

Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp

Comparison of Vitek-2 automated identification system and PCR-ITS for species characterization of clinical isolates of *Candida* spp

Carolina Matias Higashi¹; Fabiana Hiromi Takashina²; Daniele Zandrini Rechenchoski³; Aline Tancler Stipp-Abe⁴; Eliana Carolina Vespero⁵; Regina Mariuza Borsato Quesada⁶; Marsileni Pelisson⁷

Resumo

As infecções graves causadas pelo g nero *Candida* têm se tornado um desafio na questão diagnóstica, no intuito de se detectar e identificar o agente etiológico de forma ágil, precisa e padronizada nos laboratórios clínicos. A predição da susceptibilidade aos antifúngicos, bem como a necessidade da geração de dados epidemiológicos reforçam a importância da identificação rotineira adequada das espécies de leveduras envolvidas em infecções. Dentre as 200 espécies de *Candida* já descritas, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* são mais frequentemente relacionadas a infecções em humanos. Todos os métodos fenotípicos de identificação de *Candida* apresentam limitações, em especial na caracterização de espécies não *C. albicans*, porém, a aplicação de métodos moleculares pode refletir no aumento de custo e tempo despendido para a obtenção de resultados laboratoriais. A fim de avaliar a aplicação do sistema automatizado Vitek 2-YST ID (bioMerieux) aliado ao uso de agar cromogênico na identificação rotineira de espécies de *Candida*, foram testados 44 isolados de infecção invasiva por inoculação em agar cromogênico e no painel automatizado e realização de amplificação do DNA relativo às regiões do espaçador interno transcrito 1 e 2 do rRNA (PCR-ITS). Oligonucleotídeos espécie específicos foram utilizados e o tamanho do produto amplificado foi correlacionado aos demais resultados. O sistema automatizado identificou 95,4% dos isolados quando em associação com as características coloniais observadas no meio cromogênico, porém, o uso de PCR-ITS ou metodologias mais sensíveis seria necessário para solucionar os demais resultados, ambíguos e errôneos.

Palavras-chave: *Candida* spp. Vitek 2. PCR- ITS 1 e 2.

Abstract

Serious infections caused by genus *Candida* have become a challenge in the diagnostic question, in order to detect and identify the etiologic agent of agile, precise and standardized form in manner clinical laboratories. The prediction of susceptibility to antifungal agents, and the need to generate epidemiological data highlight the importance of routine identification of yeast species involved in infections. Among the 200 *Candida*

¹ Mestranda em Ciências Fisiol gicas pela Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

² Graduanda em Farmácia pela Universidade Estadual de Londrina.

³ Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina.

⁴ Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite pela Universidade Norte do Paraná. Doutoranda em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina. Docente da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

⁵ Doutora em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina. Docente da Universidade Estadual de Londrina.

⁶ Mestre em Farmácia pela Universidade Estadual de São Paulo. Professora adjunta da Universidade Estadual de Londrina.

⁷ Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina. Professora assistente da Universidade Estadual de Londrina.

species already described, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. lusitaniae* are most often related with infections in humans. All of the phenotypic methods of identification of *Candida* have limitations, especially the characterization of the species not *C. albicans*, however, the application of molecular methods may reflect the increased cost and spent time for obtain results on laboratory. In order to evaluate the implementation of the automated system Vitek 2 ID - YST (bioMerieux) combined with the use of chromogenic agar in the routine identification of *Candida* species were tested 44 isolates from invasive infection by inoculation of chromogenic agar and automated panel and realization DNA amplification for the internal transcribed spacer regions of rRNA 1 and 2 (ITS - PCR). Oligonucleotides specific species were used and the size of the amplified product was correlated to other results. The automated system identified 95.4 % of the isolates when in association with colonial features observed in chromogenic medium, however, the use of PCR -ITS or more sensitive methodologies would be needed to solve the other results, ambiguous and erroneous.

Keywords: *Candida* spp.. Vitek 2. PCR- ITS 1 and 2

Introdução

Os fatores que contribuem para o aumento na incidência de infecções por leveduras são aqueles relacionados aos avanços diagnósticos e terapêuticos, como os procedimentos invasivos e o uso de antimicrobianos e drogas imunossupressoras. Desta forma, na contramão dos avanços para o prolongamento da vida encontra-se o aumento significativo das infecções fúngicas em pacientes submetidos às estratégias agressivas de cuidado clínico e cirúrgico (DIAMOND, 1991; FRIDKIN; JARVIS, 1996; MORRISON; HAAKE; WEISDORF, 1994; PFALLER; WENZEL, 2003; WARNOCK, 2007).

Diversas podem ser as manifestações clínicas da infecção fúngica, porém aquelas resultantes da infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida* estão relacionadas a taxas de mortalidade que variam de 25 a 60% no ambiente hospitalar (COLOMBO et al., 2006; HASSAN et al., 2009; TUMBARELLO et al., 2007).

Até 2007, aproximadamente 200 espécies de *Candida* foram descritas, no entanto, apenas 10% estavam envolvidas em infecções nos seres humanos. Dentre estas, cinco espécies (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*) representam mais de 90% dos casos de candidíase invasiva (PFALLER; DIEKEMA, 2007),

mas *C. famata*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. norvergensis* e *C. rugosa* também estão sendo relatadas na literatura, associadas principalmente a surtos hospitalares (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; HAZEN; HOWELL, 2007).

Mediante a suspeita de infecção, não só a detecção do agente por meio de exames como o hemocultivo ou antígenos, mas a identificação rápida das leveduras isoladas pode fornecer informações relevantes aos clínicos, devido ao fato de que várias espécies de leveduras, tais como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. parapsilosis*, são intrínseca ou potencialmente resistentes aos antifúngicos azólicos, à anfotericina B ou até às equinocandinas (AUBERTINE et al., 2006). Inversamente, segundo Pfaller et al. (2014), o aumento significativo da notificação de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, bem como a aparente emergência de espécies menos comuns podem ser reflexo da maior ênfase na identificação dos isolados como objetivo de dar subsídio à escolha terapêutica.

A identificação de leveduras usando métodos convencionais é demorada, dispendiosa e trabalhosa (AUBERTINE et al., 2006), de modo que vários produtos e sistemas comerciais têm sido desenvolvidos no intuito de contornar as dificuldades enfrentadas por laboratórios de microbiologia clínica no diagnóstico de infecções por *Candida* spp., tais como agar contendo

cromógenos, kits e painéis semi ou totalmente automatizados para a identificação presumida ou definitiva das espécies mais prevalentes (GRAF et al., 2000; KUMAR et al., 2013; MELETIADIS et al., 2011; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996). Além disso, diversas publicações têm relatado o valor do emprego de PCR baseada na amplificação de sequências intergênicas do RNA ribossômico (*Internal Transcribed Spacer - ITS*) para a identificação de isolados de *Candida* spp. (CHEN et al., 2000; DE BAERE et al., 2002; HATA et al., 2007; KORABECNA, 2007; MASSONET et al., 2004).

Neste sentido, Chen et al. (2001) testaram a hipótese de que as regiões espaçadoras ITS1 do rRNA poderiam conter informações alélicas úteis para a identificação precisa das espécies de leveduras e concluíram que juntos, os polimorfismos de sequência das regiões ITS1 e ITS2 podem prover o diagnóstico de mais de 40 espécies de leveduras e que poderiam, em associação a outras técnicas, serem extremamente úteis em laboratórios de microbiologia clínica.

Nos últimos anos, o crescente isolamento de *Candida* spp. em infecções invasivas assim como a participação de espécies não albicans em infecções severas no Hospital Universitário de Londrina (COSTA et al., 2014), trouxe a necessidade de se estabelecer uma rotina que caracterize as diferentes espécies, aliando qualidade à praticidade e à rapidez no diagnóstico.

O objetivo deste trabalho foi comparar as metodologias usadas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Londrina para a identificação de isolados de *Candida* obtidos de infecção invasiva: meio cromogênico e identificação automatizada do sistema Vitek 2, com a identificação molecular por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando sequências ITS 1 e 2 (*Internal Transcribed Spacer*), a fim de avaliar a aplicação rotineira das metodologias disponíveis.

Material e Métodos

Foram utilizados 44 isolados clínicos de *Candida* spp. obtidos de amostras de sangue, líquidos e fragmentos de tecido nos anos de 2012 e 2013, submetidos inicialmente ao cultivo no meio de cultura CHROMAgar *Candida* (Difco) por 48 horas a 35-37°C e visualização seguindo padrões de cores utilizados pelo fabricante e por Marinho et al. (2010) para identificação presuntiva das espécies de *Candida*: *C. albicans*, verde claro a verde médio; *C. tropicalis*, tons de azul; *C. krusei*, rosa com bordo esbranquiçado; *Candida* spp., creme, rosa claro ou malva claro a escuro.

Posteriormente, a partir do cultivo em CHROMAgar *Candida*, foi realizada a identificação automatizada por inoculação no painel YEAST-ID do Sistema VITEK® 2 (BioMérieux) (Vitek2-YST) seguindo a técnica preconizada pelo fabricante. A PCR foi realizada concomitantemente com oligonucleotídeos espécie específicos das regiões ITS 1 e 2 do rRNA de *Candida* spp., seguindo técnica preconizada por Li et al. (2003) e Tavanti et al. (2005).

Identificação molecular dos isolados de *Candida* spp.

Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada após o cultivo das leveduras em 3 mL de meio ágar Sabouraud dextrose líquido, por 18 horas a 28 °C sob agitação (180 rpm). As culturas resultantes foram sedimentadas por meio de centrifugação (10.000 rpm, por 5 minutos), e posteriormente lavadas em 1,5 mL de água destilada estéril, por meio de centrifugação sob as mesmas condições anteriormente citadas. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris pH 8,0 contendo 2% v/v Triton-X-100, SDS 1%, 10 mM NaCl e 1 mM de EDTA), 500 µL de fenol liquefeito e 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1, v/v, seguido de nova centrifugação, por 10 minutos a 12.000 rpm. Por fim, à fase aquosa foi adicionado 1 mL de etanol

absoluto gelado, e o tubo foi mantido a -20 °C por 24 horas para a precipitação do DNA. Após esse período, foi realizada nova centrifugação (20 minutos a 11.000 rpm) e o sedimento resultante lavado pela adição de etanol 70%. Após secagem à temperatura ambiente, o DNA foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura e mantido a 4 °C por 24 horas. Após esse período, o DNA resultante foi mantido a -20 °C até o momento da reação.

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A identificação molecular das espécies de *Candida* foi realizada pelo emprego da técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR foram espécie específicos e desenhados com base nas regiões ITS 1 e 2 do gene rRNA (LI et al., 2003; TAVANTI et al., 2005), como segue:

Para cada reação de amplificação foi utilizado 2 µL (10 ng) de DNA, 1 µL do oligonucleotídeo iniciador (20 pmol/µL) espécie específico, 1 µL do *C. albicans*

5`-TCAACTTGTCACACCAGATTATT-3` (402 pb);

C. tropicalis 5`-
AAGAATTTAACGTGGAACTTA-3` (149 pb);

Complexo *C. parapsilosis* 5`-
GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3` (126 pb);

C. glabrata lato sensu 5`-
CACGATTCGACACTTTCTAATT-3` (632 pb);

C. krusei 5`- GATTTAGTACTACTGCGTG
-3` (475 pb);

Reverse universal ITS4
5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`;

C. parapsilosis stricto sensu F 5`-
AGACTTGGGTATTACGTTGT – 3` (727 pb) e

R 5`- CAGGAGTCATGATTACCC- 3`.

oligonucleotídeo iniciador ITS4 (20 pmol/µL), 1,4 µL de desoxinucleotídeos (2,5 nM) (dATP, dCTP, dTTP,

dGTP), 0,5 µL de Taq polimerase 5U/µL juntamente com 2µL do tampão (10X) e 1µL de MgCl₂ 2,5 mM, completando um volume final de 20 µL com água ultrapura.

O ciclo inicial de amplificação foi de 10 minutos a 96 °C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C e extensão final de 5 minutos a 72 °C.

A visualização dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 2%. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos obtidos na amplificação caracterizaram as espécies: *C. albicans* (402 pb), *C. tropicalis* (149 pb), *C. parapsilosis* (126 pb), *C. krusei* (475 pb), *C. lusitaniae* (116 pb), *C. guilliermondii* (185 pb) e *C. glabrata* ATCC90030 (632 pb).

Resultados

Das 44 amostras analisadas, 16 amostras de *C. albicans* mostraram concordância de 100% entre a identificação pelo método automatizado (Vitek2-YST) e a PCR-ITS 1 e 2, assim como 5 amostras de *C. glabrata*, 9 de *C. parapsilosis*, 5 de *C. tropicalis*, 2 de *C. krusei* e 1 de *C. lusitaniae* (Tabela1).

Observamos que, para *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, há correlação entre identificação automatizada e molecular nos 16 isolados (100%). Para as duas primeiras espécies, a identificação presumida no agar não é suficiente para diferenciá-las mas, para *C. krusei*, a rugosidade das colônias auxilia na caracterização da espécie diretamente no meio cromogênico (Tabela 1).

Para *C. lypolitica*, não foi possível a comparação entre os métodos molecular e automatizado em razão da ausência do oligonucleotídeo específico, ainda que os resultados de PCR-ITS tenham sido negativos para as espécies estudadas.

Das 10 amostras de *C. tropicalis* identificadas por PCR-ITS, 5 tiveram mesmo resultado diretamente

pelo sistema automatizado, em concordância também com a coloração apresentada pelas colônias no CHROMAgar *Candida*. No entanto, para outros 5 isolados, houve discrepância entre os resultados dos métodos utilizados isoladamente.

Na tabela 1 podemos observar que das cinco *C. tropicalis* citadas acima, 2 amostras obtiveram resultado de “baixa discriminação” entre *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* na automação, com probabilidade superior a 90% para ambas as espécies, mas com coloração característica de *C. tropicalis* no agar.

Ainda para *C. tropicalis*, o sistema automatizado estabeleceu a identificação errônea de *C. parapsilosis* para duas amostras e baixa discriminação entre *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* para outra. Destas, duas *C. tropicalis* mostraram coloração azul rosado, menos característica no agar cromogênico, e outra, coloração esverdeada, incompatível com a identificação presuntiva adequada de *C. tropicalis* no agar.

Os dados das 44 amostras cujo resultado da PCR-ITS pôde ser observado tiveram probabilidade de acerto de 91 a 99% relatada pelo equipamento para a identificação pelo sistema Vitek2-YST, quando considerados inclusive aqueles isolados com baixa discriminação entre *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Tabela 1). Para estes últimos, o sistema automatizado não finaliza o resultado, porém sugere provas complementares para a diferenciação entre as espécies. Os três resultados pouco discriminatórios do Vitek2-YST seriam resolvidos com a observação presuntiva das colônias no CHROMAgar *Candida*.

Dentre as 44 leveduras avaliadas, a utilização isolada do sistema Vitek2-YST determinou a identificação ideal de 35 destes (86,36%) e a baixa discriminação ocorreu para 3 isolados (6,81%). Porém, a rotina laboratorial associando o sistema automatizado e o agar cromogênico seria suficiente para a resolução de 42 destes (95,45%).

Tabela 1 – Comparação dos isolados de *Candida* spp. identificados por meio da PCR das regiões ITS 1 e 2, painel Vitek 2-YST ID (bioMerieux) e CHROMAgar *Candida* (Difco)

	PCR (ITS 1 e 2)	Vitek2-YID		CROMOAgar <i>Candida</i>		Concordância dos métodos
		Identificação	Probabilidade %	Identificação	Cor	
16	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95 a 99%	<i>C. albicans</i> / <i>C. dublinensis</i>	Verde claro	Sim
9	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	95 a 99%	<i>Candida</i> spp.	Branco a róseo	Sim
5	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	93 a 99%	<i>Candida</i> spp.	Branco a róseo	Sim
2	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99%	<i>C. krusei</i>	Rosa*	Sim
1	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	95%	<i>Candida</i> spp.	Cinza	Sim
5	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	98 a 99%	<i>C. tropicalis</i>	Azul	Sim
1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	99%	<i>C. tropicalis</i>	Azul rosado	Parcial
		<i>C. parapsilosis</i>	97%			
2	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	96 e 98%	<i>C. tropicalis</i>	Azul	Parcial
		<i>C. parapsilosis</i>	91 e 92%			
1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	98%	<i>C. tropicalis</i>	Azul rosado	Não
1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	97%	<i>Candida</i> spp.	Cinza	Não
1	*	<i>C. lipolytica</i>	97%	<i>Candida</i> spp.	Branco	-

*Rugosa. **Não testado.

Fonte:

Discussão

Estima-se que aproximadamente de 5 a 15% das infecções de corrente sanguínea (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993; WISPLINGHOFF et al., 2004) e mais de 80% dos casos de fungemia sejam causados por *Candida* spp., com alta mortalidade (COLOMBO et al., 2007; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; TRICK et al., 2002).

Assim, a importância da identificação correta e rápida das espécies tem importância epidemiológica, porém, ainda mais significativa quando aplicada à terapêutica, em razão da presença de resistência inerente ou adquirida aos antifúngicos em muitas espécies.

A rotina do laboratório clínico vem se adaptando a este cenário, com o emprego de meios de cultura utilizando substâncias cromógenas, onde as espécies como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* podem ser presuntivamente identificadas (KUMAR et al., 2013; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996). Também, os sistemas de identificação comerciais prometem a identificação precisa e mais rápida de leveduras clinicamente relevantes, melhorando a qualidade e custo-eficácia da assistência ao paciente (AUBERTINE et al., 2006).

Neste sentido, Graf et al. (2000) avaliaram *Candida* e outras leveduras utilizando o sistema Vitek2-YST, em um total de 241 isolados versus a identificação automatizada de versão anterior, microscopia e teste de aglutinação para *C. krusei*. No geral, 222 amostras (92,1%) foram inequivocamente identificadas, incluindo 11 amostras (4,6%) que, identificadas com baixa discriminação, foram resolvidas por exames complementares simples. Dez amostras (4,1%) para as quais os resultados foram dados com baixa discriminação, não puderam ser inequivocamente identificadas com testes suplementares, 4 cepas (1,7%) foram erroneamente identificadas e 5 (2,1%) não puderam ser identificadas em nenhuma combinação de métodos. Desta forma, os autores encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, com resultados adequados para a

automação sozinha de 87,5% versus nossos 86,36% das amostras.

Resultados aproximados foram obtidos por Freydiere, Guinet e Boiron (2001) que avaliaram vários métodos fenotípicos para identificação de *Candida*, e concluíram que o sistema automatizado Vitek2-YST conseguiu identificar corretamente 93% das leveduras mais comuns, inclusive *C. dublinensis*.

Segundo Meletiadiis et al. (2011), em seu estudo, o sistema automatizado Vitek2-YST para isolados comuns (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) foi capaz de prover 91% de acerto nas identificações incluindo aquelas com baixa discriminação, 8% de identificação errônea e apenas 1% dos isolados não teve resultados.

No intuito de orientar o processo, os mesmos autores ressaltam que os meios cromogênicos podem facilitar a triagem para espécies raras, aumentando o estado de alerta para os resultados provavelmente ambíguos na automação.

Também, Kumar et al. (2013) observaram alto percentual de acerto (97%) para a identificação de espécies clínicas de *Candida* pelo sistema Vitek2-YST. Neste estudo, foi avaliada a junção da micromorfologia obtida no agar fubá e o cultivo em agar cromogênico versus a utilização do sistema Vitek 2-YST.

Segundo Valenza et al. (2008), em estudo realizado com 136 isolados de *Candida* spp., os resultados indicam que o painel Vitek2-YST é capaz de identificar corretamente a maioria das leveduras, por exemplo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* sem a utilização de testes suplementares, mas é menos adequado na identificação de *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. famata* e *C. tropicalis*. O erro de identificação ou identificação retardada das espécies mencionadas acima pode ter um impacto clínico importante, uma vez que *C. guilliermondii* apresenta resistência ao fluconazol, anfotericina B, equinocandinas e que, *C. parapsilosis* tem sido relatada como menos

susceptível às equinocandinas. Esses autores ressaltam que a adição de provas complementares simples como a microscopia e o agar cromogênico podem elevar o percentual de acerto do sistema automatizado para 93,7%.

Neste mesmo contexto, encontramos em nosso estudo 95,4% de acerto quando do isolamento prévio das amostras em CHROMAgar *Candida* seguido de identificação pelo sistema Vitek2-YST e observamos a ineficácia da aplicação isolada da automação para alguns isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Os dados são numericamente bastante confortáveis, porém, da mesma forma, preocupantes, uma vez que observamos mais da metade (54,6%) das candidemias diagnosticadas em nosso hospital sendo causadas por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (COSTA et al., 2014).

Ainda que a literatura mostre bons resultados discriminatórios para o sistema Vitek2-YST, além de sua rapidez na finalização das análises (MELHEM et al., 2013), Meletiadis et al. (2011) reforçam que os usuários de sistemas comerciais devem estar cientes dos resultados errôneos nos sistemas de identificação comerciais e relatam a necessidade de se incentivar o encaminhamento de amostras para a análise molecular. Infelizmente, as técnicas que envolvem biologia molecular, ainda não são a realidade da maioria dos laboratórios de microbiologia, quer seja pelo custo, quer seja pela mão de obra especializada.

De uma forma ou de outra, a maioria dos autores reforçam que a triagem e ou o isolamento das amostras em agar cromogênico, somada à micromorfologia ou provas suplementares e identificação automatizada alcançam altos índices de acerto na identificação de espécies do gênero *Candida* e que, a biologia molecular pode ser utilizada para a avaliação final de resultados ambíguos ou errôneos.

Desta forma, a amplificação de sequências ITS, ou outra metodologia capaz de fornecer índices de certeza superiores a 99%, seriam não somente eficazes, mas eficientemente discriminatórias para 2 dos 44 isolados de infecção invasiva testados (4,5%).

Conclusão

Aplicação rotineira do isolamento ou triagem em meios cromogênicos associada ao painel Vitek2-YST para identificação de leveduras do gênero *Candida* provenientes de infecção invasiva tem ótimo desempenho quando comparada à identificação molecular por meio da PCR-ITS. Desta forma, os testes moleculares serão úteis e eficientemente aplicados quando a combinação dos outros métodos não for suficientemente discriminatória, incorra em resultados ambíguos, errôneos ou mediante a identificação preliminar de espécies raras.

Referências

- AUBERTINE, C. L.; RIVERA, M.; ROHAN, S. M.; LARONE, D. H. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMAgar *Candida* as a source medium with the new card. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 44, n. 1, p. 227-228, 2006.
- BECK-SAGUÉ, C. M.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National nosocomial fungal surveillance system. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 167, n. 5, p. 1247-1251, May, 1993.
- CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFFE, K.; YARFITZ, S. L.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 region of the rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 38, n. 6, p. 2302-2310, 2000.
- CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFFE, K.; BUI, Y.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 11, p. 4042-4051, 2001.

- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Cambridge, v. 28, n. 5, p. 570-576, May 2007.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; STUDY, B. N. C. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.
- COSTA, V. G.; QUESADA, R. M. B.; ABE, A. T. S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 178, n. 1-2, p. 1-10, Oct. 2014.
- DE BAERE, T.; CLAEYS, G.; SWINNE, D.; MASSONET, C.; VERSCHRAEGEN, G.; MUYLAERT, A.; VANECHOUTTE, M. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region. *BMC Microbiology*, London, v. 2, n. 21, p. 1-8, 2002.
- DIAMOND, R. D. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Reviews of Infectious Disease*, Chicago, v. 13, n. 3, p. 480-486, 1991.
- EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, New York, v. 3, n. 11, p. 658-720, 2003.
- FREYDIERE, A. M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology*, Oxford, v. 39, n. 1, p. 9-33, 2001.
- FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 9, n. 4, p. 499-511, Oct. 1996.
- GRAF, B.; ADAM, T.; ZILL, E.; GOBEL, U. B. Evaluation of the vitek 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 38, n. 5, p. 1782-1785, 2000.
- HASSAN, I.; POWELL, G.; SIDHU, M.; HART, W. M.; DENNING, D. W. Excess mortality, length of stay, and cost attributable to *candidaemia*. *The Journal of Infection*, London, v. 59, n. 5, p. 360-365, Nov. 2009.
- HATA, D. J.; HALL, L.; FOTHERGILL, A. W.; LARONE, D. H.; WENGENACK, N. L. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n. 4, p. 1087-1092, 2007.
- HAZEN, K. C.; HOWELL, S. A. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. *Manual of clinical microbiology*. 9. ed. Washington D.C: ASM Press, 2007. p. 1762-1788.
- KORABECNA, M. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): Its biological meaning and application in medical mycology. In: MENDEZ-VILAS, A. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Badajoz: Formatex, 2007. p. 783-787.
- 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.
- 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.

- MARINHO, S. A.; TEIXEIRA, A. B.; SANTOS, O. S.; CAZANOVA, R. F.; FERREIRA, C. A. S.; CHERUBINI, K.; OLIVEIRA, S. D. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 286-294, 2010.
- MASSONET, C.; ELDERE, J. V.; VANECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS-2 fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 42, n. 5, p. 2209-2211, 2004.
- 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.
- MORRISON, V. A.; HAAKE, R. J.; WEISDORF, D. J. Non-*Candida* fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. *The American Journal of Medicine*, New York, v. 96, n. 6, p. 497-503, 1994.
- PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B.; AZIE, N. E. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2496 patients data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004-2008. *Plos One*, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 1-12, 2014.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.
- PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 1, p. 58-61, 1996.
- PFALLER, M. A.; WENZEL, R. P. The epidemiology of fungal infections. In: ANAISSE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. *Clinical mycology*. Curch Livingstone Phyladelphia: Elsevier, 2003. p. 3-19.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; FORDYCE, M. J.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, n. 11, p. 5601-5613, 2005.
- TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P.; NATIONAL, N. I. S. S. H. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 35, n. 5, p. 627-630, 2002.
- TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARCHI, E. M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K. G.; SORDA, M.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n. 6, p. 1843-1850, 2007.
- VALENZA, G.; STRASEN, J. R.; SCHAFER, 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.
- WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*, Tokyo, v. 48, p. 1-12, 2007.

WISPLINGHOFF, H.; BISHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospital analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

Recebido em: 31 jul. 2014.
Aceito em: 03 mar. 2015.