempo real.

Para avaliação do desempenho das metodologias aplicadas no presente estudo, foram utilizadas as seguintes cepas de referência: *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. albicans* (ATCC 24433), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258).

3.2.1 Prova da Produção de Tubo Germinativo

Para a realização do teste, após crescimento em ágar BDA (Plast Labor, Brasil), por um período de 24-48 h, fragmentos dos isolados de leveduras, identificadas no laboratório de origem como *C. albicans*, foram inoculados em 0,4 mL de soro humano e incubados por um período de 2 a 3 horas em estufa, com a temperatura de 35° C ±2. Em seguida, uma alíquota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e a formação de tubos germinativos foi verificada através de microscopia ótica, com aumento de 40x (NEUFELD, 1999). As cepas positivas foram catalogadas e os resultados correlacionados com a produção de clamidósporos.

3.2.2 Prova da Produção de Clamidósporos

As culturas foram semeadas, em 3 estrias paralelas, em placas de Petri contendo ágar milho (Oxoid, Inglaterra) com Tween 80 (Reagen, Brasil) a 1%. Em seguida, a superfície do meio foi coberta com lamínulas estéreis e as placas incubadas à temperatura de 30° C, em estufa bacteriológica (STERILIFER, Brasil), por um período de 48-96 h. 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 clamidósporos e também foram positivas para tubo germinativo, forneceram uma identificação presuntiva do complexo *Candida albicans*. Além desses testes, todas as cepas foram submetidas a testes bioquímicos automatizados.

3.2.3 Prova Bioquímica Automatizada: Vitek 2

Para os testes bioquímicos automatizados, foram empregados cartões para identificação de leveduras (YST), que permitem a identificação das leveduras mais frequentemente isoladas de materiais clínicos. Os cartões foram inoculados de acordo com as instruções do fabricante e inseridos no equipamento para leitura automatizada dos substratos (Fig. 3). Essa metodologia é baseada em testes de assimilação de carboidratos, estabelecida por Wickerham & Burton (1948), além da hidrólise da uréia, resistência à cicloheximida e redução do nitrato. A leitura foi processada em equipamento automatizado Vitek 2 Systems (*Biomerieux*, França). A identificação foi considerada aceitável quando os percentuais de probabilidade obtidos foram maior ou igual a 85%, na ausência de solicitação de testes complementares, por parte do equipamento.

Figura 3 - Vitek 2 e cartão para identificação de leveduras



Fonte: <http://www.cqc.com.br/produtos/vitek-2-compact> Fonte: <http://www.biomerieux.com.br/produto/cartao-vitek-2-yst-id>

3.2.4 Teste Cromogênico

Os isolados de leveduras foram subcultivados em meio cromogênico (CHROMagar®-*Candida* produzido pela Plast Labor) e a morfologia e a cor das

colônias foram observadas, após 48 h de incubação, a 35°C. Neste meio, a inclusão de substratos cromogênicos produz colônias de diferentes cores, permitindo a identificação presuntiva de algumas espécies de *Candida* (ARAÚJO et al., 2005). As informações obtidas foram catalogadas para posterior identificação conforme orientação do fabricante. Neste meio, as colônias do complexo *C. albicans* apresentam textura cremosa e coloração verde, *C. tropicalis* com textura mucóide e coloração azul-petróleo e *C. krusei* apresenta textura seca e coloração rosa.

3.2.5. Análise Molecular: PCR em Tempo Real

Todas as amostras foram semeadas em ágar BDA (Plast Labor, Brasil) e incubadas a 35°C \pm 2°C, por 18-24 h. Para extração do DNA, foram preparadas suspensões em 20 μ L de solução de lise (SDS 10% 125 μ L; NaOH 0,05N 100 μ L; H₂O qsp 5000 μ L). Essas suspensões foram aquecidas a 94°C, por 5 min, posteriormente, adicionadas de 180 μ L de água Mili-Q estéril e centrifugadas a 16.000 g por 5 min (DORNELAS, 2011), uma alíquota de 3 μ L do DNA extraído em suspensão foi adicionado juntamente com 1 μ L (10pmol) de cada um dos dois iniciadores específicos e 5 μ L de PCR Luminaris Hi-Green qPCR Master Mix (ThermoScientific, MA, USA), em um volume total de 10 μ L, para a reação de PCR em Tempo Real. O desenho dos *primers* para o PCR está sumarizado na tabela 1 e a figura 4 apresenta o *primer* de *C. albicans*. Essa mistura foi submetida a 1 ciclo de 95°C, por 5 min, para a desnaturação do DNA, 30 ciclos de 95°C, por 30 s, 60°C, por 30 s e 72°C, por 30 s, 1 ciclo de 72°C, por 7 min, e posteriormente, mantida a 4°C, em termociclador em tempo real (*StepOne Plus, Applied Biosystems-Thermo Fisher*) (Fig. 5).

Tabela 1 – Sequência dos *Primers*

Sequência dos <i>Primers</i>			
Fungo	Orientação	Sequências	Referência
<i>C. albicans</i>	FW	ATG TGG CAC GGC TTC TGC TG	Ogata 2015
	RV	TAG GCT GGC AGT ATC GTC AGA GG	Ogata 2015
<i>C. glabrata</i>	FW	TTC GTG TAC TGG AAT GCA CC	Ogata 2015
	RV	ATA GAA CCA AAC GTC CTA TTC C	Ogata 2015
<i>C. krusei</i>	FW	CTG CAG GAG AAG GGG TTC TGG AAC G	Ogata 2015
	RV	CGG TGT TGC GCC GTT CTG C	Ogata 2015
<i>C. tropicalis</i>	FW	ATT TTG TAT GTT ACT TCT TCG	Ogata 2015
	RV	TAG GCT GGC AGT ATC GAC GAA GG	Ogata 2015
<i>C. parapsilosis</i>	FW	ATT TTG TAT GTT ACT CTC TCG	Ogata 2015
	RV	TGC CAA CAT CCT AGG CCG AAG C	Ogata 2015
<i>C. guilliermondii</i>	FW	GTC AAA CTT GGT CAT TA	Neufeld 2009
	RV	TTG GCC TAG AGA TAG GTT GG	Neufeld 2009

Figura 4 - *Primer de Candida albicans*

Primer pair 1			
	Sequence (5'→3')	Length	Tm
Forward primer	ATGTGGCACGGCTTCTGCTG	20	63.70
Reverse primer	TAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGG	23	63.44
Products on target templates			
> NC_032096.1 <i>Candida albicans</i> SC5314 chromosome R sequence			
product length = 53			
Forward primer	1 ATGTGGCACGGCTTCTGCTG 20		
Template	1893998 1894017		
Reverse primer	1 TAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGG 23		
Template	1894050 1894028		

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

No presente estudo, a metodologia de PCR em tempo real foi baseada na técnica de fluoróforos intercalantes de fita dupla de DNA (Sybr Green), sendo utilizado como referência os estudos de Zhang e Izadjoo (2015) e Koehler e colaboradores (2016).

Figura 5 - Equipamento de PCR em tempo real Step One Plus utilizado para o estudo, Applied Biosystems-Thermo Fisher



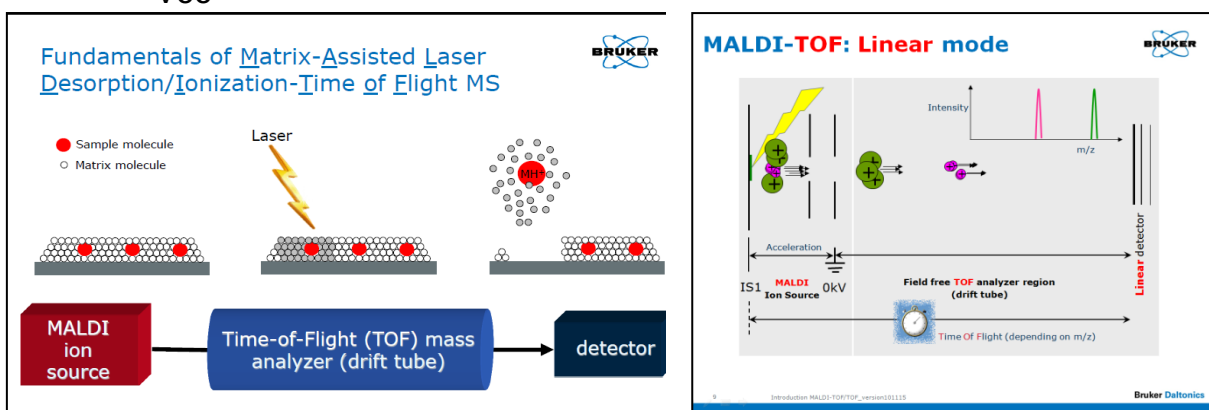
Fonte: A autora, 2018.

3.2.6 Análise Proteômica: MALDI-TOF MS

Todos os isolados foram testados através do método Dessorção/Ionização de Matriz Assistida por Laser (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (Time of Flight - TOF) (Bruker Daltonik, Biotyper, Fremont, CA), para a análise de proteínas, que foram detectadas diretamente das colônias de leveduras. As amostras de leveduras foram aplicadas diretamente na placa metálica contendo 96 poços, com auxílio de palitos de madeira estéreis e tratadas com 1 μ L de ácido fórmico a 85% (Synth). Após a secagem em temperatura ambiente, foi aplicado 1 μ L da matriz HCCA, procedendo-se também a uma secagem a temperatura ambiente (BULANE & HOOSEN, 2017; LEE, et al., 2017). Posteriormente à inserção da placa no equipamento, essa foi irradiada com um laser que vaporiza a amostra, ionizando as moléculas, sendo essas aspiradas e elevadas ao detector (Fig. 6). Em seguida, os dados obtidos, através do perfil do espectro, foram comparados com o banco de dados do equipamento, utilizando-se o *software* do fabricante, para a identificação dos microrganismos. Cada amostra foi analisada, em duplicata, pelo Microflex LT MALDI-TOF MS (Fig. 7), no modo linear positivo, em uma frequência de 60 Hz, com um intervalo de massa entre 2 e 20 KDa. As informações obtidas foram analisadas

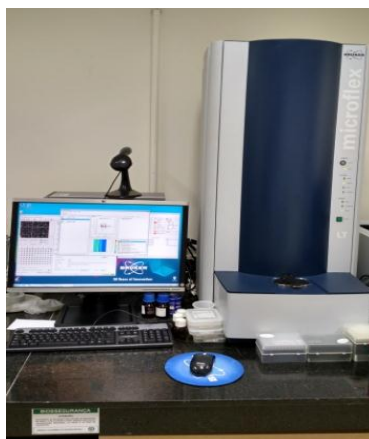
automaticamente usando o *software* Bruker Biotyper 3.1. Cada espectro foi obtido a partir de 240 tiros, em passos de 40 tiros de diferentes posições da placa alvo e o log dos "scores" foi calculado. A identificação do ponto de corte dos "scores" foi interpretada da seguinte forma: "scores" $\geq 1,7$ indicam identificação confiável a nível de espécie, enquanto que, pontos de corte menor que 1,7 indicam identificação não confiável, requerendo a repetição da análise (LEE, et al., 2017).

Figura 6 - Fundamento da metodologia de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo



Fonte: Manual da Bruker.

Figura 7 - Equipamento de Espectrometria de Massas Por Tempo de Voo – Microflex LT MALDI-TOF da Bruker Daltonik, Biotyper (Fremont, CA)



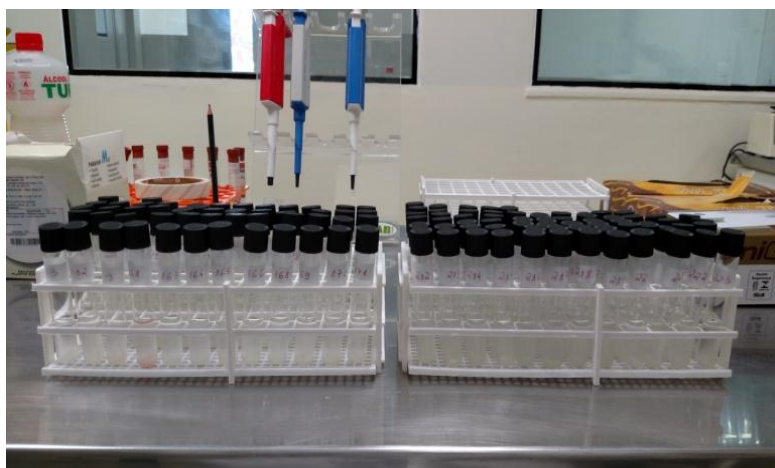
Fonte: A autora, 2018.

3.3 Manutenção de isolados autenticados

3.3.1 Método de Castellani

Todas as cepas foram inoculadas em tubos estéreis contendo 5 mL de água destilada estéril, assim como um fragmento do meio de cultura com o respectivo crescimento. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente, $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Fig. 8) e também sob refrigeração, entre 2 a 8°C .

Figura 8 - Cepas de leveduras mantidas pelo método de Castellani



Fonte: A autora, 2018.

4 RESULTADOS

4.1 Amostras avaliadas

De um total de 142 amostras, inicialmente mantidas em frascos de hemocultura automatizada, foram recuperadas 112 leveduras, através de subcultivos em ágar BDA para o estudo proposto.

Das 112 amostras analisadas, originárias de 83 pacientes, 107 (95,5%) foram obtidas da corrente sanguínea, 2 (1,8%) amostras de doadores de órgãos, 01 (0,9%) amostra de líquido pleural, 01 (0,9%) amostra de líquido abdominal, 01 (0,9%) amostra de sangue de cateter.

4.2 Identificação dos isolados de leveduras

As 112 amostras de leveduras estudadas, tiveram sua identificação original realizada através do Vitek 2 Systems (Biomérieux), como mostrado na tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização dos microrganismos no laboratório de origem (Continua)

Caracterização dos microrganismos no laboratório de origem				
Nº Ident. IBEx	Coleção	Ano	Material	Microrganismo Identificado
113	CCML	2004	Líqu. Pleural	<i>C. albicans</i>
132	CCML	2006	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
149	CCML	2005	Sangue	<i>C. guilliermondii</i>
161	CCML	2007	Sangue	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>
163	CCML	2008	Sangue	<i>C. albicans</i>
164	CCML	2008	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
165	CCML	2008	Sangue	<i>C. albicans</i>
166	CCML	2008	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
168	CCML	2008	Sangue	<i>C. famata/lusitaniae</i>
169	CCML	2008	Sangue	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
170	CCML	2009	Sangue	<i>C. albicans</i>

171	CCML	2009	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
172	CCML	2009	Sangue	<i>C. albicans</i>

Tabela 2 - Caracterização dos microrganismos no laboratório de origem (Continuação)

173	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
174	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
175	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
176	CCML	2010	Sangue	<i>C. albicans</i>
177	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
178	CCML	2010	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
179	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
180	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
181	CCML	2011	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
182	CCML	2011	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
183	CCML	2011	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
184	CCML	2011	Sangue	<i>C. albicans</i>
185	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
186	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
187	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
188	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
189	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
190	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
191	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
192	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
193	CCML	2011	Sangue	<i>C. albicans</i>
194	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
195	CCML	2011	Sangue	<i>C. glabrata</i>
196	CCML	2011	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
197	CCML	2012	Sangue	<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>
198	CCML	2012	Sangue	<i>C. albicans</i>
200	CCML	2012	Sangue	<i>C. guilliermondii</i>
202	CCML	2012	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
203	CCML	2012	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
204	CCML	2012	Sangue	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
205	CCML	2012	Sangue	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
206	CCML	2012	Sangue	<i>C. albicans</i>
207	CCML	2012	Sangue	<i>C. albicans</i>
208	CCML	2012	Sangue	<i>C. albicans</i>
209	CCML	2012	Sangue	<i>C. albicans</i>

210	CCML	2012	Sangue	<i>C. albicans</i>
211	CCML	2012	Sangue	<i>C. haemuloni</i>
212	CCML	2012	Sangue	<i>C. haemuloni</i>
213	CCML	2012	Sangue	<i>C. tropicalis</i>

Tabela 2 - Caracterização dos microrganismos no laboratório de origem (Continuação)

214	CCML	2013	Sangue	<i>C. glabrata</i>
215	CCML	2013	Sangue	<i>C. glabrata</i>
216	CCML	2013	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
217	CCML	2013	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
218	CCML	2013	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
219	CCML	2013	Sangue	<i>C. albicans</i>
220	CCML	2013	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
221	CCML	2013	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
222	CCML	2013	Sangue	<i>C. albicans</i>
223	CCML	2013	Sangue	<i>C. dubliniensis</i>
224	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
225	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
226	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
227	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
228	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
229	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
230	CCML	2013	Sangue	<i>C. pelliculosa</i>
231	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
232	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
233	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
234	CCML	2014	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
235	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
236	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
237	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
238	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
239	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
240	CCML	2014	Sangue	<i>C. albicans</i>
241	CCML	2014	Sangue	<i>C. famata</i>
242	CCML	2014	Sangue	<i>C. albicans</i>
243	CCML	2014	Sangue	<i>C. krusei</i>
244	CCML	2014	Sangue	<i>C. krusei</i>
245	CCML	2014	Sangue	<i>C. krusei</i>
246	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
247	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>

248	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
249	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
250	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
251	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>

Tabela 2 - Caracterização dos microrganismos no laboratório de origem (Conclusão)

252	CCML	2014	Sangue	<i>C. glabrata</i>
253	CCML	2014	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
254	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
255	CCML	2010	Sangue	<i>C. tropicalis</i>
256	CCML	2010	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
258	CCML	2010	Cateter	<i>C. parapsilosis</i>
259	CCML	2017	Sangue	<i>C. albicans</i>
260	CCML	2017	Sangue	<i>C. albicans</i>
261	CCML	2017	Sangue	<i>C. glabrata</i>
262	CCML	2017	Sangue	<i>C. glabrata</i>
263	CCML	2017	Sangue de Doador	<i>C. glabrata</i>
264	CCML	2017	Liq. Abdominal	<i>C. guilliermondii</i>
265	CCML	2017	Sangue de Doador	<i>C. tropicalis</i>
266	CCML	2016	Sangue	<i>C. krusei</i>
267	CCML	2016	Sangue	<i>C. glabrata</i>
268	CCML	2016	Sangue	<i>C. krusei</i>
269	CCML	2016	Sangue	<i>C. krusei</i>
270	CCML	2016	Sangue	<i>C. albicans</i>
271	CCML	2016	Sangue	<i>C. albicans</i>
272	CCML	2015	Sangue	<i>C. albicans</i>
273	CCML	2015	Sangue	<i>C. parapsilosis</i>
274	CCML	2015	Sangue	<i>C. tropicalis</i>

Fonte: A autora, 2018.

No presente estudo, os isolados foram re-identificados pelo Vitek 2, análise da produção de tubo germinativo e clamidósporos, teste cromogênico, análise proteômica pelo MALDI-TOF MS e biologia molecular com qPCR, empregando iniciadores específicos para as espécies com maior incidência no estudo.

4.2.1 Provas da Produção de Tubo Germinativo e Clamidósporos

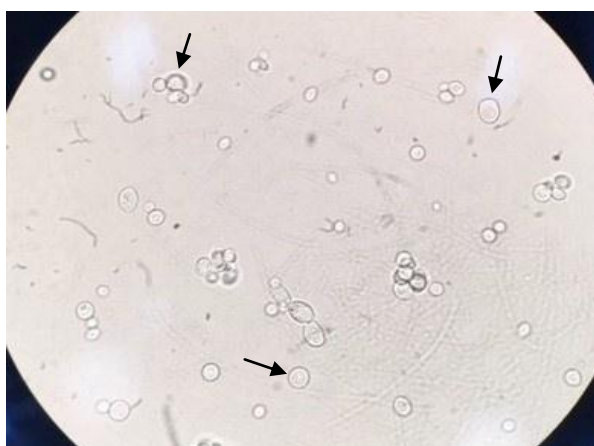
Todas as amostras de leveduras identificadas como *C. albicans* no laboratório de origem foram submetidas à presença de substrato contendo proteínas e incubadas por um período de 2 a 3 h, em estufa com a temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2$, para observação da produção de tubo germinativo (Fig. 9). As amostras também foram semeadas em ágar milho com Tween-80 para verificação da presença de clamidósporos (Fig. 10).

Figura 9 - Tubo germinativo da amostra 259



Fonte: A autora, 2018.

Figura 10 - Produção de clamidósporos da amostra 259



Fonte: A autora, 2018.

A tabela 3 apresenta os resultados para as leveduras produtoras de tubo germinativo e clamidósporos.

Tabela 3 - Produção de tubo germinativo e clamidósporos dos isolados de leveduras estudadas

Espécies de leveduras	Nº de isolados	Presença de tubo germinativo e clamidósporos
<i>C. albicans</i>	24	Positivo
<i>C. dublinienses</i>	1	Positivo
Total de leveduras	25	

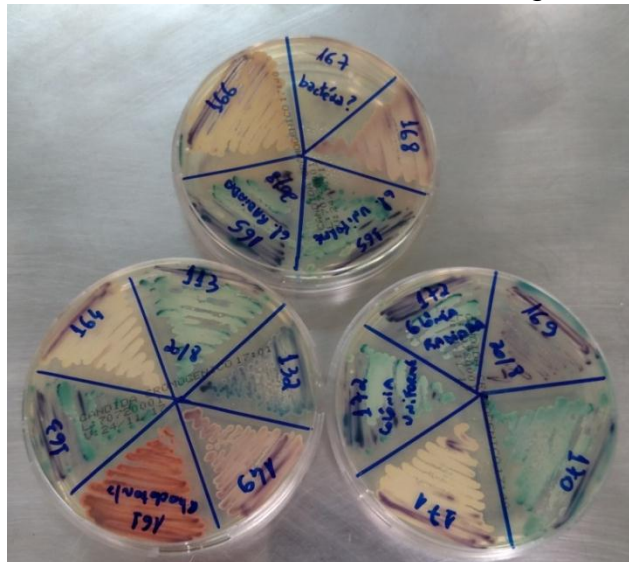
Obs.: A amostra de *C. dublinienses* mostrou-se positiva para ambos os testes.

Fonte: A autora, 2018.

4.2.2 Teste cromogênico

No presente estudo, foi possível identificar, conforme a orientação do fabricante, as espécies que eram *C. albicans lato sensu*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. A tabela 4 mostra a comparação da identificação das leveduras no laboratório de origem, com os resultados obtidos no meio cromogênico (Fig. 11).

Figura 11 - Amostras de leveduras em meio cromogênico



Fonte: A autora, 2018.

Tabela 4- Características coloniais em meio cromogênico dos isolados de leveduras

Espécies de leveduras	Identificação de origem Número de isolados	Coloração e textura colonial
<i>C. albicans</i>	23	Verde; colônia cremosa
<i>C. dubliniensis</i>	1	Verde mais claro
<i>C. famata</i>	2	Rosada com as bordas em lilás
<i>C. glabrata</i>	16	Colônia 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>Candida pelliculosa</i>	1	Rosada tendendo para o lilás; colônia seca
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2	Alaranjada, cor original do microrganismo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	Lilás escuro
Total de leveduras	112	

Fonte: A autora, 2018.

4.2.3. Prova Bioquímica Automatizada: Vitek 2

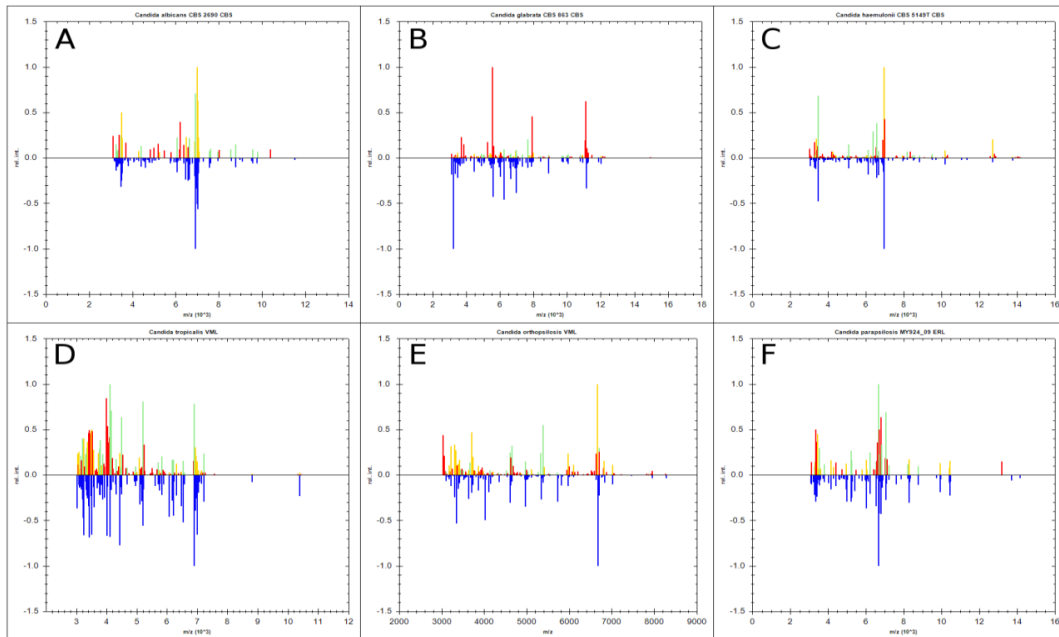
Todas as amostras foram originalmente caracterizadas pelo sistema Vitek 2 no Laboratório de origem, porém, no presente estudo, as identificações com o sistema foram repetidas para as 112 amostras. A tabela 5 mostra a caracterização das leveduras pelo Vitek 2 no Laboratório de origem e no estudo atual, comparando também com outras duas metodologias utilizadas.

4.2.4. Análise Proteômica: MALDI-TOF MS

Neste estudo, foi utilizada a Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) empregando o equipamento Biotyper (Bruker Daltonik, Biotyper Fremont, CA), que foi capaz de identificar as leveduras a nível de espécie. Todas as amostras apresentaram um score $\geq 1,7$. A figura 12 mostra alguns espectros

correspondentes às leveduras caracterizadas. A tabela 5 apresenta os resultados e uma comparação entre metodologias usadas na avaliação dos isolados.

Figura 12 - Espectros obtidos para os isolados de leveduras



Legenda: A: *Candida albicans*, B: *Candida glabrata*, C: *Candida haemulonii*, D: *Candida tropicalis*, E: *Candida orthopsilosis*, F: *Candida parapsilosis*. Em azul, estão detalhados os espectros armazenados no banco de dados. Espelhados a eles, em verde, amarelo e vermelho, os espectros correspondentes as leveduras identificadas no trabalho.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 5- Resultados e comparação de metodologias fenotípicas de identificação dos isolados de leveduras

<i>Espécies de leveduras</i>	Lab. Origem	IBEX		
	Vitek 2	Teste cromogênico	Vitek 2	MALDI-TOF
<i>C. albicans</i>	23	24	24	24
<i>C. dublinienses</i>	1	-	1	1
<i>C. famata</i>	2	-	1	-
<i>C. glabrata</i>	16	-	18	19
<i>C. guilliermondii</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ¹	3	-	1	1
<i>C. haemuloni</i>	2	-	2	2
<i>C. krusei/Issatchenkia orientalis</i> ¹	6	4	4	4
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	-	2
<i>C. orthopsilosis</i>	-	-	-	2
<i>C. parapsilosis</i>	22	-	23	19
<i>C. tropicalis</i>	31	31	31	31
<i>C. pelliculosa</i> / <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ¹	1	-	1	1
<i>C. utilis/Cyberlindnera jadinii</i> ¹	-	-	1	1
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2	-	2	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	-	3	3
<i>Total de leveduras estudadas</i>	112	59 **	112	112

Obs.: 1 - Primeira identificação referente ao Vitek 2 e a segunda referente ao MALDI-TOF MS.

Obs.: 2(**) - No meio cromogênico foram consideradas, para efeito de comparação, as espécies discriminadas pelo fabricante.

Fonte: A autora, 2018.

4.2.5. Análise molecular: qPCR

Na identificação por biologia molecular, as amostras que não amplificaram, inicialmente com os *primers* específicos, foram submetidas à nova extração de DNA, com repetição da técnica. Primariamente 83 espécies de leveduras foram caracterizadas por essa metodologia e, após nova extração de DNA das seguintes amostras: 190, 194, 195, 196, 215, 216, 235, 236, 238, 239, 241, 243, 244, 251, 253 e 274, foi possível expandir a autenticação para um total de 99 leveduras.

Na tabela 6 encontram-se os resultados obtidos para o teste molecular e uma comparação de metodologias tanto empregadas no laboratório de origem quanto no IBEX.

Tabela 6 – Resultados e comparação de metodologias fenotípicas e molecular de identificação dos isolados de leveduras

Espécies de leveduras	Lab. Origem	IBEX		
	Vitek 2	Vitek 2	MALDI-TOF	qPCR
<i>C. albicans</i>	23	24	24	24
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	1	-
<i>C. famata</i>	2	1	-	-
<i>C. glabrata</i>	16	18	19	19
<i>C. guilliermondii</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ¹	3	1	1	NA
<i>C. haemuloni</i>	2	2	2	-
<i>C. krusei/Issatchenkia orientalis</i> ¹	6	4	4	4
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	2	-
<i>C. orthopsilosis</i>	-	-	2	-
<i>C. parapsilosis</i>	22	23	19	21
<i>C. tropicalis</i>	31	31	31	31
<i>C. pelliculosa</i> / <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ¹	1	1	1	-
<i>C. utilis/Cyberlindnera jadinii</i> ¹	-	1	1	-
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2	2	2	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	3	3	-
Total de leveduras estudadas	112	112	112	99 *

Obs.: 1 - Primeira identificação referente ao Vitek 2 e a segunda referente ao MALDI-TOF.

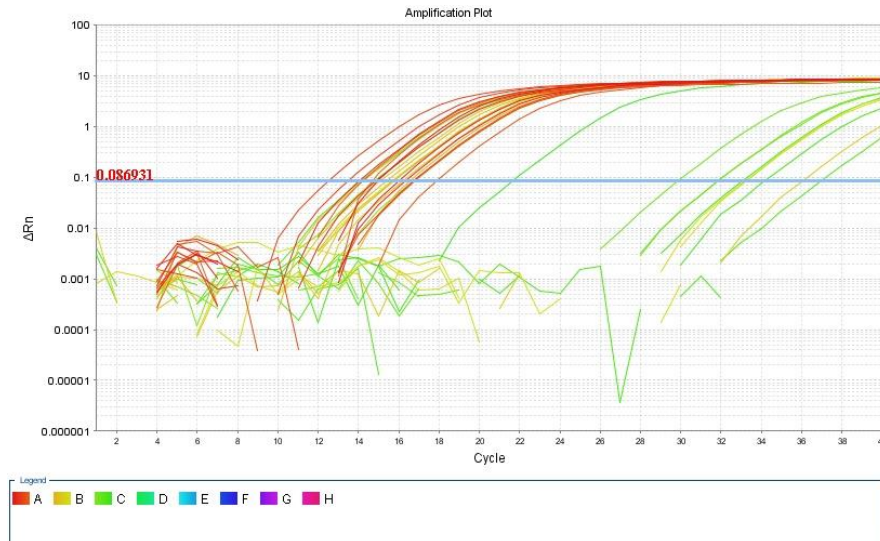
Obs.: 2 (*) – Total de leveduras com maior prevalência para o estudo de qPCR.

Obs.: 3 (NA) – Não houve amplificação com o primer utilizado.

Fonte: A autora, 2018.

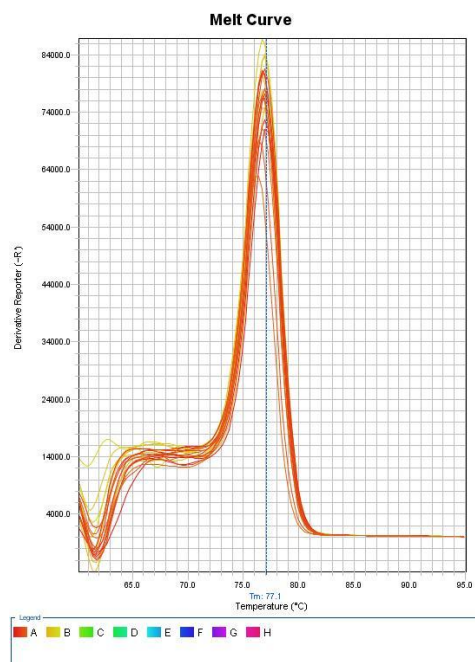
No gráfico 1, é apresentada a amplificação em qPCR das amostras de *C. albicans* analisadas inicialmente. Observa-se um padrão de amplificação mais prematuro e algumas curvas correspondentes a uma amplificação tardia, após o ciclo 28. Todas as amostras que amplificaram tardiamente corresponderam a espécies de *Candida* não-*albicans*. Todas as amostras com amplificação nos ciclos mais prematuros corresponderam a *C. albicans*.

Gráfico 1 – Amplificação das amostras analisadas



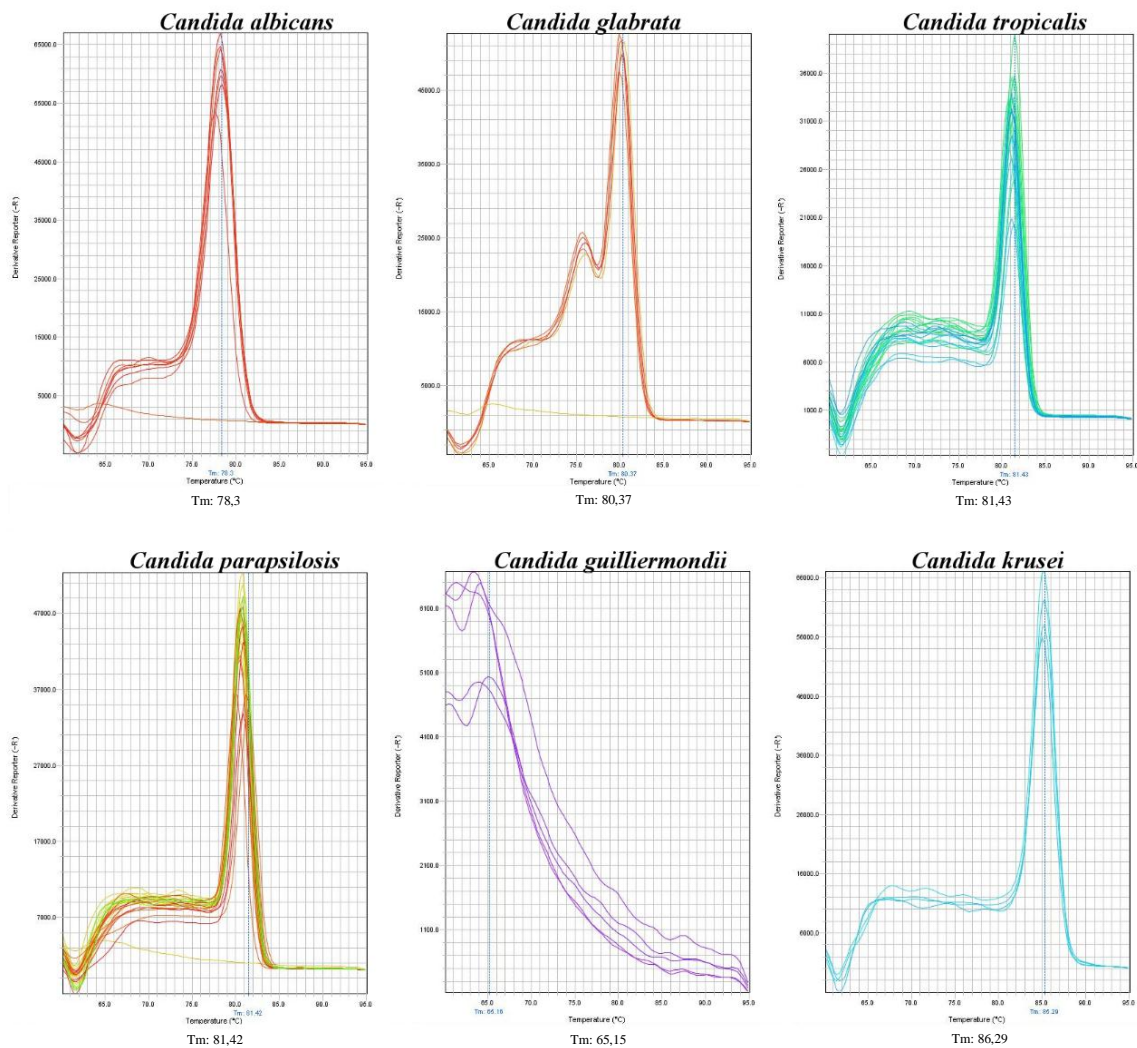
Fonte: A autora, 2018.

No gráfico 2, é mostrado o padrão das curvas de melting com temperatura de 77,1 °C para todas as amostras de *Candida albicans*, demonstrando uma homogeneidade da análise com fragmentos do mesmo tamanho, para todas as amostras, apontando para uma boa especificidade do teste. No gráfico 3, são informadas as curvas de melting das leveduras caracterizadas por qPCR.

Gráfico 2 - Padrão de curva de melting a 77,1 °C para *C. albicans*

Fonte: A autora, 2018.

Gráfico 3 - Curvas de melting das reações de qPCR correspondentes à detecção das leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*



Obs: A curva de melting correspondente à *Candida guilliermondii*, não apresentou pico pois não se obteve amplificação com o *primer* utilizado para a referida espécie.

Fonte: A autora, 2018.

4.3 Comparação entre os métodos utilizados para identificação dos isolados de leveduras

A tabela 7 mostra o percentual de concordância dos resultados encontrados entre as identificações realizadas no equipamento Vitek 2, sendo que a coluna da esquerda apresenta os dados do laboratório de origem, a coluna central exhibe a

segunda identificação pelo Vitek 2 e a coluna da direita mostra a concordância entre os métodos.

Foi observado que 7 (53,8%) espécies de leveduras apresentaram resultados divergentes entre a identificação no laboratório de origem e a identificação no IBEX.

Tabela 7 – Concordância entre os resultados obtidos pelo Vitek 2 no laboratório de origem e os estudos realizados no IBEX

Espécie de leveduras	Vitek 2 - origem	Vitek 2 - atual	Concordância (%)
<i>C. albicans</i>	23 (20,54)	24 (21,4)	95,8
<i>C. dublinienses</i>	1 (0,89)	1 (0,89)	100,0
<i>C. famata</i>	2 (1,78)	1 (0,89)	50,0
<i>C. glabrata</i>	16 (14,28)	18 (16,1)	88,9
<i>C. guilliermondii</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	3 (2,68)	1 (0,89)	33,3
<i>C. haemuloni</i>	2 (1,78)	2 (1,78)	100,0
<i>C. krusei</i> / <i>Issatchenkia orientalis</i> ¹	6 (5,36)	4 (3,57)	66,6
<i>C. parapsilosis</i>	22 (19,64)	23 (20,54)	95,6
<i>C. tropicalis</i>	31 (27,7)	31 (27,7)	100,0
<i>C. pelliculosa</i> / <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1 (0,89)	1 (0,89)	100,0
<i>C. utilis</i> / <i>Cyberlindnera jadinii</i>	0 (0,0)	1 (0,89)	0,0
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2 (1,78)	2 (1,78)	100,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 (2,68)	3 (2,68)	100,0
Total de amostras avaliadas	112 (100,0)	112 (100,0)	

Fonte: A autora, 2018.

Os dados da tabela 8 mostram a correlação dos resultados obtidos entre as metodologias MALDI-TOF MS e a identificação do Vitek 2 realizadas no IBEX. Na tabela é possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a identificação das espécies de leveduras nas duas técnicas avaliadas. Para 10 (66,6%) espécies de leveduras, as identificações através das técnicas de MALDI-TOF MS e Vitek 2 foram concordantes.

Tabela 8 – Correlação entre os resultados obtidos através do MALDI-TOF MS e Vitek 2

Espécie de leveduras	MALDI-TOF	Vitek 2	p valor*
<i>C. albicans</i>	24 (100,0)	24 (100,0)	-
<i>C. dublinienses</i>	1 (100,0)	1 (100,0)	-
<i>C. famata</i>	0 (0,0)	1 (100,0)	0,19
<i>C. glabrata</i>	19 (100,0)	18 (94,7)	0,76
<i>C. guilliermondii</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1 (100,0)	1 (100,0)	-
<i>C. haemuloni</i>	2 (100,0)	2 (100,0)	-
<i>C. krusei/Issatchenkia orientalis</i> ¹	4 (100,0)	4 (100,0)	-
<i>C. metapsilosis</i>	2 (100,0)	0 (0,0)	0,12
<i>C. orthopsilosis</i>	2 (100,0)	0 (0,0)	0,12
<i>C. parapsilosis</i>	19 (82,6)	23 (100,0)	0,38
<i>C. tropicalis</i>	31 (100,0)	31 (100,0)	-
<i>C. pelliculosa/Wickerhamomyces anomalus</i>	1 (100,0)	1 (100,0)	-
<i>C. utilis/Cyberlindnera jadinii</i>	1 (100,0)	1 (100,0)	-
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	2 (100,0)	2 (100,0)	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 (100,0)	3 (100,0)	-
Total de amostras avaliadas	112 (100,0)	112 (100,0)	

*Teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Valores estatisticamente significativos: $p < 0,05$
 Fonte: A autora, 2018.

A tabela 9 mostra que não houve também nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as metodologias MALDI-TOF MS e qPCR.

Tabela 9 – Correlação entre os resultados obtidos através do MALDI-TOF MS e qPCR

Espécie de leveduras	MALDI-TOF	qPCR	p valor*
<i>C. albicans</i>	24 (100,0)	24 (100,0)	-
<i>C. glabrata</i>	19 (100,0)	19 (100)	-
<i>C. krusei/Issatchenkia orientalis</i> ¹	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)	-
Total de amostras avaliadas	101 (100,0)	99 (100,0)	

Legenda: *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 a amplificação com o “primer” de *C. parapsilosis* para as amostras de *C. orthopsilosis*.

Fonte: A autora, 2018.

Considerando a comparação entre MALDI-TOF MS e qPCR foi possível observar que apenas a espécie *C. parapsilosis* divergiu na identificação, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,47$) (tabela 9).

5 DISCUSSÃO

As infecções causadas por *Candida* estão entre as principais causas de infecções fúngicas e podem desencadear desde infecções localizadas até processos invasivos, acometendo qualquer órgão e podendo ser muito grave e levar ao óbito, principalmente, em pacientes susceptíveis (PAPPAS et al., 2004; DORNELAS-RIBEIRO, 2006). O aumento da incidência das micoses sistêmicas em pacientes hospitalizados, em geral, está associado basicamente, ao manejo e à abordagem propedêutica das doenças de base desses indivíduos. A neutropenia, decorrente de processos patológicos ou induzida por medicamentos, é, com frequência, um dos mais importantes fatores de risco para a aquisição de infecções fúngicas invasivas (ANAISSE, 1992; DORNELAS-RIBEIRO, 2006).

O gênero *Candida* é reponsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente das instituições de saúde e constitui causa relevante de infecções da corrente sanguínea que podem atingir qualquer órgão, produzindo condições disseminadas (COLOMBO E GUIMARÃES, 2003; NEUFELD, 2009)

Considerando a epidemiologia das candidemias, estudos multicêntricos têm relatado a frequência de isolamento das espécies, levando em consideração a distribuição geográfica e o período de estudo. Características climáticas, nível de classificação dos hospitais e a gestão dos processos clínicos, laboratoriais e de tratamento são outros fatores que também podem influenciar a taxa de isolamento das espécies (COLOMBO et al., 2003; NEUFELD, 2009). Neufeld (2009), em uma investigação no Rio de Janeiro, demonstrou a presença de 38,46% de *C. albicans*, 34,61% *C. parapsilosis lato sensu*, 11,5% *C. guilliermondii* e 7,69% de *C. tropicalis* na corrente sanguínea. Num estudo multicêntrico, conduzido por Nucci e colaboradores (2013), na América Latina, com 672 casos de candidemia, *C. albicans* (37,6%), *C. parapsilosis* (26,5%) e *C. tropicalis* (17,6%) foram as leveduras com maior prevalência. Em estudo realizado por Colombo e colaboradores (2014), analisando a epidemiologia de candidemia em pacientes críticos, *C. albicans* foi o agente etiológico mais frequente, com 42% dos isolados, seguida de *C. tropicalis* (20%), *C. parapsilosis* (19%) e *C. glabrata* (9%). Segundo Dol e colaboradores (2016), *C. não-albicans* foram prevalentes no Programa de Vigilância Nacional de Candidemia Nosocomial, no Brasil, com a seguinte distribuição para as espécies

mais prevalentes: *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%), enquanto que a *C. albicans* representou 34,3% dos isolados.

O estudo conduzido por Colombo e colaboradores (2013) demonstrou uma maior frequência de isolamento de *C. glabrata* em hospitais privados brasileiros (13%) do que nos hospitais públicos (3%), sendo essa levedura considerada um patógeno emergente. No presente estudo, observou-se a prevalência das espécies de *Candida* em infecções sistêmicas, obedecendo a seguinte ordem: *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, foi encontrado: *C. dubliniensis*, *C. famata*, complexo *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. utilis* (0,9%) e outras espécies de leveduras (4,5%).

Nos estudos multicêntricos nacionais de Colombo et al (2006) e Matta et al (2007), *C. tropicalis* foi a espécie não-*albicans* mais prevalente, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A identificação de leveduras de importância clínica, usando sistemas convencionais e comerciais, não é adequada para as espécies menos comuns, embora o sistema Vitek 2 se apresente superior a outros métodos fenotípicos, para o diagnóstico de leveduras (POSTERARO et al., 2015).

Os métodos convencionais de identificação fúngica são úteis, porém demandam um maior tempo. A introdução do MALDI-TOF MS no laboratório de microbiologia representou uma mudança na capacidade de identificação, reduzindo o tempo de retenção de diagnóstico e seu custo (SOW et al., 2015). A metodologia melhorou o poder discriminativo dos métodos fenotípicos, aumentando o *roll* de organismos identificados e fornecendo uma identificação precisa a nível de espécie de isolados de bactérias e fungos (STEFANIUK et al., 2016). Apesar do alto custo inicial do equipamento, a facilidade de manuseio, menor tempo de execução e o baixo custo por teste e a precisão na identificação, constituem uma mudança de paradigma no campo de diagnóstico microbiológico (TRAN et al., 2015).

O uso de novas tecnologias para caracterização de microrganismos, em especial leveduras, vêm tornando a microbiologia uma poderosa ferramenta para o manejo das doenças infecciosas (COLOMBO et al., 2013; CHAO et al., 2014).

Nesta investigação, foram utilizadas 6 metodologias para caracterização de leveduras. Dessas, duas apresentavam uma capacidade de caracterizar

presuntivamente o complexo *C. albicans* (produção de tubo germinativo e de clamidósporos), uma outra metodologia empregava meio cromogênico, que através de um sistema de cores produzidas pelas colônias de leveduras, identificava primariamente o complexo *C. albicans* (cor verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (rosa). As outras três metodologias com fundamentos distintos, permitiram a classificação dos isolados a nível de espécie.

No presente estudo, a produção de tubo germinativo e a produção de clamidósporos foram considerados testes preliminares. Das 112 leveduras analisadas, 25 produziram tubos germinativos e clamidósporos. Dessas, 1 foi caracterizada por outras metodologias como *C. dubliniensis* e as outras 24 como *C. albicans*. Estudos mostram que existe uma diferença de indução na produção de tubo germinativo entre *C. albicans* e a *C. dubliniensis*, sendo essa indução mais lenta na *C. dubliniensis* (SULLIVAN et. al., 2004; DAVIS, SHIELDS & MERZ, 2005). Nesse trabalho, essa diferença não foi evidenciada com o período de incubação em que foram submetidas as amostras.

CHROMagar®-*Candida* é um meio seletivo e diferencial que permite o isolamento e a identificação de leveduras simultaneamente (por reações de cor e macromorfologia) com bom grau de precisão (ODDS & BARNAERTS, 1994). O meio facilita a detecção e a identificação de leveduras em culturas mistas e pode fornecer resultados com uma antecedência de 24 a 48 h relativamente às identificações padrões (ODDS & BARNAERTS, 1994; PFALLER, HOUSTON & COFFMANN, 1996). O uso de CHROMagar® é vantajoso para auxiliar na detecção de mais de uma espécie de levedura em uma mesma amostra (ANSON & ALLEN, 1997; CAMPANHA et al., 2005).

As características morfotintoriais das leveduras no meio CHROMagar®-*Candida* evidenciaram uma ótima identificação para o complexo *C. albicans* e para *C. tropicalis*, corroborando com os estudos apresentados por Daef et al., (2014). Com relação à *C. krusei*, foi encontrado similaridade entre as colorações também para *C. famata*, complexo *C. glabrata* e complexo *C. parapsilosis*, o que está de acordo com estudos realizados por Araújo e colaboradores (2005). A maior diferença entre *C. krusei* e as outras espécies, está na textura da colônia, que tem um aspecto mais seco, permitindo assim sua fácil evidenciação.

O CHROMagar®-*Candida* utilizado para caracterização fenotípica de leveduras possibilitou a discriminação presuntiva entre as espécies de leveduras

mais comumente encontradas em amostras clínicas, porém apresenta a limitação de diferenciar apenas um número restrito de espécies de *Candida*, deixando de lado espécies emergentes (ODDS & BARNAERTS, 1994). Com relação as espécies não contempladas por essa metodologia, *C. dubliniensis* apresentou colônias de cor verde claro indistinguível do complexo *C. albicans*, contrastando com dados de autores que reportam tonalidades de verde mais escuro, a partir de isolados primários (HOSPENTHAL et al., 2006), 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.

Diante disso, pode-se concluir que a autenticidade dos isolados de leveduras pelo meio cromogênico depende de testes adicionais, como tem sido descrito na literatura (ODDS & BARNAERTS, 1994; HOSPENTHAL et al., 2006).

A identificação pelo sistema Vitek 2 apresentou superioridade em relação ao CHROMagar®-*Candida* na identificação de outras espécies de *Candida* (incluindo espécies mais raramente encontradas). No entanto, foi observado neste estudo que o equipamento não foi capaz de separar as espécies do complexo *C. parapsilosis*, o que foi também observado por LOÍEZ et al., 2006. Em um estudo que testou apenas espécies mais comuns de *Candida*, o sistema Vitek 2 forneceu identificações corretas para 62 de 68 isolados (VIJGEN et al., 2011). Segundo Meletiadis et al (2011), o sistema automatizado Vitek2-YST para isolados comuns (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) foi capaz de identificar 91% dos isolados. De acordo com Kumar et al (2013), foi observado alto percentual de acerto (97%), para a identificação de espécies clínicas de *Candida*, pelo sistema Vitek 2-YST.

Através da identificação realizada pelo Vitek 2 no laboratório de origem, foram obtidas 23 amostras de *C. albicans*, porém a amostra 264 (líquido abdominal), identificada inicialmente como *C. guilliermondii*, foi identificada, posteriormente, pelos métodos selecionados para este estudo, como *C. albicans*, totalizando, assim, 24 amostras de *C. albicans*. Estudos com elevadas taxas de identificação por bioquímica automatizada para isolados de *C. albicans* também tem sido relatados (Valenza et al., 2008). A amostra 168 apresentou baixa discriminação entre *C. famata/lusitaniae* (51%) e *C. parapsilosis* (49%), porém, a segunda identificação pelo Vitek 2, MALDI-TOF MS e PCR em tempo real confirmaram se tratar de *C.*

parapsilosis. De um total de 16 *C. glabrata* identificadas no laboratório de origem, mais duas foram acrescentadas, pois essas haviam sido identificadas, inicialmente, como *C. krusei* (243 e 244), totalizando 18 *C. glabrata* pelo Vitek 2. No entanto, o MALDI-TOF MS e qPCR identificaram uma amostra a mais, totalizando 19 identificações de *C. glabrata* (amostra nº 195). De um total de 3 *C. guilliermondii*, inicialmente identificadas, apenas a amostra de nº 149 manteve essa identificação. A amostra de nº 200 foi identificada, posteriormente, como *C. utilis* e a amostra nº 264 como *C. albicans*. A amostra nº 241, inicialmente identificada como *C. famata*, posteriormente pelo Vitek 2, MALDI-TOF MS e qPCR, foi caracterizada como *C. tropicalis*, totalizando 31 amostras de *C. tropicalis*, ao final.

Considerando que os cartões utilizados na identificação original pelo Vitek 2 foi o YBC, que foi descontinuado e substituído pelo cartão YST, as diferenças de identificação observadas no laboratório de origem e na confirmação dos resultados pelo próprio Vitek 2, poderiam estar relacionadas à mudança dos cartões. Além disso, determinadas espécies apresentam grande similaridade bioquímica, o que leva a uma baixa discriminação entre espécies muito correlacionadas. Melhem et al (2013) contudo, demonstram bons resultados discriminatórios para o sistema Vitek 2-YST. De qualquer forma, Meletiadis et al (2011) reforçam que os usuários de sistemas comerciais devem estar cientes dos resultados errôneos nos sistemas de identificação comerciais.

A identificação equivocada de espécies de *Candida*, como *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e outras espécies raras, pode determinar consequências adversas em termos do manejo clínico, bem como a incapacidade de discriminar espécies dentro dos complexos *C. albicans/dublinskiensis/africana*, *C. glabrata/nivariensis/bracarensis*, e *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis* podendo levar a análises epidemiológicas discrepantes (POSTERARO et al., 2015). Excluindo-se *C. dublinskiensis*, as outras espécies desses complexos não são presuntivamente identificáveis por métodos convencionais disponíveis, mas esta desvantagem foi superada com o advento da Espectrometria de Massas por Tempo de Voo - MALDI-TOF MS (SANTOS et al., 2011).

No presente estudo, através da Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS), foi possível caracterizar as espécies do complexo *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*, sendo a *C. parapsilosis lato sensu*, inicialmente identificada pelo Vitek 2, o que totalizou 23 amostras, enquanto que,

pelo MALDI-TOF MS, foi possível a discriminação do complexo *C. parapsilosis*, totalizando 19 amostras de *C. parapsilosis sensu stricto*, 2 amostras *C. orthopsilosis* e 2 *C. metapsilosis*. Clinicamente, a discriminação entre as 3 espécies do complexo *C. parapsilosis* é importante em função das diferenças na virulência e susceptibilidade antimicrobiana. *Candida orthopsilosis* apresenta um comportamento similar ao da *C. parapsilosis*, enquanto que *C. metapsilosis* parece possuir um potencial de virulência reduzido (BERTINI et al., 2013; NÉMETH et al., 2013). A metodologia também permitiu a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dublinienses*, sendo também capaz de identificar espécies raras de *Candida*. Em laboratórios de microbiologia clínica, o sistema MALDI-TOF MS se apresenta como 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 encontradas na clínica (CHAO et al., 2014).

Nesta pesquisa, as amostras que apresentaram "scores" inferior a 1,7 foram repetidas, conforme sugerido pela literatura (LEE et al., 2017). Foi realizada a extração direta, utilizando ácido fórmico a 85%, porém estudos mostraram que, para a extração de proteínas de leveduras, como as de *Cryptococcus neoformans*, se faz necessária a extração com ácido fórmico/acetoneitrila, que consome mais tempo e é mais laboriosa, porém fornece melhores resultados. A literatura mostra que a extração simples com ácido fórmico permite a identificação da maioria dos isolados de leveduras (inclusive espécies incomuns), exceto *C. neoformans* (LEE et al., 2017).

As características combinadas de tempo de resposta rápida, identificação precisa e baixo custo associadas com a identificação de leveduras pelo MALDI-TOF MS, têm o potencial de impactar positivamente o atendimento ao paciente, bem como a eficiência laboratorial (BUCHAN, 2013).

Chao e colaboradores (2014) observaram diferenças de desempenho entre dois métodos fenotípicos convencionais (Phoenix 100 YBC e Vitek 2 YST) e dois sistemas de espectrometria de massas, porém, no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas de desempenho entre a segunda identificação do Vitek 2 e MALDI-TOF MS.

Este trabalho também objetivou a avaliação do desempenho do MALDI-TOF MS para identificação de leveduras, através da análise comparativa entre os

métodos e estudos estatísticos dos resultados. Os resultados obtidos demonstraram uma superioridade do MALDI-TOF MS frente ao Vitek 2, na identificação do complexo *C. parapsilosis*, e foi possível identificar maior concordância entre as espécies quando comparados os resultados do MALDI-TOF MS com qPCR. Os estudos de Martinez-Lamas e colaboradores (2011), Kabir & Ahmad (2013) e Criseo, Scordidno & Romeo (2015) estão em consonância com os dados aqui apresentados. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as 3 metodologias estudadas, provavelmente em função do número reduzido de amostras por espécie analisada.

Como alternativa à identificação baseada em MALDI-TOF MS, os métodos de identificação baseados em PCR continuam sendo ferramentas adequadas, não apenas para a identificação de leveduras clinicamente relevantes menos comuns, mas também para leveduras que falham na identificação convencional ou que representam perfis fenotípicos ou bioquímicos incomuns (PFALLER,2012).

Uma das limitações do estudo foi a impossibilidade de utilização de *primers* específicos para todas as espécies estudadas. Foram consideradas as espécies com maior incidência de infecções fúngicas sistêmicas, para a análise molecular, através do PCR em tempo real. Além disto, o *primer* utilizado para *C. guilliermondii* não foi capaz de detectar fluorescência através de qPCR. O desenho do primer tem influência na especificidade e eficiência da amplificação (Neufeld, 2009).

O uso de métodos de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo e moleculares para identificação clínica de leveduras deve ser levado em consideração, especialmente em grandes laboratórios de microbiologia clínica que, em geral, possuem tecnologia de ponta e maiores recursos (POSTERARO et al., 2015).

Os métodos convencionais de identificação fúngica são de inegável utilidade, porém demandam um tempo maior. Importa reafirmar que a introdução do MALDI-TOF MS representou uma mudança na precisão da identificação microbiana, reduzindo o tempo de identificação e o custo (SOW et al., 2015). A metodologia melhorou claramente a capacidade de diagnóstico dos métodos fenotípicos, por sua grande capacidade discriminativa (STEFANIUK et al., 2015).

Uma outra limitação encontrada no estudo foi a perda de viabilidade de cepas de leveduras em decorrência dos anos transcorridos: 7 cepas em 2004, 8 em 2005, 5 em 2006 e 10 em 2007, totalizando 30 cepas. A partir de 2008, todas as amostras

foram recuperadas através de subcultivos em ágar BDA. A análise da viabilidade das cepas, por ano, resultou nos seguintes percentuais de crescimento: 2004 (12,5%), 2005 (11,1%), 2006 (16,7%), 2007 (9,0%) e a partir de 2008, obtivemos 100% de viabilidade das cepas.

A partir da recuperação das leveduras e dos testes de autenticação das mesmas, foi possível a criação de uma coleção de cultura (apêndice A e anexo A).

As coleções de cultura de microrganismos dão importante contribuição para a preservação de culturas autenticadas para a comunidade científica em geral (ABREU & TUTUNJI, 2004).

O método de preservação de leveduras em água destilada (método de Castellani) tem sido descrito por diversos autores como um método simples, de baixo custo e com capacidade de evitar o pleomorfismo das amostras, observado quando se realiza subcultivos sucessivos (CASTAGNETTA & MUNGELLUZZI, 1962; ELLIS, 1979; SMITH, 1983; URDANETH & LACAZ, 1965). De acordo com a literatura, as leveduras se mantêm viáveis por períodos médios de 12 - 18 meses em água destilada estéril, podendo ser necessária a reposição do volume de água, devido a redução, após 6 meses em tubos com tampas de rosca de plástico (MCGINNIS, PADHYE, & AJELLO, 1974; RODRIGUES, LÍRIO & LACAZ, 1992; DIOGO, 2005). A preservação em banco de leveduras, criado através do presente trabalho, irá proporcionar estudos futuros para diversas linhas de pesquisa, utilizando como documento operacional o Compêndio de Métodos e de Boas Práticas em Coleção de Cultura de leveduras do IBEX (apêndice B).

CONCLUSÕES

Com base na realização do presente estudo, foi possível delinear as seguintes conclusões:

- a) É possível a recuperação de leveduras a partir de frascos de hemocultura automatizada;
- b) O estudo de viabilidade das amostras recuperadas permitiu verificar que a *Candida tropicalis* foi a espécie mais prevalente com 27,7% das amostras, seguida por *C. albicans* em 21,6% e *C. parapsilosis* em 20,7%;
- c) A autenticação das leveduras pode ser realizada por meio de diferentes métodos, como as técnicas de produção de tubo germinativo e de clamidospóros, teste cromogênico, prova bioquímica automatizada (sistema Vitek 2), análise molecular (PCR em tempo real) e análise proteômica (Espectrometria de massas por tempo de voo - MALDI-TOF MS);
- d) O estudo permitiu verificar que as provas de produção de tubo germinativo, produção de clamidósporos e teste cromogênico são metodologias presuntivas, requerendo testes mais específicos para identificação de leveduras;
- e) A identificação bioquímica através do Vitek 2, se mostrou um método seguro para a caracterização de leveduras, porém evidenciou a inabilidade na identificação do complexo *C. parapsilosis*;
- f) O MALDI-TOF MS apresentou alto desempenho para a identificação de leveduras clinicamente relevantes, confirmando a metodologia como um protocolo seguro para a identificação de leveduras na rotina microbiológica;
- g) A técnica de PCR em tempo real permitiu a caracterização das leveduras com maior prevalência no estudo, apresentando a maior concordância com a técnica de MALDI-TOF MS, quando comparada ao Vitek 2;

- h) As metodologias de identificação avaliadas podem ser incorporadas a coleções de cultura de leveduras para a autenticação dos microrganismos estocados;
- i) O presente estudo proporcionou a construção de protocolos técnicos para a caracterização e preservação de leveduras na Coleção de Cultura de Leveduras do Centro de Estudos em Biodefesa do Instituto de Biologia do Exército;
- j) Através da autenticação das leveduras do estudo, foi possível a criação de um Banco de Leveduras Institucional, com intuito de atender a demanda de pesquisa do Centro de Estudos em Biodefesa do Instituto de Biologia do Exército;
- k) Foi possível a elaboração de um Compêndio de Métodos e de Boas Práticas para a operacionalização da Coleção de Cultura de Leveduras do Centro de Estudos em Biodefesa do Instituto de Biologia do Exército.

REFERÊNCIAS

- ABASTABAR, M., HOSSEINPOOR, S., HEDAYATI, M. T., SHOKOHI, T., VALADAN, R., MIRHENDI, H., MOHAMMADI, R., AGHILI, S.R., RAHIMI, N., ASLANI, N., HAGHANI, I., GHOLAMI, S. **Hyphal wall protein 1 gene: A potential marker for the identification of different *Candida* species and phylogenetic analysis.** *Curr Med Mycol*, 2(4): 1-8, 2016.
- 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.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Comunicado de risco Nº 01/2017 - GVIMS/GGTES/ANVISA. Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina.** *Anvisa*. 2017
- ALMEIDA, J. N., MOTTA, A. L., ROSSI, F. **First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil.** *Clinics*. 67: 1229-1231. 2012.
- ANDRADE, T. S., BASTOS, L. T., SCOLA, M. C. G & FELIPPE, J. M. M. **Seção de coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz - 68 anos de história dedicados à saúde pública.** *Bepa*, 5 (59): 10-15. 2008.
- ANSON J. J. & ALLEN, K. D. **Evaluation of CHROMagar *Candida* medium for the isolation and direct identification of yeast species from the female genital tract.** *Br J Biomed Sci*. 54: 237-239. 1997.
- C. R. ARAUJO, K. C. MIRANDA, X. S. PASSOS, L. K. HASIMOTO SOUZA, J. A. LEMOS, C. H. ABBAS KHRAIS, C. R. COSTA, M. R. R. SILVA E O. F. L. FERNANDES. **Identificação de Leveduras do Gênero *Candida* por Métodos Manuais convencionais e pelo método Cromogênico Chromagar - *Candida*.** *Revista de Patologia Tropical* 34 (1): 37-42. 2005.
- AUCOTT JN, FAYEN J, GROSSNICKLAS H, MORRISSEY A, LEDERMAN MM, SALATA RA. **Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae*: report of three cases and review.** *Rev Infect Dis*. 1990;12(3):406-11. 1990.
- BARBEDO, L. S. & SGARBI, D. B. G. **Candidíase.** *J. bras Doenças Sex Transm*. 22(1): 22-38 - issn: 0103-4063. 2010.
- BARCELOS, L. F. & AQUINO, J. L. **Tratado de análises clínicas.** 1 ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2018.
- 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*. 303: 98-1-3. 2013.

- BOUZA, E., & MUNOZ, P. **Invasive infection caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium spp.*** *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (Suppl. 1): 76-85. 2004.
- BRUNKE, S. & HUBE, B. **Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies.** *Cellular Microbiology.* 15 (5): 701-708. doi: 10.1111/cmi.12091. 2013.
- BUCHAN, B. W. & LEDEBOER, N. A. **Advances in Identification of Clinical Yeast Isolates by Use of Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.** *Journal of Clinical Microbiology.* Volume 51 Number 5.p. 1359–1366. 2013.
- BUCHTA, V., ZAK, P., KOHUT, A. & OTCENASEK. M. **Case report: disseminated infection of *Blastoschizomyces capitatus* in a patient with acute myelocytic leukemia.** *Mycoses.* 44: 505-512. 2001.
- BULANI, A. & HOOSEN, A. **Use of matrix-assited laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry analyser in a diagnostic microbiology laboratory in a developing country.** *Afr J Lab Med.* 6(1), a598, <https://doi.org/10.4102/ajlm.v6i1.598>. 2017.
- BUTTERFIELD, W.; JONG, S. C. & ALEXANDER, M. T. **Preservation of living fungi pathogenic for man and animals.** *Canad. J. Microbiol.*, 20: 1665-1673, 1974.
- CASSONE M, SERRA P, MONDELLO F, GIROLAMO A, SCAFETTI S, PISTELLA E, VENDITTI M. **Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype bouldarii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism.** *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5340-3.
- CAVALCANTI, S. C., FREITAS, R.S., VIDAL, M.S., DANTAS, D.C., LEVI, J.E., MARTINS, J.E.C. **Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains.** *Mem Ins Oswaldo Cruz.* 102: 41-47. 2007.
- 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.
- N. H. CAMPANHA, K. H NEPPELENBROCK, D. M. P. SPOLIDORIO, L. C. SPOLIDORIO, A. C. PAVARINA. **Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*.** *Oral Diseases.* 11: 392-398.2005.
- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos.** *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA,* 2004.

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

CANTÓN E, PEMÁN J, SASTRE M, ROMERO M, ESPINEL-INGROFF A. **Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*.** *Antimicrob Agentes Ch*; 50(8): 2829-2832. 2006.

CARRASCO.L., RAMOS, M., GALISTEO, R., PISA, D., FRESNO, M., GONZÁLES, M. E. **Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy.** *J Clin Microbiol* 2005; 43(2): 635-640.

CASTAGNETTA, E. & MUNGELLUZZI, C. **Sulla conservazione per lungo tempo dei lieviti, dei dermatofiti e altri funghi in acqua distillata secondo il metodo di Castellani per evitare fenomeni pleomorfici.** *Arch. Ital. Sci. med. trop.* 43: 73-78. 1962.

CASTANHEIRA, M., WOOSLEY, L. N., DIEKEMA, D. J., JONES, R. N. & PFALLER, M. A. ***Candida guilliermondii* and other species of *Candida* Missidentified as *Candida famata*: Assessment by Vitek 2, DNA sequencing analysis, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in two global antifungal surveillance programs.** *Journal of Clinical Microbiology.* 51: 117-124. 2013.

Q. T. CHAO, T. F. LEE, S. H. TENG, L. Y. PENG, P. H. CHEN, L. J. TENG, P. R. HSUEH. **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* 9 (10): e109376.2014.

COLOMBO, A. L. & T. GUIMARÃES. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp.** *Rev. Soc Bras Med Tropical*, 36(5): 599-607. 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. for the BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.8, p.2816-2823, 2006

COLOMBO, A. L., GARNICA, M., CAMARGO, L. F. A., CUNHA, C. A., BANDEIRA, A. C., BORGHI, D., CAMPOS, T., SENNA, A. L., DIDIER, M. E. V., DIAS, V. C. & NUCCI, M. ***Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals.** *Medical Mycology.* 51: 38-41. 2013.

COLOMBO, A. L., CORTES, J. A., ZURITA, J., GUZMAN-BLANCO, M., MATUTE, T. A., TELLES, F. Q., SNTOLAYA, M. E., TIRABOSCHI, I. N., ECHEVARRIA, J. SIFUENTES, J., THOMPSON-MOYA, L. & NUCCI, M. **Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America.** *Rev. Iberoam. Micol.* 30 (3): 150-157. 2013.

- COLOMBO, A. L., GUIMARÃES, T. SUKIENIK, T., PASQUALOTTO, A. C. ANDREOTTI, R., QUEIROZ-TELLES, F., NOUÉR, S. A & NUCCI, M. **Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period.** *Intensive Care Med.*40:1489-1498. 2014.
- CONSENSO. **Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de microrganismos.** *Sociedade Brasileira de Microbiologia.* 2006.
- COSTA, C. P. & FERREIRA, M. C. **Preservação de microrganismos: revisão.** *Revista de Microbiologia,* São Paulo, 22 (3): 263-268. 1991.
- CRISEO, G., SCORDINO, F. & ROMEO, O. **Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species.** *Journal of Microbiological Methods.*v 111 p. 50-56. 2015.
- DAEF, E., MOHARRAM, A., SALWA SEIF ELDIN, S. S., ELSHERBINY, N., MOHAMMED. M. **Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species.** *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 1, 255-262. 2014.
- L. E. DAVIS, C. E. SHIELDS & W. G. MERZ. **Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production by *Candida dubliniensis*.** *J. Clin.Microbiol.*, 43 (5): 2465-2466. 2005.
- D'ANTONIO, D., MAZZONI, A., IACONE, A., VIOLANTE, B., CAPUANI, M. A., SCHIOPPA, F. & ROMANO, F. **Emergence of fluconazole-resistant strains of *Blastoschizomyces capitatus* causing nosocomial infections in cancer patients.** *J.Clin. Microbiol.*34: 753-755. 1996.
- DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas.** *Sete Lagoas, MG. Universidade Federal de São João.* UFSJ. 2014.
- DEL NEGRO, G. M. B. **Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco para candidemia.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2008
- DENIS, J., M. MACHOUART, F. MORIO, M. SABOU, C. KAUFFMANN-LaCROIX, N. CONTET-AUDONNEAU, E. CANDOLFI & V. LETSCHER-BRU. **Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identifying Clinical *Malassezia* Isolates.** *J. Clin.Microbiol.*, 55: 90-96. January. 2017.
- DIOGO, HILDA CONCEIÇÃO. **Preservação de fungos em água destilada.** *An Bras Dermatol.* 80: (6). 591-594. 2005.
- DOL, A. M., PIGNATARI, A. C. C., EDMOND, M. B., MARRA, A. R., CAMARGO, L. F. A., SIQUEIRA, R. A., MOTA, V. P. & COLOMBO, A. L. **Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a brazilian**

national surveillance program. *Plos One*. doi: 10.1371/journal.pone.0146909. 2016.

DORNELAS-RIBEIRO, M. 2006. **Análise comparativa por diferentes metodologias do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas de espécimes clínicos**. Dissertação de Mestrado. IMPPG-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. 131p.

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) JCR*, v. 107, p. 31-38, 2012.

DOUGLAS, L.J. **Medical importance of biofilms in *Candida* infections**. *Rev. Iberoam. Micol.* 19: 139-143. 2002.

DURAN, E. L., MUJICA, M. T., JEWUSCHOWICE, V. M., FINQUELIEVICH, J. L. PINONI, M. V., JOVANNITTI, C. A. **Estúdio de la variabilidade genética entre aislamentos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas**. *Rev. Iberoam Micol.*24: 268-271. 2007.

ELLIS, J. J. **Preserving fungus strains in sterile water**. *Mycologia*, 71: 1072-1075. 1979.

ENACHE-ANGOULVANT A, HENNEQUIN C. **Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review**. *Clin Infect Dis.* 2005;41(11):1559-68.

M. J. ESPY, J. R. UHL, L. M. SLOAN, S. P. BUCKWALTER, M. F. JONES, E. A. VETTER, J. D. C. YAO, N. L. WENGENACK, J. E. ROSENBLATT, F. R. COCKERILL AND T. F. SMITH. **Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing**. *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (1): 165. 2006.

FERREIRA, F. S. **Caracterização de leveduras isoladas da corrente sanguínea em pacientes atendidos em hospitais públicos do município de Salvador, Bahia, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo. 2016.

FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos patogênicos**. *Biológico*. 63: 73-82. 2001.

C. FIGUERAS, C., DÍAZ DE HEREDIA, C., GARCÍA, J.J., NAVARRO, M., RUIZ-CONTRERAS, J., ROSSICH, R., RUMBAO, J., FRICK, M.A.& ROSELLÓ, E.M..

Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *An Pediatr(Barc)*. p. 1-17. 2011.

FINKEL, J. S. & MITCHELL, A. P. **Genetic control of *Candida albicans* biofilm development.** *Nature Reviews Microbiology*. 9(2): 109-118. doi:10.1038/nrmicro2475. 2011.

FOY, C. A. & PARKES, H. C. **Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory.** *Clin Chem*. 47:990-1000. 2001.

FUJINO S, AKIYAMA D, AKABOSHI S, FUJITA T, WATANABE Y, TAMAI Y. **Purification and characterization of phospholipase B from *Candida utilis*.** *Biosci Biotech Bioch*. 70(2): 377-386. 2006.

GIOLO, M. P. & SVIDZINSKI, T. I. E. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 46 (3): 225-234. doi:10.1590/S1676-24442010000300009. 2010

GIRÃO, M. D., PRADO, M. R., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. A., MONTEIRO, A. J., SIDRIM, J. J. C & ROCHA, M. F. G. **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, mai/jun. 2004.

GIRMENIA C, PIZZARELLI G, CRISTINI F, BARCHIESI F, SPREGHINI E, SCALISE G ET AL. ***Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies.** *J Clin Microbiol*. 44(7): 2458-2464. 2006.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook.** *Springer Science & Business Media*. 2006.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos.** *Lavras, MG. Universidade Federal de Lavras - UFLA*. 2011.

GULLU AU, AKCAR M, ARNAZ A, KIZILAY M. ***Candida parapsilosis* tricuspidnative valve endocarditis: 3-year follow-up after surgical treatment.** *ICVTS*. 7: 513-514. 2008.

GUPTA, A., MI, H., WROE, C., JAQUES, B. and TALBOT, D. **Fatal *Candida famata* peritonitis complicating sclerosing peritonitis in a peritoneal dialysis patient.** *Nephrol Dial Transpl*. 21: 2036-2037. 2006.

HAZEN, K. C., THEISZ, G. W., HOWELL, S. A. **Chronic urinary tract infection due to *Candida utilis*.** *J Clin Microbiol*.37(3): 824-827. 1999.

HERNANDEZ, S., GONZALEZ, G. M., MCCARTHY, D. I., COLOMBO, A. L., NAJVAR, L. K., BOCANEGERA, R. & GRAYBILL, J. R. **Alternative to amphotericin B for *Candida rugosa*infection.** *J Antimicrob Chemoth*. 54: 477-480. 2004.

HIGASHI, C. M., TAKASHINA, F. H., RECHENCHOSKI, D. Z., STIPP-ABE, A. T., VESPERO, E. C., QUESADA, R. M. B. & PELISSON, M. **Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp.** Ciências Biológicas e da Saúde. Londrina. v 36, n1, supl, p. 233-242. Ago. 2015

HINRICHSEN SL, FALCÃO É, AGUIAR T, VILELLA S, COLOMBO AL, NUCCI M, MOURA. L., RÊGO, L., LIRA, C. & ALMEIDA, L. **Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil** *Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil.* *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(4):394–8. 2008.

HOSPENTHAL, D. R., BECKIUS, M. L., FLOYD, K. L., HORVATH, L. L AND 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.* 5:1-5. 2006.

JUYAL D, SHARMA M, PAL S, RATHAUR VK, SHARMA N. **Emergence of non-albicans *Candida* species in neonatal candidemia.** *N Am J Med Sci.*;5:541–5. 2013

KABIR, M. A. & AHMAD, Z. ***Candida* Infections and Their Prevetion.** ISRN Preventive Medicine. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/763628>. 2013.

KARAS, M. & HILLENKAMP, F. **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** *Analytical chemistry.* v. 60, n 20, p 2299-2301. 1988.

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 bacteriaand yeast.** *BMC Microbiology.* 17:128. DOI 10.1186/s12866-017-1037-z. 2017.

KHAN ZU, AL-SWEIH NA, AHMAD S, AL-KAZEMI N, KHAN S, JOSEPH L. & CHANDY, R. **Outbreak of fungemias among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole.** *J Clin Microbiol.* 45(6): 2025-2027. 2007.

KOEHLER, A., DALLEMOLE, D. R., RIÇA, L. B., CORBELLINI, V. A. & RIEGER, A. **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.

KOCSUBÉ, S., TÓTH, M., VÁGVÖLGYI, C., DÓCZI, L., PESTI, M., PÓCSI, I., SZABÓ, J. & VARGA, J. **Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary.** *J Med Microbiol.* 56: 190-195. 2007.

KONEMAN, E. W., WINN, W. C., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., PROCOP, G. W., SCHERECKENBERGER, P. C. and WOODS, G. L. **Koneman Diagnóstico Microbiológico , texto e atlas colorido.** Guanabara koogan. 6ª edição. 2008

KUMAR, S.; VYAS, A.; KUMAR, M.; MEHRA, S. K. **Application of CHROMagar *Candida* 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.

LAFHEY SF, BUTLER G. **Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*.** *Microbiology*. 151: 1073-1081. 2005.

LAN L, XU J. **Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic pathogen *Candida guilliermondii*.** *Microbiology* . 152: 1539-1549. 2006.

LEE, K. H., SHIN, W. S., KIM, D. and KOH, C. M. **The presumptive identification of *Candida albicans* with germ tube induced by high temperature.** *Yonsei Med. J.* Vol. 40, n5. 1999.

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 Bruker Biotyper 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*. 37: 223-230. 2017.

LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. **Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Wiesbaden, v. 22, n. 11, p. 693- 696, 2003.

LONDERO, A. T., WANKE B., LAZERA M. S., & MONTEIRO P. C. F. **Micologia Médica, Fiocruz, Revisão.** 2004.

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*. 56:455-457. 2006.

LOGUE ME, WONG S, WOLF KH, BETLER G. **A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL α 1 allele at its mating type locus.** *Eukaryotic Cell*.4(6): 1009-1017. 2005.

LOUWAGIE, B., I. SURMONT, J. VERHAEGEN, AND F. ODDS. **Differential and enrichment media for selective culture and recognition of yeast species from clinical material.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 14:406–411. 1995.

MAGEE, B. B & MAGEE, P. T. **Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*.** *Rev Iberoam Micol*. 22: 187-193. 2005.

MARTINEZ-LAMAS, L., MOLINO, M. L. P., PARDO, F. VARELA, E. & REGUEIRO, B. J. **Espectrometria de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight vs. metodologia convencional en la identificacion de *Candida non-albicans***. *Enferm Infecc Microbiolo Clin*. 29 (8): 568-572. 2011.

MARTINO, R., SALAVERT, M., PARODY, R., TOMAS, J. F., DE LA CÂMARA, R., VAZQUEZ, L., JARQUE, I., PRIETO, E., SASTRE, J. L., GADEA, I., PEMAN, J. & SIERRA, J. ***Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases**. *Clin. Infect. Dis*. 38:335-341. 2004.

MATTA, D. A.; DE ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. **Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003**. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 57, n. 4, p. 399-404, apr. 2007.

MATTEDE, M. G. S., PIRAS, C., MATTEDE, K. D. S., FERRARI, A. T., BALDOTTO, L. S. and ASSBU, M. S. Z. **Infecções urinárias causadas por *Trichosporon* spp. em pacientes graves internados em unidade de terapia intensiva**. *Rev Bras Ter Intensiva*. 27(3):247-251. 2015.

MAYER, F. L., WILSON, D. & HUBE, B. ***Candida albicans* pathogenicity mechanisms**. *Virulence*. 4(2): 119-128. doi: 10.4161/viru.22913. 2013.

M. R. MCGINNIS, A. A. PADHYE, AND L. AJELLO. **Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, And some aerobic actinomycetes in sterile distilled Water**. *Applied microbiolog*. Vol. 28, no. 2. P. 218-222. 1974.

McMANUS BA, COLEMAN DC, MORAN G, PINJON E, DIOGO D, BOUGNOUX M-E, BORECKÁ-MELKUSOVA, S., BUJDÁKOVA, H., MURPHY, P., D'ENFERT, C. & SULLIVAN, D. J. **Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans***. *J Clin Microbiol*. 46(2): 652-664. 2008.

MEDEIROS EAS, LOTT TJ, COLOMBO AL, GODOY P, COUTINHO AP, BRAGA MS ET AL. **Evidence for pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil**. *J Clin Microbiol* 45(3): 942-947. 2007.

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.

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.* 15:45. DOI 10.1186/s12941-016-0158-9. 2016.

MORAN, G., STOKES, C., THEWES, S., HUBE, B., COLEMAN, D.C. and SULLIVAN, D. **Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*.** *Microbiology.* 150: 3363-3382. 2004.

MOYER, G. J., M. ROMAGNOLI, AND W. G. MERZ. **CHROMagar for presumptive identification and detection of multiple yeast species in oncology surveillance, abstr. F-117, p. 107. In Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology.** *American Society for Microbiology, Washington, D.C.* 1995.

NAKASONE, K. K., PETERSON, A. W., JONG, S. **Preservation and distribution of fungal cultures.** In: Mueller G M, Bills G F, Foster M S. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods.** 1[ed. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 37-47. 2004.

NÉMETH, T., TÓTH, A. SZENZENSTEIN, J., HORVÁTH, P., NOSANCHUK, J, D. e colaboradores. **Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species.** *PLoS One* 8 (7): e68704. 2013.

NEUFELD, P. M. Manual de micologia médica. Técnicas básicas de diagnóstico. Rio de Janeiro: ed. Programa Nacional de Controle de qualidade. 1999.

NEUFELD, P. M. & OLIVEIRA, P. C. **Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril.** *Revista Brasileira de Análises Clínicas,* São Paulo, 40 (3):167-169. 2008.

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)* JCR, v. 46, p. 477-484, 2015.

NUCCI, M., PULCHERI, W., SPECTOR.N., BUENO, A. P., BACHA, P. C., CAIUBY, M. J., ET AL. **Fungal infections in neutropenic patients. A 8-year prospective study.** *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 37(5):397-406. 1995.

NUCCI, M., QUIROZ-TELLES, F., ALVARADO-MATUTE, T., TIRABOSCHI, I. N., CORTES, J., ZURITA, J., GUZMAN-BLANCO, M., SANTOLAYA, M. E., THOMPSON, L., SIFUENTES-OSORNIO, J., ECHEVARRIA, J. L & COLOMBO, A.

L. **Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey.** PlusOne. Volume 8, Issue 3. 2013.

ODDS, F. C AND R. BERNAERTS. **CHROMagarCandida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species.** *J. Clin. Microbiol.* 32:1923–1929. 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* 117: 128–135. 2015.

PAPPAS, P. G., REX, J. H., SOBEL, J. D., FILLER, S. G., DISMUKES, W. E., WALSH, T. J. & EDWARDS, J. E. **Guidelines for treatment of candidiases.** *Clin. Infect. Dis.* 38:161-189. 2004.

M. A. PFALLER, A. HOUSTON & S. COFFMANN. **Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata.** *J.Clin.Microbiol.* 34: 58-61. 1996.

PFALLER, M. A., MESSER, S. A. HOLLIS, R. J., JONES, R. N. & DIEKEMA, D. J. **In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of Candida spp.** *Antimicrob. AgentsChemother.* 46:1723-1727. 2002.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. **Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of Candida glabrata to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance program conducted in 2001 and 2002.** *J Clin Microbiol*, v.42, n.7, p.3142-3146. 2004.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, MENDEZ M, KIBBLER C, ERZSEBET P, CHANG S-C ET AL. **Candida guilliermondii, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the Artemis disk antifungal surveillance program.** *J Clin Microbiol.* 44(10): 3551-3556. 2006.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, COLOMBO AL, KIBBLER C, NG KP, GIBBS DL ET AL. **Candida rugosa, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the Artemis disk antifungal surveillance program.** *J Clin Microbiol.* 44(10): 3578-3582. 2006.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, GIBBS DL, NEWELL VA, NAGY E, DOBIASOVA S ET AL. **Candida krusei, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005.** *J Clin Microbiol.*46(2): 515-521. 2008.

PFALLER MA, WOOSLEY LN, MESSER SA, JONES RN, CASTANHEIRA M. **Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance**

programme. *Mycopathologia* 174:259 –271. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9551-x>. 2012.

PISA, D., RAMOS, M., MOLINA, S., GARCÍA, P. and CARRASCO, L. **Evolution of antibody response and fungal antigens in the serum of a patient infected with *Candida famata***. *J Med Microbiol.*56: 571-578. 2007.

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.*53 (8): 2439-2450. 2015.

PIMENTEL, C. P. V. & FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos em meio de cultura.** *Biológico*, São Paulo, 55 (1/2): 27-33. 1989.

RAMAGE, G., SAVILLE, S. P., THOMAS, D. P., LÓPEZ-RIBOT. J. L ***Candida* biofilms: an update.** *Eukaryotic Cell.* 4(4): 633-638. 2005.

QIANGQIANG, Z., JIAJUN, W., LI, L. **Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: Comparison after 12 years.** *Mycoses.* 41: 255-257. 1998.

RAY, D., GOSWAMI, R., BANERJEE, U., DADHWAL, V., GOSWAMI, D., MANDAL, P et AL. **Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis.** *Diabetes Care.* 30(2): 312-317. 2007.

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.*; 12 (4): 40-45. 2009.

RODERO L, CUENCA-ESTRELLA M, CÓRDOBA S, CAHN P, DAVEL G, KAUFMAN S., GUELFAND L. & RODRÍGUEZ-TUDELA JL. **Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*.** *J Clin Microbiol.* 40(6): 2266-2269. 2002.

RODRIGUES, E. G., LÍRIO, V. S. & LACAZ, C. S. **Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 34 (2): 159-165. 1992

RODRIGUES, A. G., PINA-VAZ, C., COSTA-DE-OLIVEIRA, S. & TAVARES, C. 2003. **Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species.** *J. Clin. Microbiol.*,41(12): 5792-5793.

RODRIGUES, C. F., SILVA, S. & HENRIQUES, M. ***Candida glabrata*: a review of its features and resistance.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.*33(5): 673-688. doi: 10.1007/s10096-013-2009-3. 2014.

ROILIDES E, FARMAKI E, EVDORIDOU J, FRANCESCONI A, KASAI M, FILIOTI J, TSIVITANIDOU M, SOFIANOU D, KREMENOPOULOS G. & WALSH TJ. ***Candida***

tropicalis is a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol.* 41(2): 735-741. 2003.

ROY, B. & MEYER, S. A. **Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*.** *J. Clin. Microbiol.*, 36: 216-218. 1998.

RUHNKE, M. & MASCHMEYER, G. **Management of mycosis in patients with hematologic disease and cancer – Review of the literature.** *Eur. J. Med. Res.*7: 227-235. 2002.

SANDVEN, P. **Epidemiology of candidemia.** *Revista Iberoam Micol.*, v.17, p.73-81, 2000.

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* 71:304-308. 2011.

SARDI, J. C., SCORZONI, L., BERNARDI, T., FUSCO-ALMEIDA, A. M. & MENDES GIANINI, M. J. S. ***Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.** *Journal of Medical Microbiology.* 62 (1): 10-24. doi:10.1099/jmm.0.045054-0. 2013.

SCHADEN E, KOZEK-LANGENECKER SA. **Direct thrombin inhibitors: pharmacology and application in intensive care medicine.** *Intensive Care Med.* 36(7):1127-37. 2010.

SEKYERE, J. O. ***Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen.** *MicrobiologyOpen.* e578. doi.org/10.1002/mbo3.578. 2018

SENET, J. M. **Risk factors and physiopathology of candidíases.** *Rev. Iberoam. Micol.* 14: 6-13. 1997.

SHEMER R, WEISSMAN Z, HASHMAN N, KORNITZER D. **A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*.** *Microbiology.* 147: 2021-2028. 2001.

SILVA, E. C., NASCIMENTO, J., VELEZ, L., MICHEREFF, S. **Coleção de culturas de fungos fitopatogênicos da UFRPE: Pioneira na América Latina.** UFRPE. 2009.

SILVA, F. H. A., PAÇO, F. R., REIS, E. and AMARAL, V. **Infecção por *Saccharomyces cerevisiae* – uma infecção atípica em UTI.** *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011; 23(1):108-111

SILVESTRE JUNIOR AM, MIRANDA MA, CAMARGO ZP. ***Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a Brazilian population.** *Braz J Microbiol.* 41(3):628-34. 2010.

SMITH, D. & ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi, Kew (UK).** *Commno wealth Mycological Institute.* 1983.

SOLA, M. C., OLIVEIRA, A. P., FEISTEL, J. C. and REZENDE, C. S. M. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade.** *Enciclopédia biosfera.* Goiânia. 8 (14): 1398-1418. 2012.

SOUSA, B. R., SILVA, U. N. M., S, L. R., SANTOS, G. M. R., SILVA, A. S. **Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas.** *Journal of Medicine and Health Promotion.* v. 2. n.3. p:827-842. 2017.

SOW D., B. FALL, M. NDIAYE, B.S. BA, K. SYLLA, R. TINE, A.C. LÔ, A. ABIOLA, B. WADE, T. DIENG AND OTHERS. **Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting.** *Mycopathologia* 180: 173–179. 2015.

STEFANIUK, E., BARANIAK, A., FORTUNA, M. and HRYNIEWICZ, W. **Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods – API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification.** *Polish Journal of Microbiology.* Vol. 65, No 1, 111–114. 2016.

STEVENSON, L. G., DRAKE, S. K., SHEA, Y. R., ZELAZNY, A. M. and MURRAY, P. R. **Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Tim of Flight Mass Spectrometry for identification of clinically important yeast species.** *J.Clin.Microbiol.*48 (10): 3482-3486. 2010.

SULLIVAN, D.J. ***Candida dubliniensis*: Un update.** *Rev. Iberoam.Micol.* 16:72-76. 1999.

SULLIVAN, D. J., MORAN, G., DONNELLY, S., GEE, S., PINJON, E., MCCARTAN, B., SHANLEY, D. B. & COLEMAN, D. C. ***Candida dubliniensis*: an apdate.** *Rev Iberoam Micol.*16: 72-76. 1999.

SULLIVAN, D. J., MORAN, G. P., PINJON, E., AL-MOSAID, A., STOKES, C., VAUGHAN, C. & COLEMAN, D. C. **Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*.** *FEMS Yeast Res* 4: 369-376. 2004.

THOMPSON, D. S., CARLISLE, P. L., & KADOSH, D. **Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species.** *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1173–1182. doi:10.1128/EC.05085-11. 2011

TIRASCHI, I. N., CARNOVALE, S., BENETUCCI, A., FERNÁNDEZ, N., KURLAT, I., FOCCOLI, M. & LASALA, M. B. **Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatología.** *Rev Iberoam Micol.* 24: 263-267. 2007.

TRAN, A., ALBY, K., KERR, A., JONES, M., GILLIGANA. P. H. **Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-**

Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 53:2473–2479. doi:10.1128/JCM.00833-15. 2015.

TUMBARELLO, M., POSTERARO, B., TRECARICHI, E. M., FIORI, B., ROSSI, M., PORTA, R., DONATI, K. G., LA SORDA, M., SPANU, T., FADDA, G., CAUDA, R. AND SANGUINETTI, M. **Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia.** *J. Clin. Microbiol.* Vol. 45, No. 6. p. 1843–1850. 2007.

TURDA, C. GEOTRICHUM INFECTION, CLINICAL SIGNIFICANCE. **Analele Universității din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară** Vol. XII/B, 2013

URDANETTA, M. S. & LACAZ, C. S. **Preservation of fungi in distilled water. Preliminary results.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 7: 24-26. 1965.

VALENZA, G.; STRASEN, J. R.; SCHAFFER, F.; FROSCH, M.; KURZAI, O.; ABELE-HORN, M. **Evaluation of new colorimetric Vitek 2 yeast identification card by use of different source media.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 46, n. 11, p. 3784-3787, 2008.

VANDEPUTTE P, LARCHER G, BERGÈS T, RENIER G, CHABASSE D, BOUCHARA J-P. **Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of candida tropicalis.** *Antimicrob agentes ch.* 49(11): 4608-4615. 2005.

VIEIRA, F. M. P M. ***Candida não-albicans* como patógenos emergentes.** Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. *Mestrado em Ciências Farmacêuticas.* 2016.

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 Sensititre YeastOne antifungal testing.** *Med Mycol.* 49(1):107-10. doi: 10.3109/13693786.2010.494255. 2011

VIGOURUJOUX, S. MORIN, O., MOREAU, P., HAROUSSEAU, J. L., MILPIED, N. **Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years experience in a single center.** *Haematologica*, v. 91, n 5, p. 717-718. 2006.

WEBER, K., SOHR, R., SCHULZ, B., FLEISCHHACKER, M., RUHNKE, M. **Secretion of E, E-Farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species.** *Antimicrob Agents Ch.* 52 (5): 1859-1861. 2008.

WICKERHAM, L.J. & D. A. BURTON. **Carbohydrate assimilation tests for the classification of yeasts.** *J. Bacteriol.* 56:363-371. 1948.

WIRTH, F. AND GOLDANI, L. Z. **Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen.** *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* Volume Article ID 465717, 7 pages. doi: 10.1155/2012/465717. 2012.

ZAUGG C, ZEPELIN MB-V, REICHARD U, SANGLARD D, MONOD M. **Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis***. *Infect Immun.* 69(1): 405-412. 2001.

ZHANG, B. & IZADJOO, M. **Differential Diagnosis of *Candida* sp with Real Time Polymerase Chain Reaction and Melting Temperatura Analyses (RTPCR-MTA)**. *Military Medicine*, n. 6, v. 180. P. 652-659. 2015.

APÊNDICE A – Banco de Culturas de Leveduras - IBEx**Banco de Culturas de Leveduras - IBEx**

Gênero	Espécie	Número de isolados
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	24
	<i>dublinskiensis</i>	1
	<i>glabrata</i>	19
	<i>guilliermondii</i>	1
	<i>haemulonii</i>	2
	<i>krusei</i>	4
	<i>metapsilosis</i>	2
	<i>orthopsilosis</i>	2
	<i>parapsilosis</i>	19
	<i>pelliculosa</i>	1
	<i>tropicalis</i>	31
	<i>utilis</i>	1
<i>Rodhotorulla</i>	<i>mucilaginoso</i>	2
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	3
Total		112

APÊNDICE B – Compêndio de métodos e de boas práticas em coleção de cultura de leveduras do IBEx



**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
CML 1a RM
INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO
*IBEx (Lab Microscopia Clín e Bacteriol/1984)***

**COMPÊNDIO DE MÉTODOS E DE BOAS PRÁTICAS EM
COLEÇÃO DE CULTURA DE LEVEDURAS DO INSTITUTO
DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO - IBEX**

Instituto de Biologia do Exército

2019

I. MEMORIAL DA INSTITUIÇÃO.

Ao final do século XIX, **Ismael da Rocha** e **Oswaldo Cruz** concretizaram o sonho de ver instalado no Brasil um laboratório de pesquisa aos moldes do Instituto Pasteur, da França. Em 19 de dezembro de 1894, foi assinado pelo Presidente Prudente de Moraes o decreto de nº 1.915 criando o Laboratório Militar de Microscopia Clínica e Bacteriologia, aos moldes do Instituto francês. As atividades iniciaram em 2 de julho de 1896, na rua, atualmente conhecida como Senador Furtado, no bairro do Maracanã, na cidade do Rio de Janeiro. Na transição do ano de 1898 para 1899, suas instalações foram transferidas para a Rua General Canabarro 40, também no bairro do Maracanã, permanecendo nesse local até 1907. A partir dessa data, o laboratório passou a funcionar no Pavilhão Rodrigues Alves do Hospital Central do Exército (HCE), na rua Francisco Manuel, no bairro de Triagem. Posteriormente, teve nova nomenclatura: Laboratório Militar de Bacteriologia. Assim permaneceu até o período provisório do governo de Getúlio Vargas, que em 13 de janeiro de 1932, por meio do Decreto de nº 20.943, deu-lhe nova denominação: Instituto Militar de Biologia, momento no qual adquiriu, em definitivo, seu atual endereço no bairro de Triagem, no Rio de Janeiro. Por fim, em 12 de abril de 1943, recebeu a denominação Instituto de Biologia do Exército.

Hoje, ocupa três regiões distintas, a sede, em Triagem, a sua área de produção veterinária, no Campo de Instrução de Gericinó (CIG), e parte do prédio anexo do Hospital Geral do Rio de Janeiro (HGeRJ), com o posto avançado de captação de sangue e coleta de sangue para exames laboratoriais.

A estrutura organizacional do IBEX é composta pelas Divisões Técnica, Veterinária, Banco de Sangue e Soros e Vacinas, Ensino e Pesquisa, Administrativa, além das assessorias de Gestão da Qualidade e de Vigilância em Saúde.

A Divisão de Ensino e Pesquisa (DEP) do IBEX, desde a origem do Instituto até os dias atuais, vem se sobressaindo no campo de formação técnica e investigação científica na área da Saúde. No ensino, contribui realizando cooperações de instrução com diversos cursos militares operacionais, além de abrigar 3 cursos do Programa de Capacitação de Militares de Saúde (Procap/SAU) da Diretoria de Saúde, promovendo a atualização dos militares desse Serviço. Na pesquisa, o resultado de seus experimentos e produção científica têm sido divulgados em publicações internacionais

em áreas como Microbiologia, Defesa Biológica, Genética Humana e Genética Forense, possibilitando a criação do Mestrado em Defesa Biológica, reconhecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Somado a isso, o IBEX adequou e modernizou seus laboratórios de pesquisa, criando o Centro de Estudos em Biodefesa, que dispõe de um laboratório com nível de contenção biológica superior e que gerencia o laboratório de Biossegurança NB-3, componente importante do Sistema de Defesa, Química, Biológica, Radiológica e Nuclear do Exército (SisDQBRNEx). Para o armazenamento de isolados de leveduras de importância clínica, em 2019, o IBEX criou sua Coleção de Cultura de Leveduras (anexo A).

Tendo em vista a necessidade de organização para atender às demandas da defesa biológica, o IBEX vem buscando sua capacitação, adequação e estruturação para dominar a tecnologia de identificação e manejo dos microrganismos envolvidos em bioterrorismo, tanto no que tange às metodologias quanto no que se refere a equipamentos e estrutura física. Nesse contexto, o Exército Brasileiro tem feito aquisições de equipamentos e executado projetos como a construção de um Laboratório de Defesa Biológica (LDB), com nível 3 de Biossegurança (NB3), no IBEX, como mencionado anteriormente, para a caracterização de agentes envolvidos em guerra biológica e bioterrorismo. O LDB deverá servir de base técnico-científica em âmbito nacional para estudos e apoio a outras instituições (públicas e privadas) comprometidas, direta ou indiretamente, com a segurança nacional e desenvolvimento de pesquisas.

O IBEX mantém hoje estreito relacionamento com instituições renomadas de pesquisas no cenário nacional, a partir do convênio com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), através do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores (LAFICAVE), dos Programas de Incentivo à Pesquisa em Defesa Nacional (Pró-Defesa III) com projetos entre o IBEX e as Universidades Federal do Rio de Janeiro e a Universidade do Estado do Rio de Janeiro e das parcerias com a Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, entre outros. O IBEX faz parte, em conjunto com a Fiocruz, UFRJ, UENF e outras Instituições de pesquisa, da Rede de Monitoramento de Dengue, Zika e Chikungunya no Estado do Rio de Janeiro. Além dessas parcerias, o IBEX apoia tecnicamente o curso de Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense (MPSMLTF) da UERJ.

II. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a incidência de infecções sistêmicas apresentou aumento significativo, devido a fatores como Aids, transplantes de órgãos e medula óssea, uso de citostáticos e quimioterápicos, corticoterapia, antibioticoterapia, técnicas cirúrgicas invasivas e acesso vascular. Dentre os agentes fúngicos, *Candida* spp é, indubitavelmente, o microrganismo mais envolvido em casos de infecção, em pacientes imunocomprometidos. Além disso, essas leveduras têm se mostrado mais resistentes às drogas antifúngicas de uso clínico, principalmente quando espécies de *Candida* não-*albicans* estão presentes. Importa mencionar que, de fato, qualquer organismo fúngico que apresente algum fator de patogenicidade, poderá causar, potencialmente, infecção, a princípio, em indivíduos que pertençam a populações vulneráveis (DORNELAS-RIBEIRO et al., 2012; NEUFELD et al., 2015).

As infecções fúngicas são a maior causa de morbi-mortalidade, principalmente, em pacientes com malignidades hematológicas, sendo candidíases e aspergiloses os processos mais prevalentes (cerca de 90%)(RUHNKE & MASCHMEYER, 2002). Há consenso na literatura sobre o aumento na incidência das infecções fúngicas invasivas e alteração no espectro dos agentes etiológicos (NEUFELD, 2009).

III. CANDIDÍASE SISTÊMICA

Candidíases invasivas continuam liderando as causas de intercorrências fúngicas em pacientes imunocomprometidos, em Unidades de Terapia Intensiva. A instituição de rápida e adequada terapia tem mostrado uma redução significativa nas taxas de morbidade e mortalidade e têm permitido a redução geral de custos hospitalares. Embora *Candida albicans* permaneça sendo o principal agente responsável por infecções relacionadas à assistência a saúde, espécies de *Candida* não-*albicans*, como complexo *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, complexo *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lusitanae* e *C. krusei* têm emergido como significantes patógenos oportunistas. Dada a inerente variabilidade nos perfis de susceptibilidade antifúngica de diferentes espécies de *Candida* e a emergência de infecções por mais de uma espécie, a identificação correta a nível de espécie é

necessária para a melhor decisão terapêutica do clínico e conhecimento do comportamento epidemiológico (CHAO et al., 2014).

A candidíase sistêmica é a uma das formas micóticas mais polimórficas e, em muitos casos, se configura como um achado terminal. Comumente, apresenta-se com sinais e sintomas inespecíficos, provas sorológicas inconclusivas e com a necessidade de equipamentos específicos para o isolamento e identificação do microrganismo (LONDERO et al., 2004; FIGUERAS et al., 2011). Além disso, estão presentes altos percentuais de mortalidade e o custo de tratamento com frequência é elevado (COLOMBO et al., 2006).

Vários fatores são atribuídos ao risco de desenvolvimento de candidíase invasiva. A candidemia é observada, particularmente, entre pacientes hospitalizados por longos períodos de tempo, tendo como fatores prédisponentes para fungemias, tratamentos com antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, transplantes, uso de cateteres, nutrição parenteral, procedimentos invasivos múltiplos, neutropenia, pacientes imunossuprimidos e formação de biofilmes (TUMBARELLO et al., 2007; VIGOURUX et al., 2006).

Candida albicans ainda é considerada a espécie mais comum em candidemias, porém, o aumento das taxas de candidemia por *Candida tropicalis*, complexo *Candida parapsilosis*, complexo *Candida glabrata* e *Candida krusei* tem sido relatado em todo mundo. A razão para emergência de espécies não-*albicans* não está ainda completamente elucidada, mas algumas condições médicas podem produzir impacto no risco de desenvolvimento de candidemia por essas espécies. O complexo *Candida parapsilosis* é responsável por candidemias a partir do uso de cateteres e nutrição parenteral, *Candida tropicalis* está mais associada a neoplasias e neutropenias, *Candida krusei* e complexo *Candida glabrata* estão mais associadas a candidemias de correntes de prévia exposição a azólicos (COLOMBO et al., 2006).

Diversas espécies de *Candida* isoladas em hemocultura demonstram sensibilidade à anfotericina B e ao fluconazol, porém, existem algumas exceções, como os isolados de *Candida krusei*, que são intrinsicamente resistentes ao fluconazol, e algumas do complexo *Candida glabrata* que possuem sensibilidade reduzida a azólicos. A correta identificação da espécie e o teste de susceptibilidade são dados fundamentais para o adequado manejo das candidemias (SANDVEN, 2000).

IV. IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Recentemente, as tecnologias para a identificação de leveduras têm avançado significativamente, com métodos que incluem desde ensaios bioquímicos manuais e automatizados até ensaios baseados em análises de ácidos nucleicos e proteômica. Com o uso de métodos micológicos convencionais (produção de tubo germinativo, produção de clamidósporos e meio cromogênico), a identificação de espécie de leveduras pode requerer de alguns dias à várias semanas. Alguns desses métodos, inclusive, não apresentam eficácia na identificação de espécies menos comuns. Embora as técnicas moleculares tenham aumentado consideravelmente a capacidade de identificação de leveduras, muitas delas estão associadas com custos aumentados, complexidade de execução e necessidade de um conhecimento técnico específico. Diante desse quadro, a Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) se apresenta como uma alternativa promissora para a identificação rotineira de espécies de leveduras clínicas (CHAO et al., 2014).

4.1. Produção de Tubo Germinativo

O complexo *Candida albicans* tem a capacidade de produzir tubos germinativos na presença de soro (humano) ou meio hiperproteico, incubados à temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), por um período de 2-3 horas (DORNELAS-RIBEIRO, 2011). O teste é simples, eficiente e econômico para triagem e identificação do complexo *C. albicans* (apêndice 4). Aproximadamente, 95,97% dessas leveduras produzem tubo germinativo, contudo *Candida tropicalis* também é capaz de induzir crescimento de hifas nas mesmas condições que o complexo *Candida albicans* (CAMPANHA et al., 2005).

Técnica:

- Inocular fragmentos de culturas de leveduras (após crescimento em ágar batata dextrosado - BDA, por 24-48 h) em 0,4 mL de soro humano, utilizando agulha ou alça bacteriológica;
- Incubar os tubos por um período de 2-3 h, a 35° C ± 2 ;

- Colocar uma alíquota da suspensão entre lâmina e lamínula e examinar em microscópio com objetiva de 40x, procurando observar a produção de tubos germinativos.

4.2. Produção de Clamidósporos

Sob condições não ótimas de crescimento, o complexo *Candida albicans* pode desencadear a formação de clamidósporos, que são estruturas arredondadas e refringentes com uma parede celular espessa (LEE et al., 1999).

Diversos meios de cultura são propostos para a indução de clamidósporos, sendo que os mais comuns possuem um baixo valor nutricional e altas taxas de carbono/nitrogênio. Para que haja a diminuição da tensão superficial, agentes como o Tween 80 são adicionados. O meio de ágar milho é o meio de eleição para a produção de clamidósporos (DORNELAS-RIBEIRO, 2011) (apêndice 5).

Técnica:

- Semear as colônias de leveduras através de estrias paralelas em ágar milho com Tween-80 (1%);
- Cobrir a superfície do meio com lamínulas estéreis, ficando estas sobre as estrias;
- Incubar à temperatura de 30° C, por 48-96 h;
- Retirar as lamínulas, montá-las em lâminas e examinar em microscópio com objetiva de 40x, procurando observar a formação de clamidósporos.

4.3. Identificação Cromogênica

Essa identificação é procedida em um meio de cultura diferencial, que facilita o isolamento e a identificação presuntiva de algumas espécies de leveduras clinicamente importantes, a partir da coloração de suas colônias (ODDS & BERNAERTS, 1994).

Substratos cromogênicos são adicionados como constituintes no meio, o que, com o desenvolvimento das leveduras, determina o surgimento de colônias de cores

características para cada espécie (Fig. 1). A utilidade do meio cromogênico, contudo, é limitada, pois esses meios são capazes de discriminar um número restrito de leveduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*) e também porque múltiplas espécies de leveduras podem desenvolver cores semelhantes, afetando, assim, a especificidade (BUCHAN & LEDEBOER, 2013) (apêndice 6).

O meio permite a identificação do complexo *Candida albicans* pela coloração verde produzida, *Candida tropicalis* pela coloração azul petróleo e *Candida krusei* pela coloração rosa e textura seca (RIBEIRO et al., 2009). Outras espécies de *Candida* desenvolvem coloração entre branca e malva.

Técnica:

- Semear os isolados de leveduras em meio cromogênico;
- Incubar a 35°C ±2, por 24 h;
- Observar a cor exibida pelas colônias e identificar segundo orientações do fabricante.



Figura 1. Meio cromogênico CHROMágar® - *Candida*

4.4. Análise por Bioquímica Automatizada: Vitek 2

O Vitek 2 é um sistema automatizado correntemente utilizado em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica. O equipamento realiza automaticamente os processos necessários para a identificação bioquímica de microrganismos determinação da susceptibilidade a antimicrobianos, utilizando um inóculo primário isolado de culturas positivas. Embora os métodos de identificação clássicos, manuais e morfológicos ainda sejam considerados padrão ouro, esses métodos são

lentos, laboriosos e são propensos a interpretações subjetivas. Por outro lado, o sistema Vitek 2 reduz o tempo necessário para identificação e permite a padronização dos resultados inter e intra laboratórios, armazenamento de resultados, emissão de relatórios epidemiológicos rápidos e testes simultâneos de susceptibilidade a antimicrobianos (MONTEIRO et al., 2016).

Esse sistema utiliza cartões com substratos bioquímicos liofilizados para a identificação taxonômica, a partir da assimilação de carboidratos e nitratos, e também permite a determinação do perfil de susceptibilidade de leveduras (ARAÚJO et al., 2005).

O equipamento apresenta um banco de dados que tem sido progressivamente atualizado, para abranger leveduras comuns e infrequentes de espécies clínicas (POSTERARO et al., 2015).

Os procedimentos relacionados à operação do equipamento e identificação de leveduras na Coleção de Cultura estão apresentados no apêndice 7.

Técnica:

- Utilizar cartões para identificação de leveduras (YST);
- Inocular os cartões segundo instruções do fabricante;
- Inserir no módulo leitor para leitura automatizada dos substratos;
- Considerar as identificações com percentuais de probabilidade \geq a 85%.
Realizar testes complementares, quando necessário.

4.5. Análise Proteômica: Espectrometria de Massas por Tempo De Voo - [Maldi Tof Ms]

A Espectrometria de Massas em sua configuração MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) é um método analítico desenvolvido em meados de 1988, que evoluiu rapidamente para espectros de “impressão digital” para vários microrganismos, incluindo bactérias e fungos, através da análise de perfis de proteínas. Bancos de dados foram, posteriormente, desenvolvidos e adotados em laboratórios de microbiologia clínica. Esses bancos de dados empregam o conceito de reconhecimento de padrões ou de “impressão

digital”, onde o espectro de massa obtido de uma bactéria ou levedura é comparado com espectros existentes, para encontrar a correspondência mais próxima (KASSIM et al., 2017).

Nesse sistema, os agentes microbianos são colocados em uma placa com uma matriz constituída de ácido α -Ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA). A placa é irradiada com um laser que vaporiza a amostra (dessorção), ionizando as moléculas, que serão conduzidas por uma diferença de potencial elétrico, a uma região livre de campos elétricos, no tubo de voo. Nessa região, ocorre a distinção dos íons de acordo com as suas velocidades, que são inversamente proporcionais às respectivas relações massa/carga. Os íons são detectados, após sua chegada no final do tubo, com registro do seu tempo de voo, associando-se esse parâmetro indiretamente com a massa molecular da proteína (KARAS & HILLENKAMP, 1988; GROSS, 2006; DENIS et al., 2017).

A abordagem do biomarcador para a identificação de microrganismos emprega proteínas específicas encontradas dentro da célula. Proteínas ribossomais tornaram-se um dos biomarcadores ideais, porque são abundantes, altamente conservadas e codificadas por genes cromossômicos. Essas proteínas têm massas moleculares que se enquadram de 4 a 30 KDa (KASSIM et al., 2017).

Um obstáculo para a identificação de isolados de leveduras, usando MALDI-TOF MS, é a presença de uma robusta parede celular, que inibe a análise direta de leveduras. Pesquisadores têm superado essa dificuldade usando uma variedade de abordagens de pré-processamentos destinados a liberar as proteínas intracelulares, que são a base para a identificação por MALDI-TOF MS (BUCHAN & LEDEBOER, 2013).

O MALDI-TOF MS se apresenta como uma alternativa real para a identificação rotineira de espécies de leveduras. É um sistema que providencia a correta identificação de espécies, levando apenas alguns minutos para executar todo o processo, sendo relativamente barato para conduzir a identificação específica (CHAO et al., 2014).

Os procedimentos relacionados à operação do equipamento e identificação de leveduras na Coleção de Cultura estão apresentados nos apêndices 8 e 9.

Técnica:

- Aplicar as colônias de leveduras isoladas diretamente na placa do equipamento;
- Tratar com 1 μL de ácido fórmico a 85%. Após a secagem em temperatura ambiente, aplicar 1 μL da matriz HCCA e submeter à secagem também à temperatura ambiente (BULANE & HOOSEN, 2017; LEE et al., 2017);
- Inserir a placa, posteriormente, no equipamento que irá irradiar com laser, que vaporizará a amostra, ionizando as moléculas, que serão, então, aspiradas e elevadas ao detector (Fig. 2);
- Os dados obtidos através do perfil do espectro serão comparados com o banco de dados do equipamento, utilizando o *software* do fabricante para a identificação dos microrganismos;
- Analisar as amostras em duplicata no Microflex LT MALDI-TOF MS da Bruker Daltonik, Biotyper (Fremont, CA), no modo linear positivo, em uma frequência 60 Hz, com um intervalo de massa entre 2 e 20 KDa (Fig. 3);
- As informações obtidas serão analisadas automaticamente, usando o *software* Bruker Biotyper 3.1. Cada espectro será obtido a partir de 240 tiros, em passos de 40 tiros de diferentes posições da placa alvo, e o log dos *scores* serão calculados;
- A identificação do ponto de corte dos *scores* serão interpretadas do seguinte modo: *scores* $\geq 1,7$ indicarão identificação confiável a nível de espécie, enquanto que *scores* $< 1,7$ indicarão identificação não confiável, requerendo a repetição da análise (LEE et al., 2017).

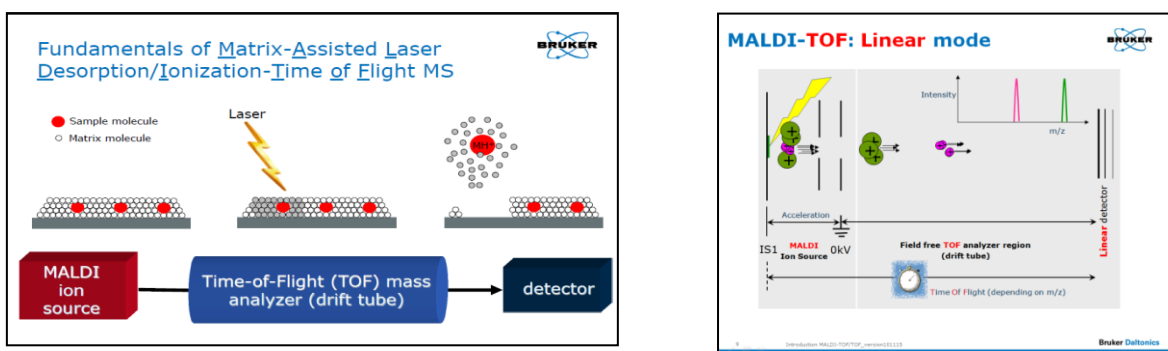


Fig. 2. Fundamento da metodologia de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo - Microflex LT Maldi-Tof MS da Bruker Daltonik, Biotyper (Fremont, CA). Fonte: Manual da Bruker.

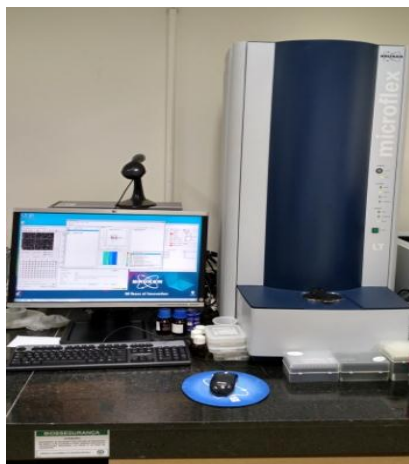


Fig. 3. Equipamento de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo, Microflex LT Maldi-Tof MS da Bruker Daltonik, Biotyper (Fremont, CA) - IBEX. Fonte: IBEX.

4.6. Análise Molecular: PCR em Tempo Real

O PCR em Tempo Real combina a química com uma sonda fluorescente, para detecção do produto amplificado, na mesma reação. A avaliação da fluorescência é obtida pela plataforma do equipamento em cada ciclo de amplificação. Em geral, a reação ocorre em menos de uma hora, sendo consideravelmente mais rápida que as técnicas de PCR convencionais (ESPY et al., 2006).

Este tipo de detecção do amplicon constitui um avanço significativo na química dos ácidos nucleicos, por ser mais rápido que os métodos tradicionais de detecção de amplicons. Além disso, há uma redução significativa na chance de contaminação do amplicon no laboratório, pois não há abertura do tubo de reação para a análise do amplicon. Existem diferentes plataformas disponíveis para a amplificação de ácidos nucleicos em tempo real (FOY & PARKES, 2001).

Várias são as moléculas fluorogênicas que podem ser usadas para a detecção dos ácidos nucleicos amplificados, numa reação homogênea ou em tempo real. Essas moléculas podem ser inespecíficas e detectar qualquer tipo de ácido nucleico amplificado (SYBR GREEN) ou específicas, o que significa que elas são oligonucleotídeos e se hibridizam a uma sequência específica, presente no amplicon (sondas) (KONEMAN et al., 2008).

O SYBR Green, é um corante que se liga ao sulco menor do DNA de dupla hélice. Emite muito pouca fluorescência, quando no estado não ligado, mas gera uma fluorescência consideravelmente maior quando ligado ao DNA, essa propriedade o torna útil para a determinação da presença de um produto de DNA amplificado (KONEMAN et al., 2008).

Os procedimentos relacionados à operação do equipamento e identificação de leveduras na Coleção de Cultura estão apresentados nos apêndices 10 e 11.

Técnica:

- Semear todas as amostras em BDA e incubar a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 18-24 h.
- Para extração do DNA, preparar suspensões em 20 μL de solução de lise (SDS 10% 125 μL ; NaOH 0,05N 100 μL ; H₂O qsp 5000 μL). Essas suspensões deverão ser aquecidas a 94°C , por 5 min e, posteriormente, adicionadas de 180 μL de água Mili-Q estéril e centrifugadas a 16.000 g, por 5 min. Uma alíquota de 3 μL do DNA extraído em suspensão deverá ser adicionada juntamente com 1 μL (10pmol) de cada um dos dois iniciadores específicos e 5 μL de PCR Luminaris Hi-Green qPCR Master Mix (ThermoScientific, MA, USA), em um volume total de 10 μL para a reação de PCR em Tempo Real. O desenho dos *Primers* para o PCR é sumarizado na tabela 1.
- Toda a mistura deverá ser submetida a 1 ciclo de 95°C , por 5 min, para a desnaturação do DNA, 30 ciclos de 95°C , por 30s, 60°C , por 30s, e 72°C , por 30s, 1 ciclo de 72°C , por 7 min e, posteriormente, manter a 4°C em termociclador em tempo real (*Step One Plus, Applied Biosystems-Thermo Fisher*).

Tabela 1 - Sequência dos *Primers*

Fungo	Orientação	Sequências	Referência
<i>C. albicans</i>	FW	ATG TGG CAC GGC TTC TGC TG	Ogata 2015
	RV	TAG GCT GGC AGT ATC GTC AGA GG	Ogata 2015
<i>C. glabrata</i>	FW	TTC GTG TAC TGG AAT GCA CC	Ogata 2015
	RV	ATA GAA CCA AAC GTC CTA TTC C	Ogata 2015
<i>C. krusei</i>	FW	CTG CAG GAG AAG GGG TTC TGG AAC G	Ogata 2015
	RV	CGG TGT TGC GCC GTT CTG C	Ogata 2015
<i>C. tropicalis</i>	FW	ATT TTG TAT GTT ACT TCT TCG	Ogata 2015
	RV	TAG GCT GGC AGT ATC GAC GAA GG	Ogata 2015
<i>C. parapsilosis</i>	FW	ATT TTG TAT GTT ACT CTC TCG	Ogata 2015
	RV	TGC CAA CAT CCT AGG CCG AAG C	Ogata 2015
<i>C. guilliermondii</i>	FW	GTC AAA CTT GGT CAT TA	Neufeld 2009
	RV	TTG GCC TAG AGA TAG GTT GG	Neufeld 2009

OBS: Todos os procedimentos técnicos serão realizados em Laboratório com Nível de Biossegurança 2 (NB2), fazendo uso de Equipamentos de Proteção Individual e Coletiva (EPI e EPC).

V. COLEÇÃO DE CULTURA DE MICRORGANISMOS

Representando desde pequenos centros privados a grandes centros de serviços e possuindo diferentes objetivos, políticas e acervos, as coleções de cultura são importantes instituições de preservação de recursos biológicos. Essas coleções estão frequentemente associadas às atividades de uma organização parental, como instituições acadêmicas ou de pesquisa científica, e mantêm organismos que podem ser utilizados de formas distintas (CONSENSO, 2006)

Coleções de cultura de microrganismos são centros de conservação da biodiversidade, sendo encarregadas de coletar e disponibilizar organismos relevantes para a pesquisa científica, bem como estão ligadas ao desenvolvimento tecnológico e ao ensino. A preservação e a manutenção de culturas deve ser realizadas de forma a garantir a sobrevivência do microrganismo e a estabilidade das propriedades morfológicas e fisiológicas, características genéticas e a pureza dos isolados, durante períodos prolongados (CAVALCANTI, 2010).

Existem diversos tipos de coleções microbiológicas *ex-situ*, que são classificadas de acordo com o atendimento prestado. As coleções de trabalho são aquelas mantidas nos laboratórios e utilizadas em linhas específicas de pesquisa (podendo ser extintas quando os pesquisadores mudam de linha); coleção institucional que abastece diversas linhas de pesquisa de uma única instituição; coleções de serviço que possuem acervo abrangente, curadoria profissional e têm papel fundamental na aquisição, caracterização taxonômica e tecnológica, manutenção e distribuição de microrganismos para toda a comunidade, para fins industriais ou de pesquisa (ANDRADE et al., 2008).

Subcultivos periódicos e sucessivos de isolados fúngicos podem acarretar o aparecimento de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além do elevado risco de contaminação. Desse modo, diversas coleções de cultura têm utilizado metodologias de preservação de longo prazo, mas não há um método universal para todos os tipos de fungos (BUTTERFIELD et al., 1974; MCGINNIS, et al., 1974; QIANGQIANG et al., 1998; CAVALCANTE et al., 2007).

Os procedimentos relacionados ao fluxo de amostras fúngicas na Coleção de Cultura estão apresentados nos apêndices 1, 2 e 3.

VI. MÉTODO DE PRESERVAÇÃO: CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DE LEVEDURAS EM ÁGUA DESTILADA ESTÉRIL

A importância da manutenção e preservação de microrganismos, caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização desses recursos a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (GUIMARÃES, 2011). Dessa forma, definir a técnica de preservação de culturas mais adequada e dispor de procedimentos simples e eficientes, reveste-se de grande valia aos laboratórios de microbiologia (SOLA et al., 2012).

Diversos métodos vêm sendo empregados para preservação de fungos, porém, em virtude da diversidade biológica desses microrganismos, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma única ou generalizada (DELLARETTI, 2014).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada nas características do agente em estudo, assim como nas vantagens e desvantagens de

cada técnica (SOLA et al., 2012; DELLARETTI, 2014). O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e, principalmente, proporcionar estabilidade genética ao microrganismo isolado, pelo maior tempo possível, evitando, assim, a formação excessiva de mutações que alterem suas características (ABREU & TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Diferentes métodos têm sido propostos para a manutenção de fungos em coleções cultura, como preservação em óleo mineral estéril, congelamento, congelamento em temperatura ultra-baixa, água destilada estéril (MÉTODO DE CASTELLANI) e liofilização (McGINNIS, PADHYE & AJELLO, 1974). O método de Castellani é um método simples e economicamente viável (RODRIGUES, LIRIO & LACAZ, 1992; FIGUEIREDO, 2001; CANHOS, 2003; NAKASONE et al., 2004).

O método de Castellani (Fig. 4) consiste no armazenamento de microrganismos em água esterilizada ou solução salina, sendo indicado na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (PIMENTEL & FIGUEIREDO, 1989; COSTA & FERREIRA, 1991; NEULFELD & OLIVEIRA, 2008). O método se baseia na transferência de culturas para frascos contendo uma solução de água destilada esterilizada, com posterior armazenamento sob temperatura ambiente. As suspensões de células deverão ser bem concentradas, a partir de um crescimento em meio sólido, ou poderão ser introduzidos blocos de ágar contendo os microrganismos. Um pequeno espaço físico deverá ser disponibilizado para o acondicionamento dos frascos (SOLA et al., 2012).

Segundo McGINNIS, PADHYE & AJELLO, 1974, o método de manutenção de cultura de fungos em água destilada esterilizada, por longos períodos de tempo, é simples, econômico e confiável. O método oferece muitas vantagens para laboratórios que mantêm pequenas coleções de cultura para referência ou propósitos de ensino. O espaço de armazenamento necessário para os frascos é mínimo e como os frascos são armazenados a temperatura ambiente, a refrigeração não se faz necessária. A técnica de revitalização é menos laboriosa que as culturas preservadas em óleo mineral estéril.

Os procedimentos relacionados a preservação de leveduras através do Método de Castellani estão apresentados no apêndice 12.

Técnica:

- Inocular fragmentos das colônias, assim como fragmentos do meio de cultura em tubos estéreis, contendo 5 mL de água destilada esterilizada;
- Manter os tubos à temperatura ambiente e sob refrigeração entre 2 a 8°C.

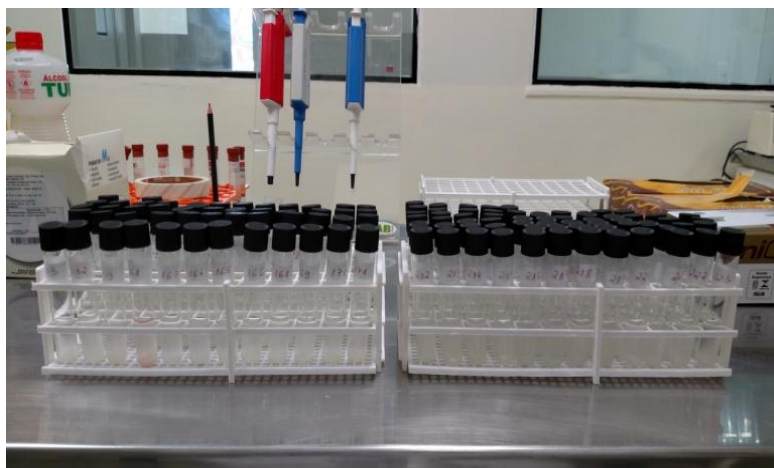


Figura 4. Cepas de leveduras mantidas pelo método de Castellani. Fonte: IBEX

VII. BOAS PRÁTICAS EM COLEÇÃO DE CULTURA DE LEVEDURAS DO IBEX

Essas práticas constituem um conjunto de normas, procedimentos e atitudes de segurança, que visam a minimização dos acidentes, que envolvem as atividades laboratoriais dentro da Coleção de Cultura do IBEX (MAESTROENI, 2005; ARAÚJO et al., 2009) (apêndice 13).

7.1. Equipamentos de Segurança Laboratorial:

São considerados barreiras primárias de contenção, que visam a proteção dos profissionais (HIRATA, 2012).

- Equipamentos de Proteção Individual (EPI): Dispositivos destinados a proteger a saúde e a integridade física do profissional (Portaria 3214-NR6 / 08/06/1978), representado por:

- ✓ Jaleco de manga longa;
 - ✓ Luvas descartáveis;
 - ✓ Luva térmica;
 - ✓ Óculos de proteção;
 - ✓ Máscara descartável;
 - ✓ Calçado fechado;
 - ✓ Propé.
- Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC): permitem a execução de operações seguras para o operador e demais profissionais do laboratório (HIRATA, 2012):
 - ✓ Cabine de segurança biológica classe II B2;
 - ✓ Cabine de segurança biológica classe III - "Glove Box";
 - ✓ Autoclave;
 - ✓ Chuveiro e lavaolhos;
 - ✓ Pipetador automático;
 - ✓ Extintores de incêndio;
 - ✓ Caixa coletora de pérfuro cortante;
 - ✓ Sistema de controle de acesso com identificação biométrica.

7.2. Biossegurança na Coleção de Cultura de Leveduras do IBEX

- Conceitos:
 - ✓ *Bioconfiança (biosurety)*: É o conjunto de sistemas e procedimentos para salvaguardar os agentes biológicos e toxinas contra furto, roubo, perda, desvio, acesso ou uso não autorizado e garantir que todas essas ações sejam conduzidas de maneira segura e confiável, englobando nesse conceito a biossegurança, a bioproteção e os controles de pessoal e material (PORTARIA NORMATIVA Nº 585/MD, DE 7 DE MARÇO DE 2013);
 - ✓ *Biossegurança (biosafety)*: É o conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam,

de forma não intencional, comprometer a saúde humana, animal, vegetal e o ambiente (PORTARIA NORMATIVA Nº 585/MD, DE 7 DE MARÇO DE 2013);

- ✓ *Bioproteção (biossecurity)*: É o conjunto de ações que visam a minimizar o risco do uso indevido, roubo e/ou a liberação intencional de material com potencial risco à saúde humana, animal, vegetal e ambiental (PORTARIA NORMATIVA Nº 585/MD, DE 7 DE MARÇO DE 2013).

- Principais normas de biossegurança:

- ✓ Utilização adequada de EPIs e EPCs;
- ✓ Lavagens das mãos antes e após os procedimentos técnicos;
- ✓ Descontaminação das bancadas antes e após as análises;
- ✓ Manusear, transportar e armazenar materiais biológicos e microrganismos de forma segura;
- ✓ Acondicionar os resíduos biológicos de forma adequada (saco branco leitoso);
- ✓ Descontaminar por autoclavação os resíduos biológicos e demais materiais contaminados;
- ✓ Obedecer a sinalização de risco do laboratório;
- ✓ Seguir as normas institucionais de treinamentos e segurança laboratorial.

VIII. BIBLIOGRAFIA

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

ANDRADE, T. S., BASTOS, L. T., SCOLA, M. C. G & FELIPPE, J. M. M. **Seção de coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz - 68 anos de história dedicados à saúde pública.** *Bepa*, 5 (59): 10-15. 2008.

C. R. ARAUJO, K. C. MIRANDA, X. S. PASSOS, L. K. HASIMOTO SOUZA, J. A. LEMOS, C. H. ABBAS KHRAIS, C. R. COSTA, M. R. R. SILVA E O. F. L. FERNANDES. **Identificação**

de Leveduras do Gênero *Candida* por Métodos Manuais convencionais e pelo método Cromogênico Chromagar-Candia. *Revista de Patologia Tropical* 34 (1): 37-42.2005.

BUCHAN, B. W. & LEDEBOER, N. A. **Advances in Identification of Clinical Yeast Isolates by Use of Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.** *Journal of Clinical Microbiology.* Volume 51 Number 5. p. 1359–1366. 2013.

BULANI, A. & HOOSEN, A. **Use of matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry analyser in a diagnostic microbiology laboratory in a developing country.** *Afr J Lab Med.* 6(1), a598, <https://doi.org/10.4102/ajlm.v6i1.598>. 2017.

BUTTERFIELD, W.; JONG, S. C. & ALEXANDER, M. T. **Preservation of living fungi pathogenic for man and animals.** *Canad. J. Microbiol.*, 20: 1665-1673, 1974.

CAVALCANTE, S. C., FREITAS, R.S., VIDAL, M.S., DANTAS, D.C., LEVI, J.E., MARTINS, J.E.C. **Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains.** *Mem Ins Oswaldo Cruz.* 102: 41-47. 2007.

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.

N. H. CAMPANHA, K. H NEPPELENBROCK, D. M. P. SPOLIDORIO, L. C. SPOLIDORIO, A. C. PAVARINA. **Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*.** *Oral Diseases.* 11: 392-398.2005.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos.** *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA,* 2004.

Q. T. CHAO, T. F. LEE, S. H. TENG, L. Y. PENG, P. H. CHEN, L. J. TENG, P. R. HSUEH. **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* 9 (10): e109376.2014.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. for the BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.8, p.2816-2823, 2006.

CONSENSO. **Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de microrganismos.** *Sociedade Brasileira de Microbiologia.* 2006.

COSTA, C. P. & FERREIRA, M. C. **Preservação de microrganismos: revisão.** *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 22 (3): 263-268. 1991.

DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas.** *Sete Lagoas, MG. Universidade Federal de São João. UFSJ. 2014.*

DENIS, J., M. MACHOUART, F. MORIO, M. SABOU, C. KAUFFMANN-LaCROIX, N. CONTET-AUDONNEAU, E. CANDOLFI & V. LETSCHER-BRU. **Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identifying Clinical Malassezia Isolates.** *J. Clin. Microbiol.*, 55: 90-96. January. 2017.

DORNELAS-RIBEIRO, M. 2006. **Análise comparativa por diferentes metodologias do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas de espécimes clínicos.** Dissertação de mestrado. IMPPG-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. 131p.

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) JCR*, v. 107, p. 31-38, 2012.

M. J. ESPY, J. R. UHL, L. M. SLOAN, S. P. BUCKWALTER, M. F. JONES, E. A. VETTER, J. D. C. YAO, N. L. WENGENACK, J. E. ROSENBLATT, F. R. COCKERILL AND T. F. SMITH. **Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing.** *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (1): 165.2006.

FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos patogênicos.** *Biológico.* 63: 73-82. 2001.

C. FIGUERAS, C., DÍAZ DE HEREDIA, C., GARCÍA, J.J., NAVARRO, M., RUIZ-CONTRERAS, J., ROSSICH, R., RUMBALÓ, J., FRICK, M.A. & ROSELLÓ, E.M. **Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva.** *An Pediatr(Barc).* p. 1-17. 2011.

FOY, C. A. & PARKES, H. C. **Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory.** *Clin Chem.* 47:990-1000. 2001.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, mai/jun. 2004.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook.** *Springer Science & Business Media.* 2006.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos.** *Lavras, MG. Universidade Federal de Lavras - UFLA.* 2011.

HIRATA, M. H., HIRATA, R. D. C., FILHO, J. M. **Manual de Biossegurança.** Editora Manole. 2ª edição. 2012.

KASSIM, A., VALENTIN PFLÜGER³, ZUL PREMJI¹, CLAUDIA DAUBENBERGER² 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*. 17:128. DOI 10.1186/s12866-017-1037-z. 2017.

KONEMAN, E. W., WINN, W. C., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., PROCOP, G. W., SCHERECKENBERGER, P. C. and WOODS, G. L. **Koneman Diagnóstico Microbiológico, texto e atlas colorido.** Guanabara koogan. 6ª edição. 2008.

LEE, K. H., SHIN, W. S., KIM, D. and KOH, C. M. **The presumptive identification of *Candida albicans* with germ tub induced by high temperature.** *Yonsei Med. J.* Vol. 40, n5. 1999.

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*. 37: 223-230. 2017.

LONDERO, A. T., WANKE B., LAZERA M. S., & MONTEIRO P. C. F. **Micologia Médica, Fiocruz, Revisão.** 2004.

M. R. MCGINNIS, A. A. PADHYE, AND L. AJELLO. **Storage of stock culture of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterilized distilled water.** *Applied microbiology*. Vol. 28, no. 2. P. 218-222. 1974.

McMANUS BA, COLEMAN DC, MORAN G, PINJON E, DIOGO D, BOUGNOUX M-E ET AL. **Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*.** *J Clin Microbiol*. 46(2): 652-664. 2008.

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*. 15:45. DOI 10.1186/s12941-016-0158-9. 2016.

NAKASONE, K. K., PETERSON, A. W., JONG, S. **Preservation and distribution of fungal cultures.** In: Mueller G M, Bills G F, Foster M S. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods.** 1[ed. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 37-47. 2004.

NEUFELD, P. M. & OLIVEIRA, P. C. **Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril.** *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, São Paulo, 40 (3):167-169. 2008.

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) **JCR**, v. 46, p. 477-484, 2015.

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

PORTARIA NORMATIVA Nº 585/MD, Diretrizes de Biossegurança, Bioproteção e Defesa Biológica do Ministério da Defesa DE 7 DE MARÇO DE 2013.

PORTARIA GM N.º 3.214, NR 6 - Dispõe sobre Equipamento De Proteção Individual - Epi, DE 08 DE JUNHO DE 1978. 06/07/78.

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.*53 (8): 2439-2450. 2015.

PIMENTEL, C. P. V. & FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos em meio de cultura.** *Biológico*, São Paulo, 55 (1/2): 27-33. 1989.

QIANGQIAG, Z., JIAJUN, W., LI, L. **Storage of fungi using sterilized is tilled water orly ophilization: Comparison after 12 years.** *Mycoses.* 41: 255-257. 1998.

RIBEIRO, P. M., KOGA ITO, C. Y., JUNQUEIRA, J. C., JORGE, A. O. C. **Isolamento de Candidaspp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar Candida.** *BrazDentSci.* out./dez.; 12 (4): 40-45. 2009.

RODRIGUES, E. G., LÍRIO, V. S. & LACAZ, C. S. **Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada.** *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo. 34 (2): 159-165. 1992.

RUHNKE, M. & MASCHMEYER, G. **Management of mycosis in patients with hematologic disease and cancer – Review of the literature.** *Eur. J. Med. Res.*7: 227-235.2002.

SANDVEN, P. **Epidemiology of candidemia.** *Revista Iberoam Micol.*, v.17, p.73-81, 2000.

SOLA, M. C., OLIVEIRA, A. P., FEISTEL, J. C.and REZENDE, C. S. M. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade.** *Enciclopédia biosfera.* Goiânia. 8 (14): 1398-1418. 2012.

TUMBARELLO, M., POSTERARO, B., TRECARIKI, E. M., FIORI, B., ROSSI, M., PORTA, R., DONATI, K. G., LA SORDA, M., SPANU, T., FADDA, G., CAUDA, R. AND SANGUINETTI, M. **Biofilm Production by Candida Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia.** *J. Clin. Microbiol.* Vol. 45, No. 6. p. 1843–1850. 2007.

VIGOURUOUX, S. MORIN, O., MOREAU, P., HAROUSSEAU, J. L., MILPIED, N. **Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years experience in a single center.** *Haematologica*, v. 91, n 5, p. 717-718. 2006.


APÊNDICES DO COMPÊNDIO

Apêndice 1.

FLUXO DAS AMOSTRAS



Apêndice 2.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1º RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO <i>IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)</i>			
	FORMULÁRIO PARA DEPÓSITO DE CEPAS DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 17/12/18
	COLEÇÃO DE LEVEDURAS DO IBEX		DEP	Folha: 1 de 1

1. OBJETIVOS

Estabelecer critérios para recebimento de amostras de leveduras para a Coleção de Leveduras do IBEx.

2. FORMULÁRIO

1 - Nome do Organismo:

2 - Histórico:

3 - Local de Origem:

4 - Restrições:

5 - Condições de crescimento:


6 - Referências bibliográficas:

7 - Nome:

8 - Endereço:

9 - Assinatura do depositante:

Apêndice 3.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO <i>IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)</i>			
	FORMULÁRIO PARA REQUERIMENTO DE CEPAS DO BANCO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 17/12/18
	COLEÇÃO DE LEVEDURAS DO IBEX		DEP-01	Folha: 1 de 1

1. OBJETIVOS

Estabelecer critérios para solicitação de amostras de leveduras da Coleção de Leveduras do IBEx.

2. FORMULÁRIO

1 - Nome do Pesquisador Solicitante:

2 - Local de Pesquisa:

3 - Utilização pretendida:

4 - Identificação da estirpe:

5 - Autorização da liberação:

6 - Data da liberação:

7 - Nome:

8 - Assinatura do profissional que liberou:

Apêndice 4.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 06/11/17
	PRODUÇÃO DE TUBO GERMINATIVO	DEP-08	Folha: 1 de 2	

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para Identificação preliminar de leveduras (*Candida albicans*) através da verificação da produção de tubo germinativo.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- **Tubo germinativo** - Prolongamento da célula leveduriforme na presença de meio hiperproteico.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa, Chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras

- Cultura de contendo crescimento de leveduras.

4.2. Adequação do equipamento

- NA

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Realização do método em duplicata.
- Preparação prévia dos materiais a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1º RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 06/11/17
	PRODUÇÃO DE TUBO GERMINATIVO	DEP-08	Folha: 2 de 2	

5. PROCEDIMENTO



Passo a Passo

- Inocular fragmentos de culturas de leveduras (após crescimento em ágar batata dextrosado - BDA, por 24-48 h) em 0,4 mL de soro humano, utilizando agulha ou alça bacteriológica;
- Incubar os tubos por um período de 2-3 h, a 35° C ±2;
- Colocar uma alíquota da suspensão entre lâmina e lamínula e examinar em microscópio com objetiva de 40x, procurando observar a produção de tubos germinativos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- NEUFELD, P. M. Manual de micologia médica. Técnicas básicas de diagnóstico. Rio de Janeiro: ed. Programa Nacional de Controle de qualidade. 1999.
- BARCELOS, L. F. & AQUINO, J. L. Tratado de análises clínicas. 1 ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2018.

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por: 	Data:	Verificado por: 	Data:	Aprovado por: 	Data:
MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 5.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 06/11/17
	PRODUÇÃO DE CLAMIDÓSPOROS	DEP-09	Folha: 1 de 2	

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para Identificação preliminar de leveduras (*Candida albicans*) através da verificação da produção de clamidósporos.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- Clamidósporos - Estrutura de resistência fúngica.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa, Chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras

- Cultura contendo crescimento de leveduras.

4.2. Adequação do equipamento

- NA

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Realização do método em duplicata.
- Preparação prévia dos materiais a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 06/11/17
	PRODUÇÃO DE CLAMIDÓSPOROS	DEP-09	Folha: 2 de 2	

5. PROCEDIMENTO

Passo a Passo

- Semear as colônias de leveduras através de estrias paralelas em ágar milho com Tween-80 (1%);
- Cobrir a superfície do meio com lamínulas estéreis, ficando estas sobre as estrias;
- Incubar à temperatura de 30° C, por 48-96 h;
- Retirar as lamínulas, montá-las em lâminas e examinar em microscópio com objetiva de 40x, procurando observar a formação de clamidósporos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- NEUFELD, P. M. Manual de micologia médica. Técnicas básicas de diagnóstico. Rio de Janeiro: ed. Programa Nacional de Controle de qualidade. 1999.
- BARCELOS, L. F. & AQUINO, J. L. Tratado de análises clínicas. 1 ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2018.

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 6.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 06/11/17
	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA	DEP-10	Folha: 1 de 2	

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para Identificação presuntiva de leveduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*) através da produção de cores características para as referidas espécies.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- Meio cromogênico – Meio contendo substrato cromogênico e enzimas específicas para hidrólise.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa, Chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras

- Cultura contendo crescimento de leveduras.
- Espécimes clínicos.

4.2. Adequação do equipamento

- NA

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Realização do método em duplicata.
- Preparação prévia dos materiais a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 06/11/17
	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA	DEP-10	Folha: 2 de 2	

5. PROCEDIMENTO

Passo a Passo

- Semear os isolados de leveduras em meio cromogênico;
- Incubar a 35°C ±2, por 24 h;
- Observar a cor exibida pelas colônias e identificar segundo orientações do fabricante.
A saber: *C. albicans* (Verde), *C. tropicalis* (Azul petróleo) e *C. krusei* (Rosa).


6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BARCELOS, L. F. & AQUINO, J. L. Tratado de análises clínicas. 1 ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2018.
- Manual técnico do fabricante

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 7.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO VITEK 2			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - VITEK 2	DEP-03	Folha: 1 de 6	

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para utilização do VITEK 2.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- Sistema Vitek 2.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Seção de Microbiologia (Bacteriologia/Micologia e Uroparasitologia), Chefe da Subdivisão de Pesquisa e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa e Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras


- Crescimento microbiano, isolados não refrigerados.
- Amostras ambientais com potencial presença de agentes biológicos.

4.2. Adequação do equipamento

- Calibração prévia do equipamento segundo orientação do fabricante.

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Estabelecer mapa de trabalho prévio.
- Preparação prévia dos materiais e reagentes a serem utilizados.
- Lâminas.
- Seringa com capacidade de 3 ml ou repipetador.
- Óleo de imersão.
- Alça bacteriológica.
- Bateria de corantes de Gram.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO VITEK 2			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - VITEK 2	DEP-03	Folha: 2 de 6	

- Crescimento bacteriano.
- Tubos de ensaio plástico (12x75 mm)
- Cartão de identificação: YST.
- Salina 0,45%.
- Ponteiras estéreis.
- Pipeta automática.
- Câmara de fluxo laminar.
- Bico de Bunsen.
- Estufa bacteriológica.
- Equipamento Vitek 2.
- Colorímetro do Vitek 2.
- Microscópio óptico.

5. PROCEDIMENTO

Passo a Passo

Procedimento:

Inicialmente realizar a coloração de Gram para definir as características morfológicas da bactéria isolada (vide POP Bacterioscopia pelo método de Gram).


- **IDENTIFICAÇÃO**

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS:

- ✓ Selecionar o cartão **YST**;
- ✓ Identificar o tubo com o número correspondente do paciente e o número da cepa;
- ✓ Preparar o inóculo utilizando leveduras isoladas em cultura pura com 18 a 24 horas de crescimento;
- ✓ Ressuspender em 3 ml de salina 0,45%, atingindo a escala 1.8 a 2.2 de Mac Farland;
- ✓ Transferir a cassette para a estação de enchimento (vácuo);
- ✓ Obedecer a sinalização do equipamento que indica a transferência para a estação de introdução e remoção de cassetes (transferir em até 10 minutos).

- **TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE**

SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS:

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO VITEK 2			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - VITEK 2	DEP-03	Folha: 3 de 6	


- ✓ Selecionar o cartão **AST-YS08** (para leveduras);
- ✓ Identificar o tubo com o número do paciente e número da cepa;
- ✓ Preparar a suspensão bacteriana, transferindo 380 microlitros do inóculo preparado para a identificação em 3 ml de salina 0,45% (utilizar o repipetador);
- ✓ Transferir a cassette para a estação de enchimento (vácuo);
- ✓ Obedecer a sinalização do equipamento que indica a transferência para a estação de introdução e remoção de cassetes (transferir em até 10 minutos);
- ✓ Após o ciclo de leituras, será liberado a interpretação e o MIC para cada antifúngico
- ✓ Após o ciclo de leitura, o equipamento ejeta os cartões concluídos;
- ✓ Os cartões são recolhidos em recipiente específico (Estação de depósito de cartões usados) que acomoda um máximo de 60 cartões e deve passar por limpeza mensal;
- ✓ Os tubos serão descartados para autoclavagem.

- **RESULTADOS DO AES:**

O sistema **Advanced Expert System** (AES) é um programa de software para a validação e interpretação de resultados de sensibilidade do sistema Vitek 2 e detecção de fenótipos resistentes.

- **ÍCONES DE ESTADO E DESCRIÇÕES:**

	Preliminar
	Final, porém faltando informações
	Isolado completo
	Para rever
	Para aprovar

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO VITEK 2			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - VITEK 2	DEP-03	Folha: 4 de 6	

➤ **CRITÉRIOS DE ADEQUAÇÃO DOS RESULTADOS**

Quando o percentual de probabilidade da identificação é baixo, o equipamento sinaliza para a necessidade de provas bioquímicas adicionais

Se o AES considerar um resultado como inconsistente, a validação do mesmo dependerá da análise do fenótipo com confirmação em bancada quando necessário.

• **CADASTRO NO VITEK**

- Realizar a leitura do código de barras do material para linkar ao seu respectivo cartão, selecionando previamente o ícone **DEFINIR ISOLADOS**

- Salvar as informações da cassette no ícone **GUARDAR**

- Utilizar a árvore de navegação para visualizar os resultados, como também validar os resultados revisados transferindo-os para o **OBSERVA**.

• **MANUTENÇÃO MENSAL**

➤ **LIMPEZA DO SISTEMA ÓPTICO:**


- 1) Manutenção
- 2) Optical sistem
- 3) Yes

OBS: Abrir a porta frontal, soltar as molas e liberar o sistema óptico.

- 4) Limpar com gaze umidecida em água e gaze seca posteriormente.

➤ **LIMPEZA DO CARROUSSEL:**

- 1) Manutenção
- 2) Remove carroussel
- 3) Yes
- 4) Destrava a porta

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO VITEK 2			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - VITEK 2	DEP-03	Folha: 5 de 6	

- 5) Retira a 1ª bandeja
- 6) Limpar com detergente e deixar secar
- 7) Encaixar a bandeja no carrossel
- 8) Done (para girar)
- 9) Retirar as demais bandejas da mesma forma
- 10) Replace carrossel para recolocar
- 11) Yes
- 12) Colocar a tampa.

- **CÓPIA DE SEGURANÇA DOS DADOS:**

- 1) Introduzir um CD vazio ou de leitura.
- 2) Selecionar: INICIAR > PROGRAMAS > VITEK 2 > VITEK 2 SYSTEMS BACKUP RESTORE.

OBS: O software certifica-se que todos os serviços ficarão parados para efetuar a cópia de segurança.


- 3) SIM (gravar por cima dos dados contidos no CD).
- 4) O sistema copia toda a base de dados do software do sistema VITEK 2 para o CD.
- 5) A estação de trabalho ejetta o CD.
- 6) A estação de trabalho notifica que a cópia está concluída.
- 7) Selecionar OK (a estação de trabalho é automaticamente reiniciada.

- **CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO**

- Definir o grupo de isolados (com 2 repiques prévios) e os cartões para o Controle de Qualidade;
- Proceder o preparo dos cartões e introdução no equipamento conforme descrito no Procedimento;
- Selecionar o ícone específico;
- Aparece a janela configurar Teste CQ;
- Selecionar a cepa teste.

- **Validação dos resultados:**

- Visualizar os resultados na árvore de navegação referente ao CQ;
- Verificar se os parâmetros estão dentro do intervalo (ausência de desvio)

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO VITEK 2			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - VITEK 2	DEP-03	Folha: 6 de 6	

OBS: Na ocorrência de desvio, proceder a repetição do teste com repique prévio das cepas.

Estabilidade e armazenamento:

- Placas contendo crescimento microbiano: Estabilidade de até 48 horas em estufa bacteriológica.
- Salina 0,45%: Estabilidade de 6 meses ou conforme fabricante (se adquirida pronta para uso), sob refrigeração
- Cartões de identificação e susceptibilidade: Segundo especificação do fabricante, sob refrigeração.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- o Manual do equipamento
- o Manual de microbiologia da Anvisa
- o SILVA, Carlos Henrique Pessoa de Menezes e. Bacteriologia: um texto ilustrado. 1ª edição. Editora Eventos, 1999.
- o MURRAY, P. R. et al. 1999. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology.
- o SILVA, Carlos Henrique Pessoa de Menezes e. 1999. Bacteriologia: um texto ilustrado. 1ª ed .R.J,Eventos.
- o Manual Técnico do Equipamento Vitek 2 (CD).

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
MAJ VANUSA Chefe Seção Microbiologia		MAJ VANUSA Chefe Seção Microbiologia		MAJ DORNELAS Chefe Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 8.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO MALDI-TOF			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - MALDI TOF	DEP-01	Folha: 1 de 3	

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para utilização do MALDI-TOF.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- Espectrometria de Massa por Tempo de Voo.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras

- Materiais biológicos: Sangue e líquido
- Crescimento microbiano não refrigerado.
- Amostras ambientais com potencial presença de agentes biológicos.

4.2. Adequação do equipamento

- Calibração prévia do equipamento segundo orientação do fabricante.

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Não refrigerar as amostras.
- Realização dos testes em duplicata.
- Estabelecer mapa de trabalho prévio.
- Preparação prévia dos materiais e reagentes a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO MALDI-TOF			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - MALDI TOF	DEP-01	Folha: 2 de 3	

5. PROCEDIMENTO

Passo à Passo para Leitura de Amostras

Calibração

1- Abrir a tela do programa Flex Control

Nota: este programa deve sempre ficar aberto; deve-se apenas minimizá-lo ou maximizá-lo na barra de tarefas

2- Inserir a Target Plate

- Se o boat estiver na posição de leitura (IN):

- No programa Flex Control, clicar no botão Load/Eject

- Esperar o status de "OUT" no canto inferior direito do programa Flex Control ou esperar o LED de função "Access" acender no Microflex LT

- Abrir a tampa de entrada no Microflex LT e inserir a Target Plate (verificar seu encaixe perfeito no boat)

- Passar o dedo em toda a extensão do o-ring

- Fechar a tampa

- Clicar no botão Load/Eject

- Esperar o status de "IN" no canto inferior direito do programa Flex Control

- Se o boat estiver na posição de entrada (OUT):

- Abrir a tampa de entrada no Microflex LT e inserir a Target Plate (verificar seu encaixe perfeito no boat)

- Passar o dedo em toda a extensão do o-ring

- Fechar a tampa

- Clicar no botão Load/Eject

- Esperar o status de "IN" no canto inferior direito do programa Flex Control

3- Esperar preparo do vácuo

- No programa Flex Control, clicar na aba "Status" (menu da metade inferior da tela) e depois no botão "Details"

- Verificar se aparece a função da aba "Vacuum" (menu da metade superior da tela)

- Esperar os 3 'READY' na aba de "Status" (Processor Subsystem/Vacuum/High Voltage)

4- Calibrar com o BTS

- Indicar a posição do BTS

- Clicar na função "Calibrate"

- Esperar a janela com a mensagem: "A calibração ocorreu com sucesso"

- Clicar em "OK"

- Minimizar o programa Flex Control

Criação do Projeto

1- Abrir o programa RTC

- Clicar no ícone "Maldi Biotyper RTC"

2- Criar um Novo Projeto

- Clicar na função "File"

- Escolher a opção "Open New Classification"

- Clicar no botão "New" na janela de criação do novo projeto

- Escolher o método: Standard ou blood culture

- Uma nova janela se abrirá, colocar o nome do projeto (ex: DD_MM_AAAA_1) e clicar em "OK"

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO MALDI-TOF			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - MALDI TOF	DEP-01	Folha: 3 de 3	

- Clicar em "Next" na janela de criação do novo projeto
- Indicar o poço de início do projeto (primeiro poço com amostra) no mapa virtual da Target Plate
- Clicar com o botão direito do mouse e escolher a opção "Insert Sequential Mode"
- Na coluna de 'ID', escanear os números das amostras na mesma sequência colocada no seu mapa impresso
- Após escanear todas as amostras, clicar em "Next"
- Verificar se todas as bibliotecas de referência estão marcadas (com background azul)
- Verificar o Método escolhido: Standard ou Mixed Culture
- Clicar em "Finish"

Leitura e Identificação

- 1- Colocar os 2 programas (Flex Control e Maldi Biotyper RTC) com janela reduzida e lado a lado
- 2- No programa Flex Control, clicar no botão "Details" na aba de "Status" para acompanhar a visualização dos espectros

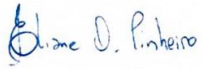


Visualização e Impressão dos Resultados

- 1- Clicar na função "View"
- 2- Escolher a opção "View Result"
- 3- Na tela de resultados, clicar na função "File"
- 4- Escolher a opção "File Preview"
- 5- Verificar as páginas com a listagem dos resultados
- 6- Ir na função "Print"
- 7- Na janela de impressão, escolher a opção "Pages" e especificar as páginas que deverão ser impressas
- 8- Clicar em "OK"
- 9- Após a impressão, fechar a tela de "View Results"
- 10- Fechar a tela do programa "


6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Manual do equipamento
- Manual de microbiologia da Anvisa

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
Eliane Olmo Pinheiro Farm-Bioquímica, Mestranda UERJ/IBEx		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 9.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	Protocolo de Identificação de Leveduras - Maldi-Tof			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	EXTRAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO FÓRMICO A 85%		DEP - 02	Folha: 1 de 2

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para a caracterização de leveduras no MALDI-TOF.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- Espectrometria de Massa por Tempo de Voo.
- Extração com ácido fórmico

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade e validade dos materiais e reagentes utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras

- Materiais biológicos: Sangue e líquido.
- Crescimento de leveduras, não refrigerado.
- Amostras ambientais de leveduras.

4.2. Adequação do equipamento

- NA.

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Não refrigerar as amostras.
- Realização dos testes em duplicata.
- Estabelecer mapa de trabalho prévio.
- Preparação prévia dos materiais e reagentes a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	Protocolo de Identificação de Leveduras - Maldi-Tof			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 12/03/18
	EXTRAÇÃO DIRETA COM ÁCIDO FÓRMICO A 85%		DEP - 02	Folha: 1 de 2

5. PROCEDIMENTO

Passo à Passo

Procedimento de Extração Direta:

- 1- Fazer o esfregaço direto na placa de leitura (Target Plate) utilizando um palito estéril diretamente no meio de cultura;
- 2- Cobrir o esfregaço com 1 μ L de Ác. Fórmico 85%;
- 3- Deixar secar à temperatura ambiente;
- 4- Cobrir com 1 μ L de HCCA (Matriz);
- 5- Deixar secar à temperatura ambiente.
- 6- Proceder a identificação no Maldi-Tof, seguindo o POP nº 01.

Nota 1: Certifique-se de que a placa esteja completamente seca antes de colocá-la no Equipamento para leitura.

Nota 2: Crescimento "overnight" deve ser usado para a rotina de identificação.

Nota 3: Não usar organismos refrigerados pois podem impactar negativamente na qualidade do espectro e na reprodutibilidade.


6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Manual do equipamento.
- Protocolos disponibilizados pela assessoria científica.

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
Eliane Olmo Pinheiro Farm-Bioquímica, Mestranda UERJ/IBEx		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 10.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO STEP ONE PLUS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 19/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - Step One Plus		DEP-04	Folha: 1 de 3

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para utilização do equipamento de PCR em tempo real Step One Plus.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa, Chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizadas nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras


- Amostras de ácidos nucleicos DNA/RNA
- Materiais biológicos
- Crescimento microbiano
- Amostras ambientais com potencial presença de agentes biológicos.

4.2. Adequação do equipamento

- Calibração prévia do equipamento segundo orientação do fabricante.

4.3. Instruções especiais


- Utilização de EPIs e EPCs.
- Realização dos testes em duplicata.
- Estabelecer mapa de trabalho prévio.
- Preparação prévia dos materiais e reagentes a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO STEP ONE PLUS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 19/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - Step One Plus		DEP-04	Folha: 2 de 3

5. PROCEDIMENTO

Passo a Passo para Leitura de Amostras

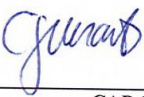
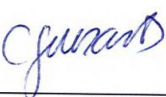

- ✓ Ligar o termociclador;
- ✓ Aguardar a completa inicialização do aparelho;
- ✓ Ligar o computador;
- ✓ Iniciar o software de controle do aparelho;
- ✓ Inserir os dados referentes às amostras;
- ✓ Selecionar o método de detecção fluorescente (Sybr Green ou sondas, para os ensaios com as leveduras);
- ✓ Selecionar o tipo de ensaio para a levedura que será realizado;
- ✓ Selecionar as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão do ensaio;
- ✓ Selecionar os volumes que serão usados em cada poço da reação;
- ✓ Deixar os *primers* e mastermixes em temperatura ambiente para equilíbrio térmico;
- ✓ Realizar a mistura de reagentes em sala limpa de amplicons de DNA e distribuí-los nos poços de placas de PCR;
- ✓ Pipetar o DNA extraído, obtido a partir das amostras clínicas, nos poços das placas de PCR;
- ✓ Selar a placa de PCR com filme óptico;
- ✓ Agitar a placa com os reagentes e centrifugá-la, para evitar bolhas nos líquidos reagentes;
- ✓ Abrir manualmente a porta do equipamento e posicionar a placa com os ensaios na posição correta;
- ✓ Fechar a porta do equipamento;
- ✓ Selecionar no software a opção **START RUN** e acompanhar a corrida na tela do computador.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PROTOCOLO DE OPERAÇÃO DO STEP ONE PLUS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 19/03/18
	OPERAÇÃO DE EQUIPAMENTO - Step One Plus	DEP-04	Folha: 3 de 3	


6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Manual do equipamento.

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 11.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	Protocolo de Identificação de Leveduras - Step One Plus			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 19/03/18
	PCR em tempo real com utilização de SYBR GREEN	DEP - 05	Folha: 1 de 3	

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para a caracterização de leveduras através da técnica de PCR em tempo real no equipamento Step One Plus.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade e validade dos materiais e reagentes utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras


- Amostras de ácidos nucleicos DNA/RNA
- Materiais biológicos
- Crescimento microbiano
- Amostras ambientais com potencial presença de agentes biológicos.

4.2. Adequação do equipamento

- Calibração prévia do equipamento segundo orientação do fabricante.

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Realização dos testes em duplicata.
- Estabelecer mapa de trabalho prévio.
- Preparação prévia dos materiais e reagentes a serem utilizados.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	Protocolo de Identificação de Leveduras - Step One Plus			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 19/03/18
	PCR em tempo real com utilização de SYBR GREEN		DEP - 05	Folha: 2 de 3

5. PROCEDIMENTO

Passo a Passo

Isolamento do microrganismo:

- ✓ Semear as amostras em ágar batata dextrosado (BDA);
- ✓ Incubar a 35°C ± 2°C, por 18-24 h.

Extração de ácidos nucléicos:

- ✓ Preparar suspensões em 20µL de solução de lise (SDS 10% 125µL; NaOH 0,05N 100µL; H₂O qsp 5000µL) e misturá-las às amostras a serem investigadas.
- ✓ Aquecer a 94° C, por 5 min e, posteriormente, adicionar de 180 µL de água Mili-Q estéril e centrifugar a 16.000 g, por 5 min.
- ✓ Separar o sobrenadante e guarda-lo como DNA extraído.

Técnica de PCR em tempo real:

- ✓ Adicionar uma alíquota de 3µL do DNA extraído em suspensão juntamente com 1µL (10pmol) de cada um dos dois iniciadores específicos e 5µL de PCR Luminaris Hi-Green qPCR Master Mix (ThermoScientific, MA, USA), em um volume total de 10µL para a reação de PCR em Tempo Real em cada poço da placa;
- ✓ Essa mistura deverá ser submetida a 1 ciclo de 95°C, por 5 min, para a desnaturação do DNA, 30 ciclos de 95°C, por 30 s, 60°C, por 30 s e 72°C por 30 s, 1 ciclo de 72°C, por 7 min e, posteriormente, manter a 4°C em termociclador em tempo real (*Step One Plus, Applied Biosystems-ThermoFisher*).

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	Protocolo de Identificação de Leveduras - Step One Plus			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 19/03/18
	PCR em tempo real com utilização de SYBR GREEN		DEP - 05	Folha: 3 de 3


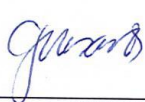

✓ O desenho dos *Primers* para o PCR é sumarizado na tabela abaixo.

Sequência dos <i>Primers</i>			
Fungo	Inicial	Sequências	Referência
<i>C. albicans</i>	FW	ATG TGG CAC GGC TTC TGC TG	Ogata 2015
	RV	TAG GCT GGC AGT ATC GTC AGA GG	Ogata 2015
<i>C. glabrata</i>	FW	TTC GTG TAC TGG AAT GCA CC	Ogata 2015
	RV	ATA GAA CCA AAC GTC CTA TTC C	Ogata 2015
<i>C. krusei</i>	FW	CTG CAG GAG AAG GGG TTC TGG AAC G	Ogata 2015
	RV	CGG TGT TGC GCC GTT CTG C	Ogata 2015
<i>C. tropicalis</i>	FW	ATT TTG TAT GTT ACT TCT TCG	Ogata 2015
	RV	TAG GCT GGC AGT ATC GAC GAA GG	Ogata 2015
<i>C. parapsilosis</i>	FW	ATT TTG TAT GTT ACT CTC TCG	Ogata 2015
	RV	TGC CAA CAT CCT AGG CCG AAG C	Ogata 2015

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Manual do equipamento.
- Protocolos disponibilizados pela assessoria científica.
- M. J. ESPY, J. R. UHL, L. M. SLOAN, S. P. BUCKWALTER, M. F. JONES, E. A. VETTER, J. D. C. YAO, N. L. WENGENACK, J. E. ROSENBLATT, F. R. COCKERILL AND T. F. SMITH. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin. Microbiol. Rev. 19 (1): 165. 2006.

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 12.

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PRESERVAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 08/04/18
	MÉTODO DE CASTELLANI		DEP-06	Folha: 1 de 2

1. OBJETIVOS

Estabelecer protocolo para preservação de leveduras através do método de Castellani.

2. TERMOS E DEFINIÇÕES

- **Método de Castellani - Método utilizado para preservação de microrganismos.**

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa, Chefe da Subdivisão de Pesquisa, Chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Chefe do Centro de Estudos em Biodefesa:

- Checar previamente a qualidade dos materiais utilizados;
- Estabelecer as variáveis críticas, critérios de aceitação e estratégia utilizada nas etapas de desafios dos processos;
- Disponibilizar materiais, pessoal e utensílios necessários para a execução;

4. DESCRIÇÃO

4.1. Amostras

- Fragmentos de meios de cultura contendo crescimento microbiano
- Fragmentos de colônias de microrganismos

4.2. Adequação do equipamento

- NA

4.3. Instruções especiais

- Utilização de EPIs e EPCs.
- Realização do método em duplicata.
- Preparação prévia dos materiais a serem utilizados.

5. PROCEDIMENTO

	MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CML - 1ª RM INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO IBEx (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)			
	PRESERVAÇÃO DE LEVEDURAS			
	DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA	Versão: 1.0	Cópias: 01	Data: 08/04/18
	MÉTODO DE CASTELLANI	DEP-06	Folha: 2 de 2	




Passo a Passo

- ✓ Transferir fragmento de colônias de leveduras ou blocos de ágar BDA contendo crescimento de leveduras para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada estéril;
- ✓ Armazenar os tubos a temperatura ambiente, em local apropriado e definido;
- ✓ Armazenar os tubos, em duplicata, sob refrigeração;
- ✓ Realizar a reposição do volume de água destilada estéril, de maneira asséptica, sempre que se fizer necessário.


6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- NEUFELD, P. M. & OLIVEIRA, P. C. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. Revista Brasileira de Análises Clínicas, São Paulo, 40 (3):167-169. 2008.
- SOLA, M. C., OLIVEIRA, A. P., FEISTEL, J. C. and REZENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. Enciclopédia biosfera. Goiânia. 8 (14): 1398-1418. 2012.

7. CONTROLE DE REVISÕES

Elaborado por:	Data:	Verificado por:	Data:	Aprovado por:	Data:
					
Eliane Olmo Pinheiro Farm-Bioquímica, Mestranda UERJ/IBEx		CAP GUEDES Chefe Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular		MAJ DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			
	00	Emissão Inicial			

Apêndice 13.

	<p>MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO</p> <p>CML-1ª RM</p> <p>INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO <i>IBEX (Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia / 1894)</i></p>
	<p>COMPÊNDIO DE MÉTODOS E DE BOAS PRÁTICAS EM COLEÇÃO DE CULTURA DE LEVEDURAS DO IBEX</p>

Este documento deverá ser consultado e seguido pela equipe do Centro de Estudos em Biodefesa do IBEX.

<p>Elaborado por:</p> <p><i>f. Lima</i></p> 	<p>Data:</p> <p>17/12/2018</p>	<p>Verificado por:</p> <p><i>C. Guedes</i></p> 	<p>Data:</p> <p>17/01/2019</p>	<p>Aprovado por:</p> 	<p>Data:</p> <p>07/02/2019</p>
<p>Eliane Olmo Pinheiro Farm-Bioquímica, Mestranda UERJ/IBEX</p> <p>MAJ FARM DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa</p>	<p>CAP FARM GUEDES Adjunto da Divisão de Ensino e Pesquisa</p> <p>MAJ FARM DORNELAS Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa</p>	<p>CEL FARM COLARES Diretor do Instituto de Biologia do Exército</p>			
HISTÓRICO DE REVISÕES					
Data	Revisão	Descrição			

ANEXO – Documento interno de criação da Coleção de Cultura de Leveduras do IBEX.



MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
CML 1º RM
INSTITUTO DE BIOLOGIA DO EXÉRCITO
IBEx (Lab Microscopia Clín e Bacteriol/1984)

MEMORANDO INTERNO DE CRIAÇÃO

**COLEÇÃO DE CULTURAS DE LEVEDURAS DO IBEX
(CCL-IBEx)**


Considerando que as Coleções de Cultura têm por missão manter representantes da biodiversidade brasileira e de seus recursos genéticos, sendo, por isso, representantes do patrimônio nacional, científico e cultural;

Considerando que microrganismos isolados podem ser empregados em pesquisas na área da saúde, incluindo estudos epidemiológicos e clínico-laboratoriais, bem como, no caso específico do IBEX, também na área de defesa biológica e segurança nacional;

E considerando que as Coleções de Cultura, para seu funcionamento, necessitam da definição de normas, métodos, técnicas e registro de dados, ficam instituídos, a partir desta data:

A Criação da Coleção de Culturas de Leveduras do IBEx (CCL-IBEx), e de seu Compêndio de Métodos e Boas Práticas.

Rio de Janeiro, RJ, 15 de fevereiro de 2019.


MARCOS DORNELAS RIBEIRO - Maj Farm
Chefe da Subdivisão de Pesquisa e Biodefesa e
Divisão de Ensino e Pesquisa - IBEX

De acordo:


ALBERTO MAGNO LOBO COLARES - Cel Farm
Diretor do IBEX