

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Aline da Silva Soares Souto

ESTABELECIMENTO DE FUNGOS COMO MATERIAIS DE REFERÊNCIA  
CERTIFICADOS E SELEÇÃO DE MÉTODOS DE EXCELÊNCIA PARA  
CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES

Rio de Janeiro

2018

Aline da Silva Soares Souto

ESTABELECIMENTO DE FUNGOS COMO MATERIAIS DE REFERÊNCIA  
CERTIFICADOS E SELEÇÃO DE MÉTODOS DE EXCELÊNCIA PARA  
CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras: Manuela da Silva  
Maria Helena S. Villas Bôas

Rio de Janeiro

2018

## Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Souto, Aline da Silva Soares Souto

Estabelecimento de fungos como Materiais de Referência Certificados e seleção de métodos de excelência para caracterização das diferentes espécies. / Aline da Silva Soares Souto. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2018.

194 f.: il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2018.

Orientadoras: Manuela da Silva; Maria Helena Simões Villas Bôas.

1. Material de Referência Certificado. 2. Centro de Recursos Biológicos. 3. Coleções de Cultura. 4. Controle de Qualidade. I. Título

Establishment of fungal Certified Reference Material and selection of excellent methods for different species characterization

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Aline da Silva Soares Souto

ESTABELECIMENTO DE FUNGOS COMO MATERIAIS DE REFERÊNCIA  
CERTIFICADOS E SELEÇÃO DE MÉTODOS DE EXCELÊNCIA PARA  
CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Verônica Viana Vieira (Doutora)  
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)

---

Janaína Marques Rodrigues Caixeiro (Doutora)  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro)

---

Luciana Trilles (Doutora)  
Instituto Nacional de Infectologia (INI/Fiocruz)

---

Manuela da Silva (Doutora) - Orientadora  
Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas (VPPCB/Fiocruz)

---

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora) – Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Dedico à  
Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki (*in memoriam*),  
eu jamais esquecerei tudo o que você  
representou na minha vida.  
Saudades eternas!

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida, por ser bom o tempo todo e por me amar tanto.

À minha orientadora e querida amiga Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por me acompanhar nessa longa trajetória, colaborando com o seu conhecimento e me presenteando com a sua paciência, atenção e carinho.

À minha orientadora Dra. Manuela da Silva que sempre foi solícita e super dedicada ao andamento desta tese. Agradeço a confiança em mim depositada.

Ao meu amigo e grande colaborador deste trabalho Carlos Sobrinho, a quem devo tanta gratidão por me auxiliar sempre. Não sei o que seria deste trabalho sem a sua ajuda.

À Dra. Marília Nishikawa por ter me recebido tão bem no Setor de Fungos, contribuindo com conhecimentos técnicos imprescindíveis para a realização desta tese.

À Dra. Verônica Vieira pela revisão desta tese e por todas as sugestões importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Luciana Trilles por me acompanhar desde o primeiro seminário e pela atenção dispensada sempre que precisei.

À Dra. Janaína Marques por todas as sugestões em prol do sucesso deste trabalho.

Às queridas amigas Fernanda Ventura, Adriana Frazão e Luciane Medeiros pela grande ajuda na realização das análises com MALDI-TOF MS em Biomanguihos/Fiocruz e por terem se tornado pessoas tão especiais para mim.

Ao Fábio Brito-Santos pelo apoio e ensinamentos relacionados aos testes de sequenciamento da região ITS.

Aos meus amigos Carolina dos Santos, Claudia Souto, Nilson Diniz e Rafael Vasconcellos por garantirem altas risadas, me proporcionando os melhores almoços durante esse tempo no INCQS. Vocês são muito especiais!

Às queridas amigas do Departamento de Microbiologia do INCQS, Renata Trotta, Catia Chaia, Talita Coelho e Karyne Rangel pelo carinho diário e por demonstrarem prontidão para o que eu precisasse.

À Carla Rosas que sempre foi tão atenciosa e por ter me auxiliado durante a finalização desta tese.

Aos funcionários da Central de Esterilização e do Setor de Meio de Cultura pela disponibilidade e presteza sempre que solicitados.

Ao Setor de Saneantes, meu setor do coração, onde tudo começou e onde aprendi muito do que sei hoje.

Ao INCQS, onde me sinto tão acolhida. Obrigada pelos 11 anos de imenso aprendizado.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por se orgulharem sempre de mim.

Ao meu esposo Luiz por não ser apenas o meu amado, mas por ser também um grande amigo e companheiro. O seu carinho e sua torcida fizeram toda diferença nessa jornada.

À minha irmã Jaqueline, sem a sua amizade e amor, eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada por ser a melhor irmã do mundo.

À minha afilhada Maria Clara que chegou há um ano e meio mudando nossas vidas para melhor e, mesmo sem saber, muitas vezes foi o meu porto seguro.

Aos meus queridos amigos Isac Macêdo, Alessandra Oliveira, Bruna Sabagh, Simone Nascimento, Rodrigo Rollin e Catia Nascimento pelo imenso carinho e incentivo nessa fase tão delicada e cansativa. Vocês são muito importantes na minha vida.

“Craque mesmo é o povo brasileiro  
carregando esse time de terceira divisão” (...)

Gonzaguinha,  
de 1979 até os dias atuais.

Fora Temer!



## RESUMO

A utilização de Material de Referência Certificado (MRC) é fundamental para os laboratórios que desejam obter resultados confiáveis, já que seus valores de propriedade são bem definidos, garantindo assim a rastreabilidade de determinados parâmetros em diferentes áreas. A aquisição de MRC biológico pelos laboratórios brasileiros tem sido dificultada devido à inexistência destes materiais no mercado nacional, bem como os altos custos relacionados à importação. A produção de MRC destinados a ensaios microbiológicos é complexa, já que há a instabilidade natural dos micro-organismos. O apoio ao desenvolvimento desses materiais por coleções de culturas estabelecidas como Centro de Recursos Biológicos é de fundamental importância para o Brasil, a fim de permitir que atividades de controle de qualidade de produtos ou em análises clínicas, cujas exigências por MRC têm sido cada vez maiores por parte dos órgãos fiscalizadores, se tornem mais ágeis, eficientes e menos onerosos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia para a produção de quatro leveduras como MRC, *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, seguindo os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017. Os estudos de homogeneidade, estabilidade em longo prazo, estabilidade em curto prazo, bem como as avaliações estatísticas foram realizados. Os lotes de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 e *C. albicans* CFRVS MRC 40006 se apresentaram homogêneos e foram estáveis por um ano. Além disso, esses materiais se apresentaram estáveis a 4 °C, 25 °C e 35 °C, temperaturas que simulam condições de transporte. A fim de eleger a técnica mais rápida e eficiente para caracterização taxonômica dos materiais, foi realizado um estudo com espécies representantes dos gêneros envolvidos na produção dos MRC deste trabalho, em que diferentes métodos de identificação foram aplicados. Para *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 e *C. gattii* CFRVS MRC 40324, as técnicas eleitas para a caracterização fenotípica foram a observação da síntese de melanina, utilizando ágar Semente de Niger, juntamente com o teste em meio CGB, já para a genotípica foi a técnica molecular RFLP-URA5. Para o material *C. albicans* CFRVS MRC 40006, a caracterização fenotípica foi realizada utilizando meio Chromoagar e o método automatizado VITEK 2, já para a genotípica, a técnica indicada foi o sequenciamento da região ITS. Para *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 e *C. albicans* CFRVS MRC 40006 foram

elaborados certificados cujo conteúdo segue as orientações do ABNT ISO Guia 31:2017, e em que constam os valores de propriedade certificados atribuídos a cada MRC, bem como suas incertezas associadas. Não foi possível a certificação de *S. cerevisiae* CFRVS 40001, já que não foi selecionado um método inequívoco para a caracterização taxonômica desta espécie. Este estudo contribuirá para o desenvolvimento e inovação tecnológica na área da produção industrial brasileira e para a saúde pública.

Palavras-chave: Material de Referência Certificado. Centro de Recursos Biológicos. Coleções de Cultura. Controle de Qualidade.

## ABSTRACT

The use of Certified Reference Material (CRM) is fundamental for laboratories that want to obtain reliable results, since their property values are well defined, thus ensuring the traceability of certain parameters in different areas. The biological CRM acquisition by Brazilian laboratories has been hampered due to the inexistence of these materials in the national market, as well as the high costs related to imports. The CRM production for microbiological assays is complex, since there is the natural instability of microorganisms. Support for CRM development by culture collections established as Biological Resource Center is very significant for Brazil in order to allow product quality control activities or clinical analyzes, whose requirements for CRM have been increasing by the regulatory agencies, become more agile, efficient and less expensive. The purpose of this study was to develop a methodology of four yeasts as CRM, *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, following ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 requirements. Homogeneity, long-term stability, short-term stability testing, as well as statistical aspects were performed. *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 and *C. albicans* CFRVS MRC 40006 lots were homogeneous and stable for one year. Moreover, these materials were stable at 4 °C, 25 °C and 35 °C, temperatures that simulate transport condition. In order to choose the fastest and most efficient technique for the taxonomic characterization of the materials, a study was conducted with representative species of the genera related in the CRM production of the present work, in which different identification methods were applied. For *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 and *C. gattii* CFRVS MRC 40324, the techniques chosen for the phenotypic characterization were melanin synthesis analyses, using Niger Seed agar, together with the test in CGB medium, whereas for genotype identification the RFLP-URA5 molecular technique was used. For *C. albicans* CFRVS MRC 40006 material, the phenotypic characterization was performed using Chromoagar medium and the VITEK 2 automated method, while for the genotype, the indicated technique was the ITS region sequencing. Certificates were elaborated for *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 and *C. albicans* CFRVS MRC 40006 and its content follows the guidelines of ABNT ISO Guide 31:2017. These certificates include the certificate property values assigned to each CRM, as well as their associated uncertainties. It was impossible to

certify *S. cerevisiae* CFRVS 40001 since an unambiguous method was not selected for taxonomic characterization of this species. This study will contribute to the development and technological innovation in the area of Brazilian industrial production and to public health.

Keywords: Certified Reference Material. Biological Resources Centers. Culture Collections. Quality Control.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cepas pertencentes a diferentes grupos taxonômicos utilizadas para testar os métodos de identificação aplicados no presente estudo.....	41
Tabela 2	Variações realizadas nos diferentes experimentos para definição do quantitativo de unidade formadora de colônia e resultados da viabilidade pré e pós liofilização.....	66
Tabela 3	Testes utilizando a escala 0,3 McFarland e diluições próximas a $10^{-3}$ em leite desnatado para definição do quantitativo de unidade formadora de colônia.....	67
Tabela 4	Testes para estabelecimento do método de produção de <i>C. albicans</i> como MRC.....	69
Tabela 5	Testes para estabelecimento do método de produção de <i>S. cerevisiae</i> como MRC.....	70
Tabela 6	Dados referentes aos resultados do estudo de homogeneidade dos diferentes materiais produzidos.....	73
Tabela 7	Principais parâmetros gerados durante a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microsoft Excel, para o teste de homogeneidade dos quatro materiais.....	74
Tabela 8	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de <i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323.....	76
Tabela 9	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de <i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324.....	77
Tabela 10	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de <i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006.....	78
Tabela 11	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de <i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001.....	79
Tabela 12	Cálculo das medianas em função do tempo em meses no estudo de estabilidade em longo prazo dos diferentes MRC.....	80
Tabela 13	Principais parâmetros gerados no cálculo do teste de regressão linear dos diferentes MRC.....	82
Tabela 14	Incertezas inerentes à estabilidade em longo prazo dos diferentes MRC.....	83
Tabela 15	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323, frente a três diferentes temperaturas.....	84
Tabela 16	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C.</i>	

	<i>gattii</i> CFRVS MRC 40324, frente a três diferentes temperaturas.....	85
Tabela 17	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006, frente a três diferentes temperaturas.....	86
Tabela 18	Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de <i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001, frente a três diferentes temperaturas.....	87
Tabela 19	Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura diferente do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de <i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323.....	88
Tabela 20	Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323, frente a três diferentes temperaturas.....	89
Tabela 21	Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura diferente do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de <i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324.....	90
Tabela 22	Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323, frente a três diferentes temperaturas.....	91
Tabela 23	Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura diferente do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de <i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006.....	92
Tabela 24	Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006, frente a três diferentes temperaturas.....	93
Tabela 25	Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura diferente do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de <i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001.....	94
Tabela 26	Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de <i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001, frente a três diferentes temperaturas.....	95
Tabela 27	Parâmetros gerados na aplicação do teste de Kruskal-Wallis para os diferentes lotes de materiais.....	96
Tabela 28	Valores de propriedade dos diferentes MRCs e suas incertezas.....	96
Tabela 29	Resultados dos testes de presença de Fenoloxidase, teste de CGB e avaliação fisiológica por método automatizado Vitek 2 das cepas de <i>Cryptococcus</i> .....	99

Tabela 30	Resultados do teste em Chromagar e avaliação fisiológica por método automatizado Vitek 2 das cepas de <i>Candida</i> .....	101
Tabela 31	Resultados da pesquisa de ascósporos nas cepas de <i>Saccharomyces</i> spp. e avaliação fisiológica por método automatizado Vitek 2.....	104
Tabela 32	Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF, realizada pelo analista A, utilizando <i>Cryptococcus</i> spp.....	107
Tabela 33	Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF, realizada pelo analista B, utilizando <i>Cryptococcus</i> spp.....	109
Tabela 34	Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF, realizada pelo analista A, utilizando <i>Candida</i> spp.....	112
Tabela 35	Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF utilizando <i>Candida</i> spp., realizada pelo analista B.....	113
Tabela 36	Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF utilizando <i>Saccharomyces</i> spp., realizada pelo analista A.....	115
Tabela 37	Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF utilizando <i>Saccharomyces</i> spp., realizada pelo analista B.....	116
Tabela 38	Tipos moleculares das cepas do complexo <i>C. neoformans/C. gattii</i> resultantes das análises genótípicas RFLP-URA5 e PCR-fingerprinting.....	118
Tabela 39	Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de <i>Cryptococcus</i> spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS.....	120
Tabela 40	Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de <i>Candida</i> spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS.....	122
Tabela 41	Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de <i>Saccharomyces</i> spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS.....	124
Tabela 42	Resultados das incertezas associadas aos testes de homogeneidade, estabilidade a longo e curto prazo e caracterização.....	125
Tabela 43	Resultados das incertezas associadas aos valores de propriedade de cada MRC produzido.....	125

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Conteúdo dos poços do cartão de leveduras VITEK 2 YST.....	55
Quadro 2	Padrões referentes aos tipos moleculares de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	58
Quadro 3	Perfil apresentado por <i>S. cerevisiae</i> quanto aos aspectos macroscópicos e microscópicos.....	105



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das escalas e diluições padronizadas na 1ª etapa e que foram utilizadas na 2ª etapa da definição do quantitativo de unidade formadora de colônia.....65
Figura 2	Modelo de Rótulo utilizado para a identificação do MRC produzido.....71
Figura 3	Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em longo prazo dos quatro MRCs durante 12 meses.....81
Figura 4	Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323 nas três diferentes temperaturas...88
Figura 5	Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324.....90
Figura 6	Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de <i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006.....92
Figura 7	Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de <i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001.....94
Figura 8	Aspectos macroscópicos observado a partir do crescimento das cepas de <i>C. neoformans</i> em YMA.....98
Figura 9	Aspectos macroscópicos observado a partir do crescimento das cepas de <i>C. gattii</i> em YMA.....100
Figura 10	Aspectos macroscópicos observado a partir do crescimento das cepas de <i>C. albicans</i> em YMA.....102
Figura 11	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Cryptococcus</i> spp. realizada pelo Analista A.....106
Figura 12	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Cryptococcus</i> spp., sem o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B.....108
Figura 13	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Cryptococcus</i> spp., com o uso de ácido fórmico, realizado pelo analista B, destacando os resultados show details.....110
Figura 14	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Cryptococcus</i> spp. com o uso de ácido fórmico, realizado pelo analista B, totalizando as identificações corretas.....110
Figura 15	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Candida</i> spp., realizada pelo analista A.....111
Figura 16	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Candida</i> spp. sem o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B.....114

Figura 17	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Candida</i> spp. com o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B.....	114
Figura 18	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Saccharomyces</i> spp., realizado pelo analista A.....	115
Figura 19	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Saccharomyces</i> spp. sem o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B.....	116
Figura 20	Resultados da análise por MALDI-TOF de <i>Saccharomyces</i> spp. com o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B.....	117

## SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise da Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
CGB	Ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CHCA	ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CRB	Centro de Recursos Biológicos
DNA	ácido desoxirribonucleico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Fiocruz/CFP	Coleção de Fungos Patogênicos
Fiocruz/ CFRVS	Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária
g	Força G
GBRCN	<i>Global Biological Resource Centers Network</i>
H <sub>0</sub>	Hipótese nula
H <sub>1</sub>	Hipótese alternativa
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde pública
LRNMS	Laboratórios de Referência Nacional em Micose Sistêmica
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
McF	McFarland
MR	Material de Referência

MRC	Material de Referência Certificado
MQ <sub>dentro</sub>	Média Quadrática dentro dos frascos
MQ <sub>entre</sub>	Média Quadrática entre os frascos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation Development</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	Rotações por minuto
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
TBE	Tris-borato-EDTA
TVP	Teste de Viabilidade e Pureza
UFC	Unidade Formadora de Colônia
U <sub>MRC</sub>	Incerteza expandida
U <sub>car</sub>	Incerteza relativa à caracterização
U <sub>homog</sub>	Incerteza relativa à homogeneidade
V	Volts
WDCM	<i>World Data Center for Microorganisms</i>
WFCC	<i>World Federation for Culture Collections</i>
YMA	Ágar extrato de levedura-extrato de malte
°C	grau Celsius
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
µL	microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Material de referência certificado.....</b>	<b>22</b>
1.1.1 Estudo de homogeneidade.....	24
1.1.2 Estudo de estabilidade.....	25
1.1.3 Caracterização do material de referência.....	25
1.1.3.1 <i>Caracterização molecular e barcode.....</i>	26
1.1.3.2 <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).....</i>	28
<b>1.2 Cryptococcus neoformans E Cryptococcus gattii.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3 Candida albicans.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4 Saccharomyces cerevisiae.....</b>	<b>32</b>
<b>1.5 Centro de recursos biológicos.....</b>	<b>33</b>
<b>1.6 Justificativa.....</b>	<b>37</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Fungos.....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Cepas utilizadas no estabelecimento de MRC.....	40
3.1.2 Cepas para aplicação dos diferentes métodos de identificação.....	40
<b>3.2 Produção dos MRC.....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Planejamento da produção de materiais de referência certificados.....	42
3.2.2 Armazenamento do lote estoque para trabalho.....	43
3.2.2.1 <i>Teste de viabilidade e pureza pré fase de preservação (TVP-pré).....</i>	44
3.2.2.2 <i>Teste de viabilidade e pureza pós fase de preservação (TVP-pós).....</i>	45
3.2.3 Definição do quantitativo de unidades formadoras de colônias.....	45
3.2.4 Produção dos lotes de <i>C. neoformans</i> , <i>C. gattii</i> , <i>C. albicans</i> e <i>S. cerevisiae</i> como materiais de referência certificados.....	46
3.2.5 Teste de controle da viabilidade.....	47
3.2.6 Estudo da homogeneidade.....	48
3.2.6.1 <i>Avaliação estatística do estudo da homogeneidade.....</i>	48
3.2.7 Estudo de estabilidade em longo prazo ou de armazenamento.....	49

3.2.7.1 Avaliação estatística do estudo de estabilidade em longo prazo.....	50
3.2.8 Estudo de estabilidade em curto prazo ou de transporte.....	51
3.2.8.1 Avaliação estatística do estudo de estabilidade em curto prazo.....	52
<b>3.3 Caracterização taxonômica.....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Caracterização quantitativa.....	52
3.3.2 Caracterização qualitativa.....	53
3.3.3 Caracterização fenotípica.....	53
3.3.3.1 Avaliação dos aspectos macroscópicos.....	53
3.3.3.2 Avaliação dos aspectos microscópicos.....	54
3.3.3.3 Avaliação fisiológica.....	55
3.3.3.4 Avaliação por MALDI-TOF MS.....	55
3.3.4 Caracterização genotípica.....	56
3.3.4.1 Extração de DNA dos fungos.....	56
3.3.4.2 PCR- fingerprinting.....	57
3.3.4.3 Análise de RFLP-URA5.....	58
3.3.4.4 Sequenciamento da região ITS.....	59
<b>3.4 Elaboração do certificado.....</b>	<b>50</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Seleção das cepas utilizadas para o estabelecimento de metodologia para a produção dos MRCs.....</b>	<b>62</b>
4.1.1 Seleção das cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	62
4.1.2 Seleção das cepas de <i>C. albicans</i> e <i>S. cerevisiae</i> .....	62
<b>4.2 Estabelecimento de metodologia para produção dos MRC.....</b>	<b>62</b>
4.2.1 Planejamento da produção de MRC.....	62
4.2.2 Armazenamento do lote estoque para trabalho.....	63
4.2.3 Definição do quantitativo de unidade formadora de colônia.....	63
4.2.3.1 Testes com <i>Cryptococcus</i> .....	63
4.2.3.2 Testes com <i>C. albicans</i> .....	68
4.2.3.3 Testes com <i>S. cerevisiae</i> .....	68
<b>4.3 Produção dos lotes de <i>C. neoformans</i>, <i>C. gattii</i>, <i>C. albicans</i> E <i>S. cerevisiae</i> como MRC.....</b>	<b>71</b>
<b>4.4 Estudo de homogeneidade e avaliação estatística.....</b>	<b>71</b>
<b>4.5 Estudo de estabilidade em longo prazo e avaliação</b>	

estatística.....	74
<b>4.6 Estudo de estabilidade em curto prazo e avaliação estatística.....</b>	<b>83</b>
<b>4.7 Caracterização quantitativa.....</b>	<b>95</b>
<b>4.8 Caracterização taxonômica.....</b>	<b>97</b>
4.8.1 Caracterização fenotípica.....	97
4.8.1.1 Aspectos macroscópicos, microscópicos e avaliação fisiológica de <i>Cryptococcus spp.</i> .....	97
4.8.1.2 Aspectos macroscópicos, microscópicos e avaliação fisiológica de <i>Candida spp.</i> .....	101
4.8.1.3 Aspectos macroscópicos, microscópicos e avaliação fisiológica de <i>Saccharomyces spp.</i> .....	103
4.8.1.4 Avaliação por MALDI-TOF MS.....	105
4.8.2 Caracterização genotípica.....	117
4.8.2.1 PCR-fingerprinting e RFLP-URA5.....	117
4.8.2.2 Sequenciamento da região ITS.....	119
<b>4.9 Elaboração do certificado.....</b>	<b>124</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>126</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>142</b>
<b>APÊNDICE A - Planejamento da produção de lote piloto de Materiais de Referência Certificados (MRC40323 - <i>Cryptococcus neoformans</i> e MRC40324 - <i>Cryptococcus gattii</i>).....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE B - Planejamento da produção de lote piloto de Materiais de Referência Certificados (MRC40006 – <i>Candida albicans</i> e MRC40001 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....</b>	<b>164</b>
<b>APÊNDICE C - Resultados da avaliação dos aspectos microscópicos e macroscópicos das diferentes espécies fúngicas.....</b>	<b>172</b>
<b>APÊNDICE D - Certificados de Análise dos quatro Materiais de Referência Certificados estabelecidos no presente trabalho.....</b>	<b>182</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Material de referência certificado

De acordo com o ABNT ISO Guia 30, “Material de Referência (MR) é um material, suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição. Material de Referência Certificado (MRC) é um material de referência, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica” (ABNT, 2011).

Para os laboratórios atingirem resultados de medições com rastreabilidade metrológica assegurada e qualidade, é necessária a utilização de elementos de referência (padrões rastreáveis e/ou materiais de referência) na calibração e validação dos métodos de medição. A rastreabilidade metrológica é um aspecto fundamental para a comparabilidade de resultados analíticos (MOURA; COSTA, 2010). De acordo com a definição do Vocabulário Internacional de Metologia (VIM), rastreabilidade é a “propriedade do resultado de uma medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição” (VIM, 2012).

Para o mercado globalizado é importante assegurar-se da comparabilidade dos resultados analíticos obtidos em diferentes laboratórios, sendo assim os controles de qualidade dos laboratórios necessitam de MR e MRC. Além disso, há a demanda de atendimento dos critérios dos organismos de acreditação. Infelizmente não existem tais materiais para todas as análises realizadas atualmente em laboratórios. Somente estão disponíveis MR para as técnicas analíticas mais rotineiramente empregadas e para um número muito pequeno de matrizes. Essa questão é ainda mais crítica quando se trata de materiais biológicos (ALVES; MORAES, 2003; CHUI, 2005).

O estabelecimento de materiais de referência está cada vez mais abrangente, já que a exigência por esses materiais vem aumentando em áreas bem



diversificadas. No Brasil, foram produzidos MRC utilizando como matriz o tomate para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros (CARDOSO *et al.*, 2010a), minério de ferro a serem utilizados em setores metalúrgico e mineral (BISPO, 2007), hemoglobina como padrão em calibração e validação de diagnósticos clínicos (BI *et al.*, 2012), bioetanol para mensurações de parâmetros eletroquímicos (FRAGA *et al.*, 2012), MRC para monitorar água em bioetanol (INAGAKI *et al.*, 2012), MRC em matriz peixe para análise do teor de mercúrio e metilmercúrio (ULRICH, 2011), DNA de bactéria para padrão de medição primária em técnicas moleculares (BAUME *et al.*, 2013), MRC em matriz peixe em pó para quantificação de pesticidas (OTAKE *et al.*, 2010), entre outros, principalmente para métodos químicos, em que já existe uma quantidade razoável de MRC disponíveis no mercado. Entretanto, quando se trata de métodos microbiológicos, a oferta ainda é muito reduzida.

Uma das grandes dificuldades dos laboratórios brasileiros é a indisponibilidade desses MRC no mercado nacional. Além dos preços elevados destes materiais importados, há ainda problemas no desembaraço alfandegário (CARDOSO *et al.*, 2010b, MONTEIRO, 2010).

O desafio na produção de MRC destinados a ensaios microbiológicos é a instabilidade natural dos micro-organismos, que dificulta o desenvolvimento, a produção e o uso desses materiais (PHILIPP *et al.*, 2007).

O MCR é um recurso de alto valor agregado que se aplica a inúmeros produtos dos mais diversos setores da economia. As exigências relativas à qualidade dos materiais biológicos para quaisquer fins representam um grande salto na agregação de valor aos produtos decorrentes de aplicações industriais, agrícolas, de saúde e ambientais (CANHOS *et al.*, 2007).

A produção e certificação de um material de referência são atividades bem complexas, compreendem etapas trabalhosas e envolvem uma série de estudos que garantem o uso e a finalidade para os quais foram estabelecidos, sendo um longo processo de pesquisa e desenvolvimento, o qual deve atender a rígidas normas impostas por organismos internacionais, cumprindo etapas definidas como homogeneidade, estabilidade e caracterização do material (ABNT, 2017; CARDOSO *et al.*, 2010b). Além disso, é necessário amplo conhecimento de métodos estatísticos a serem aplicados no processamento e na interpretação dos dados experimentais durante o processo de certificação (ABNT, 2012b).

Até 2017, para a produção e certificação de um material de referência, três guias eram preconizados, a fim de assegurar que a qualidade dos MRC produzidos atendesse aos requisitos dos usuários:

- ABNT ISO Guia 34 - Estabelece os requisitos gerais que um produtor de MR ou MRC deve atender para demonstrar sua competência (ABNT, 2012a);
- ABNT ISO Guia 35 - Provê princípios estatísticos que auxiliem no desenvolvimento de métodos válidos na atribuição de valores de propriedade de um material de referência, bem como as incertezas associadas a esses valores, com rastreabilidade metrológica estabelecida (ABNT, 2012b);
- ABNT ISO Guia 31 - Descreve o conteúdo e o formato dos certificados e rótulos de MRC (ABNT, 2004).

Porém, em junho de 2017, foi publicada a norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 que apresenta os “Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência”, sendo a norma sucessora do ABNT ISO Guia 34. Os guias ABNT ISO Guia 31 e ABNT ISO Guia 35 devem ser utilizados para orientações adicionais. A ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 apresenta as regras com as quais os MRC devem ser produzidos e disponibilizados, seguindo as orientações da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, na aplicação dos quesitos técnicos.

#### 1.1.1 Estudo de homogeneidade

Um estudo de homogeneidade é necessário na certificação de um lote de MR produzido para demonstrar que as unidades deste lote são suficientemente homogêneas entre si e deve ser o primeiro estudo implementado após a produção de um lote. É recomendada a realização do teste em condições de repetibilidade (mesmo laboratório, mesmo analista e todas as amostras analisadas no mesmo dia). O plano de amostragem utilizado na seleção dos frascos para o estudo pode ser aleatório, aleatório estratificado ou sistemático (ABNT, 2012b).

A amostragem aleatória é aquela em que todos os elementos da população apresentam a mesma chance de serem escolhidos como elemento da amostra, sendo por isso, escolhidos por sorteio. A amostragem sistemática compreende a escolha dos elementos segundo um fator de repetição, ou seja, um valor fixo que é determinado a partir da divisão do tamanho da população pelo tamanho da amostra.

Já a amostragem estratificada ocorre quando a população está dividida em grupos para a realização do sorteio, garantindo que as amostras escolhidas estejam uniformemente distribuídas em toda a população. A estratificação é o método mais indicado para esses estudos, conforme orientação do ABNT ISO Guia 35 (ABNT, 2012b, 2017).

#### 1.1.2 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade é também um pré-requisito na certificação de um MR e tem como objetivo avaliar o grau de instabilidade remanescente do MR após a produção ou a confirmação da estabilidade do material. O estudo de estabilidade pode ser realizado somente se for demonstrada homogeneidade suficiente do lote e ocorre sob condições específicas: condições de armazenamento (estabilidade em longo prazo) e de transporte (estabilidade em curto prazo). Esses testes devem ser planejados e podem ser orientados pelo descrito no ABNT ISO Guia 35 (ABNT, 2012b, 2017).

#### 1.1.3 Caracterização do material de referência

Compreende “a determinação de um ou mais valores de propriedades químicas, físicas, biológicas ou tecnológicas relevantes ao uso pretendido” (ABNT, 2016).

O material de referência deve ser bem caracterizado através de procedimentos tecnicamente válidos. Existem diferentes formas de caracterização: medições através de um único método (primário) em um único laboratório; medições através de dois ou mais métodos de referência independentes em um ou mais laboratórios; medições através de um ou mais métodos com exatidão demonstrável em uma rede de laboratórios qualificados; medições envolvendo uma abordagem que forneça valores de propriedade método-específicos em uma rede de laboratórios competentes (ABNT, 2017).

Após os testes para caracterização do material, um relatório de certificação detalhando o procedimento de execução do mesmo e o próprio certificado devem ser elaborados, sendo possível seguir as orientações do ABNT ISO Guia 31 (ABNT, 2017).

Dentre os métodos de caracterização de um MRC, é possível uma abordagem tanto para análise quantitativa, quanto para a qualitativa, esta última se baseia na identificação correta do micro-organismo. Essa fase muitas vezes requer uma discussão mais extensa para que dados mais precisos e exatos sejam obtidos.

A combinação de uma caracterização fenotípica mais tradicional com dados provenientes da biologia molecular pode auxiliar na obtenção de resultados inequívocos, sendo denominada abordagem polifásica, em que diferentes técnicas são aplicadas com o objetivo de alcançar a identificação correta de um micro-organismo (SIMÕES *et al.*, 2013).

#### 1.1.3.1 Caracterização molecular e barcode

Métodos de caracterização molecular se inserem na abordagem qualitativa da caracterização de um MRC. Sabe-se que a diversidade molecular resulta num grande aumento do número de cepas fúngicas clinicamente relevantes, assim como em mudanças de conceitos de taxa já existentes (DE HOOG *et al.*, 2013).

A identificação correta de fungos é de extrema importância, tanto para o tratamento adequado de doenças causadas por agentes fúngicos (BEGEROW *et al.*, 2010), como para estudos relacionados às informações taxonômicas, principalmente devido ao rápido avanço da ciência e da indústria de biotecnologia, se tornando necessária uma grande demanda de expertise em taxonomia em diversas áreas. Por esse motivo, a busca por alternativas mais rápidas e práticas, como o *barcode*, se tornam cada vez mais intensas (GODFRAY, 2002).

O código de barras de DNA para fungos é de fato um aspecto relevante a ser discutido, já que se coloca como uma grande variável para estudos de diversidade micológica (SCHOCH *et al.*, 2012). Esse marcador é considerado ótimo quando uma sequência é constante e única para uma determinada espécie, além disso, a variação interespecífica deve exceder a variação intraespecífica, o chamado *barcode gap* (HEBERT *et al.*, 2003; RAJA *et al.*, 2017).

Schoch *et al.* sugeriram, em 2012, a adoção da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal como o primeiro marcador de código de barras para fungos, uma vez que, diante da comparação entre seis diferentes regiões do DNA, essa foi a que apresentou maior probabilidade de correta identificação para fungos. Essa adoção foi então aprovada no Consórcio para o *Barcode* da vida.

Desde então outros autores apontam que a região ITS tem sido fortemente abordada para utilização como um código de barras, já que é um método rápido, preciso e de fácil execução (IRINYI *et al.*, 2016).

Mesmo com um bom desempenho da região ITS como um marcador de código de barras fúngico, o espaçador foi objeto de debate, gerando muitas críticas, devido sua inabilidade em distinguir espécies fúngicas altamente relacionadas (KISS, 2012). Schoch *et al.* (2012) acrescentam a importância de se estabelecer códigos de barras adicionais para grupos taxonômicos restritos.

A aplicação de um código de barras como uma ferramenta ampla de identificação de fungos depende do desenvolvimento de um banco de dados de sequências de alta qualidade, gerenciados por curadores que abordem a taxonomia e a filogenia de forma integrada (BEGEROW *et al.*, 2010).

Uma das razões para o bom desempenho da região ITS é o grande número de sequências disponíveis em bancos de dados quando comparado a outros genes (IRINYI *et al.*, 2016).

O GenBank, banco de responsabilidade do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), nos Estados Unidos, é o principal repositório de sequências nucleotídicas, sendo amplamente utilizado por microbiologistas clínicos e pela comunidade científica. Como esse banco atua basicamente como um arquivo, existem muitas sequências depositadas com o nome da espécie incorreto (BENSON *et al.*, 2014; BIDARTONDO, 2008). Outro estudo conclui que a análise de sequências utilizando o GenBank através do BLASTn deve ser realizada com muita atenção, uma vez que é sabido que aproximadamente 27% das sequências de ITS foram submetidas com identificação taxonômica insuficiente. Além disso, 20% das sequências de fungos nesse banco de dados podem ter sido depositadas incorretamente, em nível de espécie. Adicionalmente, a maioria dos registros não possui anotações atualizadas (NILSSON *et al.*, 2006).

Em consequência disso, uma série de base de dados de ITS com curadoria tem sido criada, a fim de minimizar os erros e garantir a correta identificação de espécies fúngicas (BENSON *et al.*, 2014; BIDARTONDO, 2008).

Dentre esses, um consórcio internacional de laboratórios de micologia médica foi organizado com o objetivo de estabelecer um banco de dados de ITS com qualidade controlada sob a supervisão do grupo de trabalho de uma sociedade chamada *International Society for Human and Animal Mycology* (ISHAM). Este

banco é composto por 2.800 sequências com qualidade controlada, abrangendo 421 espécies fúngicas que são patogênicas para humanos ou animais, com acesso público pelos endereços <http://its.mycologylab.org/> e <http://www.isham.org/> (IRINYI *et al.*, 2015).

A identificação molecular de fungos tem grande importância e diferentes objetivos, como a ampliação do conhecimento da biodiversidade fúngica, do papel ecológico dos fungos, bem como sua distribuição geográfica. E essa gama de conhecimento pode ter papel fundamental na aceleração da bioprospecção e de outros campos de pesquisa aplicada (BEGEROW *et al.*, 2010).

#### 1.1.3.2 *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)*

*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)* é um método rápido de caracterização e identificação microbiana que gera impressões digitais de espectros de massa característicos e únicos para cada micro-organismo, sendo então ideais para uma identificação precisa a nível de gênero e espécie, podendo ser usada até mesmo para tipagem molecular de cepas (CHALUPOVÁ *et al.*, 2013, CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

MALDI-TOF MS é uma ferramenta que consiste na aplicação de espectrometria de massa. O material biológico é colocado em uma placa contendo uma matriz, que sofre a ação de um laser, vaporizando a amostra, o que leva à ionização de várias moléculas. Essas moléculas são levadas a um detector através de um tubo de vácuo. O tempo de chegada ao detector varia de acordo com o tamanho da molécula, gerando um espectro com picos diferentes, possibilitando a identificação por meio de interpretação em um banco de dados (PASTERNAK, 2012).

Recentemente, tecnologias novas e altamente padronizadas, utilizadas no diagnóstico de doenças e identificação dos micro-organismos a elas relacionados, têm sido utilizadas em laboratórios clínicos. MALDI-TOF MS tem sido reconhecido como uma importante ferramenta na identificação de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BIZZINI; GREUB, 2010; LIMA-NETO *et al.*, 2014; MARKLEIN, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014; POSTERARO, 2012).

MALDI-TOF MS tem emergido como uma ferramenta simples, robusta e confiável na identificação de várias espécies de leveduras, além disso apresenta uma redução expressiva no tempo de liberação de resultados e baixo custo por análise, sendo muito vantajoso na prática clínica (ALMEIDA JUNIOR *et al.*, 2013; BUCHAN; LEDEBOER, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014). Vários trabalhos apontam que MALDI-TOF fornece alta reprodutibilidade e especificidade na identificação de diferentes micro-organismos, sendo mais uma vantagem de seu uso (CHALUPOVÁ *et al.*, 2013; MCTAGGART *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2014).

Essa técnica determina padrões de espectros proteicos e peptídicos de células ou extratos celulares provenientes de culturas puras ou amostras biológicas, levando à identificação de espécies por meio da comparação do espectro obtido com aqueles contidos na biblioteca de espectros de referência (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012).

Diante disso, essa técnica vem sendo considerada como mais uma opção para a caracterização de micro-organismos dentro da abordagem polifásica. Alguns estudos demonstram que os resultados obtidos pela análise por MALDI-TOF MS apresentam alta concordância com os dados gerados pela abordagem molecular (LIMA-NETO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014).

Para a identificação do gênero *Cryptococcus*, o método tem se apresentado eficiente, rápido e preciso, com potencial para diferenciar não somente as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, como também distinguir *C. neoformans* em nível de subespécie (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2012; MCTAGGART *et al.* 2011; POSTERARO *et al.*, 2012; WESTBLADE *et al.*, 2013).

O método MALDI-TOF MS também tem apresentado resultados promissores na identificação rápida e confiável de cepas de *Candida* spp. na prática clínica, além do melhor custo-benefício quando comparado a outras técnicas empregadas (BUCHAN; LEDEBOER, 2013; LIMA-NETO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2011; YAMAN; AKYAR; CAN, 2012).

## **1.2 Cryptococcus neoformans E Cryptococcus gattii**

O gênero *Cryptococcus* é composto por 70 espécies na forma anamórfica, algumas dessas com a forma teleomórfica conhecida. Até 2011, eram distribuídas nos diferentes gêneros *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium* e *Kwoniella*,

que integram a família Tremellaceae, na ordem Tremellales, na classe dos Tremellomycetes, no subfilo Ágaricomycotina, no Filo Basidiomycota, no reino Fungi (FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011). No entanto, com o reconhecimento do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, substituindo o Código Internacional de Nomenclatura de Botânica, não há mais o sistema de nomes para a forma teleomórfica diferindo da anamórfica, já que foi adotado o princípio “um fungo, um nome”.

A espécie *Cryptococcus neoformans* foi descrita na década de 70 por Kwon-Chung, apresentando duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*, com base em diferenças fenotípicas, bioquímicas, sorológicas, ecológicas e epidemiológicas (KWON-CHUNG, 1976; KWON-CHUNG *et al.*, 1978). Em revisão filogenética posterior, observou-se que a variedade *gattii* constitui grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans*, constituindo espécie distinta denominada *Cryptococcus gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

A criptococose é uma micose de natureza sistêmica, causada por propágulos dispersos no ar, da forma encapsulada de *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992), coloca-se entre as infecções fúngicas humanas de maior letalidade, principalmente sob forma de meningoencefalite, considerada como uma importante infecção oportunista. Nos casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é a terceira em frequência. Apresenta-se como duas entidades distintas do ponto de vista clínico e epidemiológico: criptococose oportunística, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *C. neoformans*, e criptococose primária, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, atingindo indivíduos imunocompetentes, causada predominantemente por *C. gattii* (CASADEVAL; PERFECT, 1998).

A doença afeta mais de um milhão de pessoas no mundo por ano, com aproximadamente 625 mil óbitos. Cogliati (2013) demonstrou que 53% das cepas clínicas e ambientais de *C. gattii* e *C. neoformans* isoladas na América do Sul e Central foram provenientes do Brasil. Este é o quarto país no mundo com o maior número de isolamentos desses agentes etiológicos, sucedendo a África do Sul, a China e os EUA (COGLIATI, 2013).

No que diz respeito à internação, tem sido descrita como a micose sistêmica mais prevalente. De acordo com os Dados do Sistema de Internação Hospitalar do



Sistema Único de Saúde, em 2000 foram relatados 189 casos de internação, chegando a 702 casos em 2007, sendo a região sudeste a que apresenta o maior número de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Atualmente, as duas espécies descritas como agentes da criptococose constituem dois diferentes complexos designados “complexo *C. neoformans*” e “complexo *C. gattii*” (KWON-CHUNG *et al.*, 2017). Tipos moleculares específicos são descritos para *C. neoformans*, denominados VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D) e para *C. gattii*, denominados VGI, VGII, VGIII e VGIV, sorotipos B e C (MEYER *et al.*, 2003). A disponibilidade dessas espécies como MRC, auxiliará no diagnóstico da criptococose, além de contribuir de forma relevante para a comunidade acadêmica e para os avanços tecnológicos do complexo econômico-industrial da saúde.

### 1.3 *Candida albicans*

O gênero *Candida* é classificado taxonomicamente no reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Cryptococcaceae, e é composto por um grupo de organismos heterogêneos. De acordo com dados recentes do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), mais de 20 espécies de *Candida* spp. são conhecidas como agentes etiológicos de infecções humanas (LACHANCE *et al.*, 2011; MYCOBANK DATABASE, 2018).

As espécies de *Candida* fazem parte naturalmente da mucosa oral, do trato gastrointestinal e vagina de indivíduos saudáveis, mas podem causar infecções sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos devido a sua grande capacidade de adaptação a diferentes nichos. *C. albicans* é a espécie de levedura mais patogênica e tem sido a mais comum em infecções sistêmicas e superficiais. Outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* também apresentam grande relevância nos casos de doenças em humanos (MORAN; COLEMAN; SULLIVAN, 2012; SARDI *et al.*, 2013).

*Candida dubliniensis* é a espécie que apresenta maior similaridade em relação às características fenotípicas com *C. albicans*, como a capacidade de produzir hifas e clamidosporos. Há grande dificuldade de diferenciação entre essas duas espécies em amostras clínicas, o primeiro isolado de *C. dubliniensis* foi

identificado através da técnica de DNA *fingerprinting* em um estudo epidemiológico (MORAN; COLEMAN; SULLIVAN, 2012, SULLIVAN *et al.*, 1995).

Além da importância clínica, *C. albicans* é uma levedura citada em diversas farmacopeias e compêndios oficiais para controle de qualidade de meios de cultura e, portanto, largamente utilizada nestes ensaios de controle de qualidade (THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2013).

Na Farmacopeia Brasileira (2010), *C. albicans* tem sua utilização preconizada nos ensaios microbiológicos para produtos estéreis e não estéreis, nos testes de eficácia antimicrobiana que abrangem o doseamento de Ciclopirox Olamina e os testes de segurança biológica de Ciclopirox olamina solução tópica. Desde 2010, tem sido exigido o uso desta levedura na avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes de nível intermediário e alto nível (BRASIL, 2010).

A produção nacional dessa cepa como MRC facilitará o acesso dos laboratórios de controle de qualidade a esse material, diminuindo nossa dependência por cepas disponíveis em coleções de culturas internacionais e reduzindo o alto custo que esse processo apresenta.

#### 1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

O gênero *Saccharomyces* é composto por oito espécies, *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus* e é pertencente à família Saccharomycetaceae, ordem Saccharomycetales, classe Saccharomycetes, subfilo Sacharomycotina e ao filo Ascomycota (MUIR; HARRISON; WHEALS, 2011; NAUMOV *et al.*, 2000; VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011; MYCOBANK DATABASE, 2018).

*S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. pastorianus* são importantes espécies fermentadoras de açúcar e estão muito associadas à fabricação de cervejas, vinhos e processos de panificação. A cepa tipo de *S. pastorianus* apresenta grande similaridade na região D1/D2 quando comparada a *S. bayanus*. Com relação a *S. cerevisiae* as características mais próximas são dadas pelo perfil fisiológico (MUIR; HARRISON; WHEALS, 2011; RAINIER *et al.*, 2006).

*S. cerevisiae* é um fungo citado em diversas farmacopeias e compêndios oficiais para testes de potência microbiológica de antibióticos, apresentando,

portanto, grande importância e aplicabilidade para os ensaios de controle de qualidade desses produtos (THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 2013).

Na Farmacopeia Brasileira (2010), *S. cerevisiae* é preconizado para os ensaios microbiológicos de avaliação da atividade de antibióticos, como Anfotericina B, Nistatina e Candicidina.

Diante disso, possuir esta cepa como MRC, disponível nacionalmente para estas atividades, aumenta a independência do uso de cepas importadas, uma vez que a utilização é bem ampla e vem cada vez mais sendo exigida por organismos competentes.

### **1.5 Centro de recursos biológicos**

É importante assegurar que a diversidade microbiana seja preservada e utilizada a fim de se obter avanço da biotecnologia, progresso na ciência e, conseqüentemente, garantir benefícios para a saúde humana. Entretanto a acessibilidade a micro-organismos alvos nas pesquisas muitas vezes é incerta, o que reforça a grande importância do depósito de micro-organismos em coleções de culturas definidas como Centro de Recursos Biológicos (CRB) (JANSSENS *et al.*, 2010; OECD, 2001).

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD do inglês *Organization for Economic Co-operation Development*) define CRB como “centros provedores de serviços e repositórios de células vivas, genomas, e informação associada, ofertando material biológico autenticado para a comunidade científica e indústria” (OECD, 2007). Ou seja, CRB são considerados elementos-chave para a sustentação da infraestrutura científica, que é necessária para a utilização dos benefícios da biotecnologia, atuando como um alicerce para esta área (OECD, 2001; INMETRO, 2012).

Os CRB são constituídos por acervos de organismos cultiváveis, partes replicáveis de organismos cultiváveis, organismos viáveis, mas não cultiváveis, células e tecidos, assim como banco de dados contendo informações moleculares, fisiológicas e estruturais relevantes para essas coleções e a bioinformática associada (OECD, 2007; INMETRO, 2012).

O documento “*OECD Best Practice Guidelines for BRCs*” (Diretrizes de Boas Práticas para Centro de Recursos Biológicos) (OECD, 2007), utilizado por muitas coleções de cultura que objetivam alcançar os padrões definidos para os CRB, foi baseado nas diretrizes delineadas nos guias da *World Federation for Culture Collections* (WFCC) e que serviram como primeiro passo para sua elaboração.

O “*Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms*” (Guias para o estabelecimento e funcionamento de Coleções de Culturas de Micro-organismos) da WFCC, que teve 3 edições, a primeira em 1990, a segunda em 1999 (WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS, 1999) e a terceira e última em 2010 (WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS, 2010), tem como objetivo orientar as atividades de uma coleção de cultura e fornecer diretrizes básicas de gestão da qualidade para estas coleções.

Aproximadamente 770 coleções de cultura estão registradas na *World Data Center for Microorganisms* (WDCM), de 76 países diferentes, totalizando cerca de três milhões de cepas de micro-organismos, principalmente bactérias e fungos (mais de dois milhões). Dentre essas coleções, 103 estão associadas à WFCC e atuam conforme recomendado pelos guias dessa federação mundial (SMITH; MCCLUSKEY; STACKEBRANDT, 2014). Atualmente há 82 coleções de culturas brasileiras registradas na WDCM, das quais 18 são as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS, 2018).

O depósito de um material biológico num CRB pode contribuir para a ciência, gerando grande impacto no conhecimento, uma vez que os CRB, além de serem centros de autenticação e preservação do material depositado, fornecem material microbiológico com conformidade legal e qualidade garantida (OECD, 2001; JANSSENS *et al.*, 2010). O crescimento da demanda mundial por recursos biológicos resulta no aumento do número e da qualidade de CRB (JANSSENS *et al.*, 2010).

Entretanto, o depósito de muitas cepas microbianas ainda não é viável devido ao alto custo e ao atual baixo financiamento público. Sendo assim, o recomendado é que se tenha um conjunto de critérios de seleção por parte dos depositantes para priorizar o material a ser depositado. Ressalta-se a importância de coleções públicas ao se considerar dados que mostram a quantidade de cepas representativas de diferentes espécies descritas depositadas nos acervos. Além disso, esses

repositórios apresentam ambiente propício para a manutenção em longo prazo e contam com curadores que tem *expertise* em identificação, regulamentação e questões ligadas à biossegurança. Essas questões podem não ser asseguradas em outros tipos de repositórios, uma vez que as coleções públicas têm décadas de experiência em manipulação, armazenamento e transporte adequado de um universo diverso de material biológico (STACKEBRANDT *et al.*, 2014).

A identificação, preservação ideal, armazenamento estável e o fornecimento de cepas viáveis são contribuições cruciais de uma coleção de culturas para a bioeconomia. Adicionalmente, estas coleções assumem um papel importante na autenticação, evitando erros frequentes de identificação de micro-organismos, principalmente no caso dos fungos, em que são comuns erros de identificação pela comunidade científica. Além disso, as áreas de atuação do CRB podem ser a saúde, agricultura, indústria, ambiente e biotecnologia (SIMÕES *et al.*, 2013; SMITH; MCCLUSKEY; STACKEBRANDT, 2014).

A OECD foi responsável por constituir uma infraestrutura virtual chamada Rede Global de Centro de Recursos Biológicos (GBRCN do inglês *Global Biological Resource Centers Network*) que recomenda a implementação de políticas para assegurar que o material biológico de alta qualidade seja disponibilizado para pesquisa e desenvolvimento em todo o mundo e que trate da questão do acesso seguro e legal deste material. Cinco pontos principais de ação foram formulados: 1) estabelecer CRB nacionais; 2) desenvolver um sistema de acreditação para CRB com base em critérios internacionais; 3) criar conexões internacionais entre os CRB; 4) coordenar normas, regras e regulamentos no contexto dos CRB; 5) estabelecer uma rede global de CRB. Essa Rede teve início por meio de um projeto demonstrativo de 2008 a 2011, que teve a coordenação e secretaria financiada pelo Ministério Federal Alemão de Ciência e Educação (BMBF) e que teve a participação ativa de 15 parceiros de todos os continentes (FRITZE; MARTIN; SMITH, 2012).

O Brasil juntamente com Portugal, Espanha, China e Quênia foram países que participaram ativamente desse projeto. Os parceiros brasileiros, que fazem parte da Rede Brasileira de Centro de Recursos Biológicos (Rede CRB-Brasil), incluindo a Fiocruz, organizaram e financiaram um seminário de pré-projeto em 2008 e um outro seminário em novembro de 2009. A reunião teve como objetivo promover a qualidade e capacitação de CRB, bem como a implementação das diretrizes de

Boas Práticas da OECD, contando com uma representação expressiva do governo brasileiro e órgãos reguladores (FRITZE; MARTIN; SMITH, 2012).

O governo brasileiro iniciou o desenvolvimento de uma política visando a estruturação de coleções de cultura como CRB, com reconhecimento internacional e atuação dentro de uma rede em cumprimento ao Decreto 6.041, de 08/02/2007 (VOSS, 2008).

O esforço brasileiro para melhorar a gestão da qualidade em coleções de serviço é um passo na consolidação da Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos. Os avanços alcançados nesse sentido são uma consequência de várias iniciativas envolvendo instituições brasileiras (HOLANDA *et al.*, 2012).

O Brasil é o único país, até o momento, que tem desenvolvido padrões para acreditação de CRB. Em dezembro de 2012, foi publicada a norma padrão brasileira NIT-DICLA-061, que estabelece requisitos para a acreditação das atividades de ensaio e produção de materiais de referência executadas por CRB, tendo como referência as Diretrizes da OECD de Boas Práticas para Centro de Recursos Biológicos, as provisões da norma ABNT NBR ISO/IEC17025:2005 e do guia ABNT ISO Guia 34, atualmente substituída pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 (ABNT, 2012<sup>a</sup>, 2017; FORTI *et al.*, 2016; INMETRO, 2012; MARTINS; LIMA; SAMPAIO, 2014).

Recentemente, um grupo de auditores avaliou a Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) da Fiocruz, como CRB e como produtor de MRC, aplicando os requisitos da NIT-DICLA-061, sendo esta a primeira vez que tal norma foi utilizada durante auditoria de uma coleção de culturas. A avaliação gerou uma proposta de adequação da coleção para que futuramente seja solicitada à Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre) do Inmetro a acreditação como CRB e produtor de MRC (FORTI *et al.*, 2016). Além disso, avaliando os resultados obtidos nesta auditoria, observou-se que ao cumprir com as determinações dos itens não atendidos e ao complementar aqueles atendidos parcialmente, o Setor de Fungos do INCQS ficará apto a integrar o CRB-Saúde Fiocruz (FORTI, 2013).

De acordo com a NIT-DICLA-061, as coleções de cultura de organismos cultiváveis, nas quais estão incluídos os fungos, devem atender aos elevados padrões de qualidade e especialização exigidos pela comunidade internacional de cientistas e indústria para o fornecimento de materiais biológicos (OECD, 2001; INMETRO, 2012).

## 1.6 Justificativa

A produção de MRC biológico é uma ação estratégica de impacto para a saúde pública no Brasil, seja nas questões de controle da qualidade de produtos como também no controle da qualidade de procedimentos laboratoriais usados na área de análises clínicas, cujas exigências por MRC têm sido cada vez maiores por parte dos órgãos fiscalizadores.

Os MRC de *C. neoformans* e *C. gattii* poderão ser fornecidos para o controle da qualidade dos meios de cultura utilizados no diagnóstico da criptococose realizado pela Rede de Laboratórios de Referência Nacional em Micose Sistêmica (LRNMS), coordenada pelo Laboratório de Micologia/Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) que faz parte da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica sob Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, e que possui sua base fortemente apoiada na Rede de Laboratórios Centrais de Saúde pública (LACENs), que tem como atribuições, além da realização de exames de média e alta complexidade, capacitação, supervisão e avaliação da qualidade técnica dos exames produzidos na Rede Estadual de Laboratórios.

*C. albicans* e *S. cerevisiae* estabelecidos como MRC serão aplicados em laboratórios de controle de qualidade de produtos, possibilitando o fornecimento para os Laboratórios do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), para os LACENs e para as instituições públicas e privadas que realizem ensaios de controle da qualidade de produtos em microbiologia, contribuindo para o avanço do processo de produção de MRC na área biológica.

Este trabalho está vinculado a um projeto institucional, que contempla à produção de MRC por coleções microbiológicas da Fiocruz que farão parte do futuro Centro de Recursos Biológicos em Saúde da Fiocruz (CRB-Saúde Fiocruz), que iniciará a área temática da Saúde na Rede CRB-Brasil. Adicionalmente, o presente estudo tem como base documental os resultados do trabalho desenvolvido por Forti *et al.* (2016), que também faz parte deste projeto institucional.

Assim o estudo contribuirá de forma relevante para a comunidade acadêmica, para o desenvolvimento e inovação tecnológica na área da produção industrial brasileira e para a saúde pública, tanto no âmbito da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica, uma vez que não existe no Brasil material de

referência microbiológico, como também para a área de Vigilância Sanitária, já que a produção de MRC favorecerá o aprimoramento da qualidade de produtos. Além de possibilitar a aplicação direta dos MRC no controle de qualidade dos mesmos, quando serão obtidos resultados muito mais acurados, contribuindo definitivamente para a prevenção, diminuição ou eliminação dos riscos à saúde aos quais a população possa estar exposta (BRASIL, 1990).



## 2 OBJETIVO GERAL

Diante da importância da utilização de MRC e a fim de auxiliar no avanço do processo de estabelecimento de MRC na área microbiológica, o objetivo geral desse trabalho é desenvolver metodologia, seguindo os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017 e as orientações dos guias ABNT ISO Guia 31 e ABNT ISO Guia 35, para a produção de quatro leveduras como MRC, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.1 Objetivos específicos

- Selecionar as cepas que serão estabelecidas como MRC;
- Elaborar o planejamento para produção dos MRCs;
- Desenvolver metodologia para a produção de *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* como MRC;
- Avaliar a homogeneidade e a estabilidade dos materiais produzidos por meio de ferramentas estatísticas recomendadas pelo guia ABNT ISO Guia 35:2012;
- Caracterizar os materiais, de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017, abordando a análise quantitativa e qualitativa;
- Eleger a técnica mais rápida e eficiente para caracterização taxonômica das diferentes espécies estudadas, por meio da avaliação de metodologias de identificação dessas leveduras;
- Certificar os valores de propriedade atribuídos aos materiais produzidos, assim como suas incertezas associadas, através de estudos estatísticos, seguindo as orientações do guia ABNT ISO Guia 35:2012;
- Contribuir na elucidação do melhor marcador para o código de barra (*Barcode*) de DNA das diferentes espécies do estudo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Fungos

##### 3.1.1 Cepas utilizadas no estabelecimento de MRC

Para o estabelecimento dos MRC foram selecionadas uma cepa de *C. neoformans* e uma cepa de *C. gattii*, dentro de um universo de 960 cepas ambientais e clínicas, todas provenientes do território brasileiro, depositadas na Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) e na Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) da Fiocruz. Além disso, foram selecionadas outras duas cepas, uma de *C. albicans* e outra de *S. cerevisiae*, dentre as 19 cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) referentes a *C. albicans* e 12 referentes a *S. cerevisiae* depositadas na CFRVS/Fiocruz.

##### 3.1.2 Cepas para aplicação dos diferentes métodos de identificação

Para testar os diferentes métodos de identificação das espécies estudadas nesse trabalho, foram utilizadas cepas oriundas da ATCC e do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS-KNAW Collections) depositadas na CFRVS/ Fiocruz perfazendo um total de quatro cepas de *C. neoformans*, duas de *C. gattii*, sete de *Filobasidiella neoformans* (*C. neoformans*, na classificação taxonômica atual), quatro de *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (*C. neoformans*, na classificação taxonômica atual), três de *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (*C. gattii*, na classificação taxonômica atual), uma de *Cryptococcus podzolicus*, uma de *Cryptococcus humicola*, uma de *Cryptococcus laurentii*, uma de *Cryptococcus albidus*, cinco de *S. cerevisiae*, uma de *S. pastorianus*, uma de *S. bayanus*, uma de *S. uvarum*, 15 de *C. albicans* e uma de *C. dubliniensis* (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Cepas pertencentes a diferentes grupos taxonômicos utilizadas para testar os métodos de identificação aplicados no presente estudo

Fungo	Nº de acesso CFRVS	Origem	Isolamento
<i>Cryptococcus laurentii</i>	CFRVS 40043	ATCC 44096	Ambiental
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40044	ATCC 32045	Ambiental
<i>Cryptococcus albidus</i>	CFRVS 40077	ATCC 10666	Ambiental
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 40113	ATCC 32269	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. B	CFRVS 40122	ATCC 24065	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40123	ATCC 28957	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40124	ATCC 34868	Ambiental
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 40141	ATCC 56990	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40142	ATCC 28958	Ambiental
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. C	CFRVS 40143	ATCC 24066	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. AD	CFRVS 40150	ATCC 48184	Ambiental
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. C	CFRVS 40166	ATCC 32608	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. A	CFRVS 40168	ATCC 34872	Clínica
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. D	CFRVS 40192	ATCC 32719	Não disponível
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CFRVS 40193	ATCC 52817	Não disponível
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CFRVS 40215	CBS 6901	Não disponível
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40218	CBS 7000	Ambiental
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40221	ATCC 66031	Não disponível
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	CFRVS 40232	CBS 7717	Ambiental
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40282	ATCC 90112	Clínica
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40283	ATCC 90113	Clínica
<i>Cryptococcus humicola</i>	CFRVS 40292	ATCC 64676	Não disponível

CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária; ATCC - *American Type Culture Collection*; CBS - *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*; sor. - sorotipo; var. – variedade

Tabela 1 (continuação) - Cepas pertencentes a diferentes grupos taxanômicos e utilizadas para testar os métodos de identificação aplicados no presente estudo

	Fungo	Nº de acesso CFRVS	Origem	Isolamento	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40006	ATCC 10231	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40040	ATCC 11006	Não disponível	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40041	ATCC 36232	Não disponível	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40070	ATCC 2091	Não disponível	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40071	ATCC 18804	Clínica	
	<i>Candida albicans</i> sor. A	CFRVS 40119	ATCC 36801	Clínica	
Candida spp.	<i>Candida albicans</i> sor. B	CFRVS 40120	ATCC 36802	Clínica	
	<i>Candida dubliniensis</i>	CFRVS 40172	ATCC MYA-646	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40175	ATCC 14053	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40176	ATCC 26790	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40177	ATCC 44858	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40178	ATCC 60193	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40179	ATCC 64124	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40260	ATCC 24433	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40277	ATCC 90028	Clínica	
	<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40278	ATCC 90029	Clínica	
	Saccharomyces spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40001	ATCC 2601	Não disponível
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40002	ATCC 9763	Ambiental
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40003	ATCC 9080	Não disponível
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		CFRVS 40083	ATCC 4124	Ambiental	
<i>Saccharomyces uvarum</i>		CFRVS 40088	ATCC 32634	Ambiental	
<i>Saccharomyces pastorianus</i>		CFRVS 40090	ATCC 2366	Ambiental	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		CFRVS 40125	ATCC 36375	Ambiental	
<i>Saccharomyces bayanus</i>		CFRVS 40235	CBS 679	Ambiental	

Fonte: SOUTO, 2014.

Legenda: CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária; ATCC - *American Type Culture Collection*; CBS - *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*; sor. - sorotipo; var. – variedade.

## 3.2 Produção dos MRC

### 3.2.1 Planejamento da produção de Materiais de Referência Certificados

De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17034 (ABNT, 2017), a primeira etapa para o estabelecimento de um material de referência é o planejamento dos processos que possam interferir na qualidade da produção desses materiais. Portanto antes do início do estudo foi redigido um documento referente a esse planejamento, que deve conter: a definição de condições de armazenamento; seleção do material; manutenção dos ambientes adequados para todos os aspectos de produção; processamento do material; medição/ensaio; verificação e calibração de equipamentos; avaliação da homogeneidade do material; avaliação da estabilidade do material; atribuição de valores de propriedade com base nos resultados de medição; estabelecimento do balanço de incerteza e estimativa de incertezas dos valores de propriedade atribuídos; estabelecimento da rastreabilidade metrológica dos resultados de medição; emissão de certificados; garantia de instalações e condições de armazenamento adequadas; garantia de rotulagem e embalagem apropriadas; garantia de transportes apropriados.

### 3.2.2 Armazenamento do lote estoque para trabalho

As cepas utilizadas no desenvolvimento da metodologia e estabelecimento dos MRC foram armazenadas por meio de preservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em nitrogênio líquido. Para isso, após a seleção das cepas e confirmação da pureza, foi feito um repique a partir do cultivo em um tubo de ensaio contendo ágar extrato de levedura-extrato de malte (YMA) e o tubo foi incubado a  $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 48 h. Após esse tempo, 4 mL de solução de glicerol a 15% foram adicionados ao cultivo, formando uma biomassa fúngica suspensa na solução crioprotetora. Aproximadamente 0,5 mL dessa suspensão foi distribuída nos criotubos.

Os criotubos foram mantidos em refrigerador a  $(4 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 30 min, posteriormente foram transferidos para congelador a  $(-20 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$  por cerca de 20 min, para então serem transferidos para o ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No caso do estoque preservado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , os tubos permaneceram no

*ultrafreezer* por aproximadamente 90 min para depois serem estocados no container de nitrogênio líquido (DAY; STACEY, 2007, SMITH; ONIONS, 1983).

Para a produção do lote estoque do material, testes de viabilidade e pureza (TVP) foram realizados no momento do congelamento (TVP-pré) e após 7 dias do congelamento das cepas (TVP-pós).

Todos os dados referentes ao congelamento e aos testes de viabilidade e pureza foram registrados no Formulário para Produção de Fungos-Congelamento (POP INCQS 65.3230.035), uma vez que todas as etapas devem ser rastreáveis durante um processo de produção de MRC.

Para as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, além dos repiques em placas contendo YMA, foram feitos repiques em ágar Niger com cloranfenicol, a fim de verificar a pureza das cepas. A partir do crescimento nesse meio, dez colônias foram selecionadas e inoculadas em tubos contendo ágar YMA inclinado. Os tubos foram incubados a  $(25 \pm 2)$  °C por aproximadamente 48 h. Após o período de incubação, estas culturas foram transferidas para outros tubos contendo ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), já que este é um meio específico para diferenciar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. gattii* é naturalmente resistente à L-canavanina, metabolizando-a a produtos não tóxicos, sendo então capaz de crescer no meio de CGB, onde a glicina é utilizada como única fonte de carbono e nitrogênio, produzindo amônia, elevando o pH e alterando a cor do indicador, azul de bromotimol, para azul-cobalto ou azul-esverdeado forte. Originalmente, o pH do meio é 5,8 e sua cor, amarelo-esverdeado. Entretanto, a grande maioria das cepas *C. neoformans* são inibidas pela L-canavanina e não crescem e nem utilizam a glicina no meio de CGB, portanto, não alteram o pH, mantendo a cor original do meio (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). Então, após a confirmação da pureza das cepas, estas foram submetidas à preservação.

No caso das cepas de *Candida* spp., além do cultivo em YMA, foram feitos repiques em meio Chromagar, que é um meio cromogênico para o isolamento e identificação de *C. albicans*.

### 3.2.2.1 Teste de viabilidade e pureza pré fase de preservação (TVP-pré)

A fim de verificar a pureza, uma gota da suspensão a ser preservada foi inoculada pelo método de esgotamento em uma placa de Petri contendo YMA. A placa foi incubada por cerca de 72 h a  $(25 \pm 2)$  °C.

Para verificar a viabilidade, 0,1 mL da suspensão foi transferida para um tubo contendo 9,9 mL de água purificada estéril (solução 1:100) e, a partir desta suspensão, diluições seriadas foram preparadas até  $10^{-6}$ .

Alíquotas de 0,1 mL das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  foram inoculadas em uma placa de Petri referente a cada diluição pelo método *spread plate* e em três placas para a diluição  $10^{-6}$ , totalizando então cinco placas que foram incubadas a  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 48 h para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

### 3.2.2.2 Teste de viabilidade e pureza pós fase de preservação (TVP-pós)

Após sete dias decorridos da produção do lote estoque, um criotubo foi escolhido aleatoriamente para verificação da pureza e da viabilidade. O teste de pureza foi realizado conforme descrito no TVP- pré. A análise da viabilidade também é semelhante ao descrito anteriormente, havendo diferença nas diluições que foram inoculadas nas placas de Petri, que no caso do TVP-pós foram testadas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  em uma placa e  $10^{-5}$  em cada uma de três placas contendo YMA.

As placas foram incubadas a  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 48 h para posterior contagem de UFC/mL. Após o processo de preservação poderia ocorrer uma diminuição de 1 a 2 log no número de UFC/mL quando comparado ao número obtido anteriormente na viabilidade do TVP-pré (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

### 3.2.3 Definição do quantitativo de unidades formadoras de colônias

Esta foi a primeira etapa para a produção do lote de MRC, para a qual, por meio de adaptações do método desenvolvido por Rosas *et al.* (2010), foi estabelecida a metodologia com o objetivo de alcançar uma recuperação de até 100 UFC por alíquota de 0,1 mL após o processo de liofilização dos materiais.

Um criotubo do lote estoque foi retirado do congelamento a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  e mantido a temperatura ambiente por 30 min. Após esse tempo, uma alíquota de  $100\text{ }\mu\text{L}$  da cultura estoque foi inoculada em  $9,9\text{ mL}$  de Caldo extrato de levedura-extrato de malte (YMB). O tubo foi homogeneizado e incubado a  $(25 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$  por cerca de 48 h. A partir do crescimento, alíquotas de  $1\text{ mL}$  foram transferidas para seis microtubos estéreis com capacidade de  $1,5\text{ mL}$  e centrifugadas a  $12.204\text{ x g}$  durante 5 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, os sobrenadantes de todos os microtubos foram descartados. Os sedimentos foram ressuspensos com  $1\text{ mL}$  de água purificada estéril, para cada dois microtubos, a fim de retirar resíduos do meio de cultivo e concentrar as células, totalizando 3 microtubos. O procedimento de centrifugação foi repetido e os sedimentos de cada tubo novamente foram ressuspensos com  $1\text{ mL}$  de água purificada estéril, obtendo um total de  $3\text{ mL}$  da cultura (ROSAS *et al.*, 2010).

As leituras da turvação da cultura foram realizadas em um turbidímetro, e a cultura foi diluída com água purificada para se obter as escalas de turvação determinadas neste estudo. Os experimentos desta etapa foram iniciados baseando-se numa concentração de células em torno de  $5 \times 10^6\text{ UFC/mL}$ . A partir dessa concentração, então, uma diluição em leite desnatado a 20% (Skim Milk, DIFCO) foi feita para se obter uma concentração próxima a  $10^4\text{ UFC/mL}$ . Como é comum que se tenha um declínio de duas casas logarítmicas após a liofilização de leveduras, o resultado final deve ser de até  $100\text{ UFC}/0,1\text{ mL}$ , conforme desejado.

#### 3.2.4 Produção dos lotes de *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* como MRC

Após a seleção das cepas e da definição do quantitativo de UFC, foram produzidos os lotes de MRC, cada um contendo 200 unidades. O método foi realizado a partir de adaptações da metodologia descrita por Rosas *et al.* (2010).

O preparo da suspensão foi realizado conforme descrito no item 3.2.3, porém com as questões de turvação e diluições elucidadas. Em um frasco erlenmeyer estéril, essa suspensão foi preparada numa dada proporção em leite desnatado estéril a 20%. A suspensão a ser liofilizada foi mantida em agitação em um banho de gelo durante todo o envase.

Antes de proceder ao envase, foi realizado um teste para verificar a pureza e a viabilidade da suspensão antes da liofilização. A partir da suspensão após



agitação, foram transferidas alíquotas de 0,5 mL para 200 frascos de vidro estéreis com capacidade de 1,5 mL dispostos em estantes próprias do liofilizador, com o auxílio de uma bomba peristáltica. A ordem dos frascos na estante foi controlada, numerando do primeiro ao último frasco envasado.

Após o envase, tampas de borracha estéreis foram encaixadas nos frascos de modo que ficassem entreabertas e as estantes foram colocadas em recipientes com tampa e armazenadas em *ultrafreezer* entre  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $(24 \pm 2)$  h.

Após esse tempo, as estantes contendo os frascos foram retiradas do *freezer* e posicionadas em aparelho liofilizador, onde o material foi submetido a um ciclo de liofilização de no mínimo 24 h. Ao completar o ciclo de liofilização, os frascos foram fechados sob condições de vácuo, através da utilização do sistema de vedação manual acoplado ao aparelho.

Após o fechamento dos frascos, foi verificado o vácuo utilizando pistola de descarga elétrica, em local com pouca luz. Os frascos com vácuo foram então lacrados com tampas de metal, com o auxílio de uma recravadeira, e rotulados de forma que ficasse registrado o nome da cepa, o número de registro na CFRVS, o número do lote e a ordem de envase, já que este último dado é importante para a realização do estudo de homogeneidade do lote.

Os frascos foram armazenados em *ultrafreezer* a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , exceto os frascos que foram utilizados nos estudos de homogeneidade, estabilidade em longo prazo e estabilidade em curto prazo. Estes frascos foram armazenados em *freezer* a  $(-20 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ , já que essa será a temperatura de referência, uma vez que reproduz a realidade da maioria dos laboratórios que poderiam receber o material.

Para este procedimento foi elaborado um Formulário de Produção de Material de Referência Certificado, em que todos os equipamentos e materiais tiveram seus números de identificação registrados, bem como os lotes dos insumos, auxiliando no processo metrológico.

Aos MRCs foram atribuídos valores de propriedade que devem ser bem definidos (ABNT, 2017), sendo assim para os MRC propostos nesse trabalho, dois valores de propriedade foram atribuídos, um quantitativo, que compreende a quantidade de UFC por 0,1 mL após a liofilização, e outro qualitativo, que abrange a identidade do micro-organismo. Esses valores de propriedade foram avaliados durante os testes de caracterização dos lotes produzidos (ABNT, 2017).

### 3.2.5 Teste de controle da viabilidade

Após a retirada do material do liofilizador, no mesmo dia, foi realizado um teste para controlar a viabilidade. O teste foi realizado em triplicata, no qual os frascos utilizados foram selecionados por amostragem aleatória estratificada e serviu como um controle para os estudos de estabilidade em longo prazo.

Os frascos foram abertos e o líofilo hidratado com aproximadamente 0,6 mL de água purificada utilizando micropipeta, o conteúdo do frasco foi homogeneizado suavemente e permaneceu em repouso por cerca de 30 min aproximadamente ( $25 \pm 2$ ) °C. Após esse tempo, a suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos e alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em cinco placas de Petri contendo o meio de cultura indicado para cada espécie, o inóculo foi espalhado por toda superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Uma gota da suspensão foi inoculada em outra placa de Petri contendo o meio indicado para verificar a pureza de cada espécie, através de estrias na superfície do meio com o auxílio de uma alça de níquel-cromo. As placas foram incubadas a ( $25 \pm 2$ ) °C por 36 a 48 h. Após o período de incubação, foi verificada a pureza e realizada a contagem de UFC. Em todos os testes referentes aos MRC, sempre foram avaliadas as cinco alíquotas totais contidas nos frascos, uma vez que o objetivo era garantir que em cada uma delas fossem recuperadas até 100 UFC do micro-organismo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

### 3.2.6 Estudo da homogeneidade

Essa é a primeira avaliação que deve ser realizada durante o estabelecimento de um MRC, sendo que o número mínimo de frascos selecionados aleatoriamente deve incluir entre 10 a 30 unidades, porém, não se recomenda que seja menor que 10 (ABNT, 2012b). Sendo assim, dez frascos dos lotes anteriormente preparados, foram selecionados por amostragem aleatória estratificada.

Uma semana após a produção dos lotes, os frascos foram retirados do estoque a ( $-20 \pm 2$ ) °C e mantidos a aproximadamente 25 °C por cerca de 30 min, antes de iniciar o teste foi verificada a condição de vácuo no interior dos frascos. O teste foi realizado de acordo com o descrito no item 3.2.5 - Teste de controle da viabilidade.

Para este procedimento foi elaborado um formulário de Estudo da homogeneidade, em que todos os equipamentos e materiais tiveram seus números de identificação registrados, bem como os lotes dos insumos, auxiliando no processo metrológico.

#### 3.2.6.1 Avaliação estatística do estudo da homogeneidade

Para excluir possíveis valores aberrantes dos dados contidos neste estudo, foi realizado o teste de Grubbs, utilizando o *software* GraphPad Prism7, ferramenta disponível on line (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

A avaliação da homogeneidade foi realizada através da aplicação do teste estatístico recomendado pelo ABNT ISO Guia 35, análise da variância (ANOVA) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel 2016. A partir dos dados gerados na análise da variância, foi calculada a incerteza relativa à homogeneidade, que foi inserida ao final do estudo no processo de certificação do material de referência (ABNT, 2012b; BEIGUELMAN, 2006).

#### 3.2.7 Estudo de estabilidade em longo prazo ou de armazenamento

Após verificar a homogeneidade dos lotes e estes se apresentarem homogêneos, o estudo seguirá para a estabilidade em longo prazo. O estudo de estabilidade clássico é o mais apropriado, já que o objetivo é avaliar as condições do material num período mais longo, ou seja, as condições de armazenamento. Neste tipo de estudo, amostras individuais são preparadas ao mesmo tempo (mesma batelada), sob condições idênticas, sendo medidas em tempos separados (ABNT, 2012b).

Os testes foram realizados em triplicata, ou seja, para cada Tempo (t) foram avaliados três frascos, e os frascos utilizados também foram selecionados por amostragem aleatória estratificada. A frequência da realização dos testes foi mantida de forma que no primeiro mês se realizasse semanalmente, a partir do segundo mês até o terceiro fosse quinzenalmente e a partir do quarto mês, mensalmente, até completar um ano. Em cada tempo específico, os respectivos frascos armazenados no *freezer* a  $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$  foram retirados e mantidos a aproximadamente  $25 ^\circ\text{C}$  durante 30 min, antes de iniciar o teste.

Antes de iniciar o estudo foi verificada a condição de vácuo no interior dos frascos. Os testes foram realizados de acordo com o descrito no item 3.2.5 - Teste de controle da viabilidade e em todos foi verificada a pureza do material de cada frasco.

Para este procedimento foi elaborado um Formulário de estabilidade em longo prazo, em que todos os equipamentos e materiais tiveram seus números de identificação registrados, bem como os lotes dos insumos, auxiliando no processo metrológico.

#### *3.2.7.1 Avaliação estatística do estudo de estabilidade em longo prazo*

Para cada Tempo, foi aplicado o Teste de Grubbs, para verificar a presença de possíveis valores aberrantes. Se detectado, o valor aberrante foi descartado do cálculo da mediana de valores. Após a aplicação deste teste, foi calculada a mediana de cada tempo, a fim de gerar uma única coluna (valores calculados) e uma única linha (tempo).

A avaliação estatística desses resultados foi realizada, conforme recomendado pelo ABNT ISO Guia 35, através da análise de regressão linear, a fim de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo (ABNT, 2012b).

O teste foi aplicado utilizando o programa Microsoft Excel 2016, que expressa os resultados por meio de uma planilha contendo diversos parâmetros estatísticos que devem ser interpretados, a fim de se observar o tempo de estabilidade e calcular a incerteza.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) determinará o quanto o modelo é capaz de explicar os dados coletados, varia entre 0 e 1, indicando em porcentagem o quanto a variável dependente pode ser explicada pela variável independente. Sendo assim, para este estudo, quanto mais próximo de zero for esse valor, menor é a chance de o tempo ter correlação com a quantidade de UFC nos frascos, ou seja, o material se apresentará estável ao longo dos meses (BEIGUELMAN, 2006).

Na avaliação do F de significação, podemos afirmar que se esse parâmetro for menor que o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), a regressão é significativa, não sendo a teoria que se almeja neste estudo.

O coeficiente da variável X indica o quanto a variável dependente aumenta ou diminui ao longo dos meses, portanto quanto mais perto do zero for esse valor, menor será a chance da quantidade de UFC do material ter correlação com o tempo.

O valor-P está associado ao nível de significância da estimativa. Se o valor-P for maior que intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), não se rejeita a hipótese nula, demonstrando então que não existe correlação significativa entre as variáveis, uma vez que a hipótese nula indica que o tempo não influencia na quantidade de UFC das alíquotas dentro dos frascos.

A Equação (1) é a fórmula geral do coeficiente de regressão, em que y se refere à variável dependente, que no caso deste estudo é a quantidade de UFC nas alíquotas dentro dos frascos;  $\beta_1$  é o coeficiente de regressão; e x é a variável independente (tempo).

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x \quad (1)$$

Se  $\beta_1 = 0$ , os dois caracteres do estudo não estarão correlacionados, então,  $y = \beta_0$ . As hipóteses nula ( $H_0$ ) e alternativa ( $H_1$ ) se representam contrariamente uma da outra.

Sendo  $H_0: \beta_1 = 0$  e  $H_1: \beta_1 \neq 0$ . Para este estudo, não se espera rejeitar a hipótese nula, portanto o valor-P deverá ser maior que intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

Quanto ao coeficiente de regressão, se for constatado que não difere significativamente de zero, significa que os dois caracteres em estudo não estão correlacionados.

### 3.2.8 Estudo de estabilidade em curto prazo ou de transporte

A estabilidade em curto prazo é realizada em diferentes temperaturas a fim de estudar o efeito da temperatura sobre as propriedades do material em condições de transporte (ABNT, 2012b).

Nesse caso, o estudo apropriado é o de estabilidade isócrono, no qual amostras individuais são preparadas ao mesmo tempo (mesma batelada), sob condições idênticas, porém as medições são realizadas no mesmo experimento,

ocorrendo, portanto, sob condições de repetibilidade, em “uma única corrida” (ABNT, 2012b).

O estudo foi realizado em triplicata e em três diferentes temperaturas: 4 °C, 25 °C e 35 °C, que simulavam possíveis temperaturas de transporte. Os frascos utilizados também foram selecionados por amostragem aleatória estratificada. A cada dia, três frascos foram transferidos da temperatura de referência para a temperatura proposta. Sete dias após a primeira incubação, os 21 frascos foram analisados juntos, sob as mesmas condições de análise. Antes de iniciar o teste foi verificada a condição de vácuo no interior dos frascos. O estudo foi realizado de acordo com o descrito no item 3.2.5 - Teste de controle da viabilidade. Sendo assim, foram realizados três diferentes testes (três diferentes temperaturas) para cada lote produzido.

Para este procedimento foi elaborado um Formulário de estabilidade em curto prazo, em que todos os equipamentos e materiais tiveram seus números de identificação registrados, bem como os lotes dos insumos, auxiliando no processo metrológico.

#### 3.2.8.1 *Avaliação estatística do estudo de estabilidade em curto prazo*

No tratamento dos dados, para cada dia estudado, foi aplicado o Teste de Grubbs, para verificar a presença de possíveis valores aberrantes, já que este dado seria descartado do cálculo da mediana de valores quando detectado. Após isso, foi calculada a mediana de valores de cada dia através da análise de regressão linear.

A avaliação da estabilidade em curto prazo foi realizada então, conforme recomendado pelo ABNT ISO Guia 35, por meio da aplicação do teste de Regressão, analisando a possibilidade de haver qualquer tendência nos dados obtidos no estudo. (ABNT, 2012b; BEIGUELMAN, 2006).

Os dados da análise de regressão linear foram utilizados para o cálculo da incerteza inerente à estabilidade.

### **3.3 Caracterização taxonômica**

A caracterização do material é a última etapa a ser realizada antes da certificação. Um material de referência para ser certificado deve se apresentar

homogêneo, estável e bem caracterizado. A proposta nesse estudo foi realizar medições usando dois métodos de referência independentes em um único laboratório.

### 3.3.1 Caracterização quantitativa

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, foi realizado procedimento conforme descrito no item 3.2.5 - Teste de controle da viabilidade. Três diferentes analistas participaram dessa etapa, cada um realizou o teste em triplicata. Por meio dessa fase, foi observado se o estudo era reprodutível.

### 3.3.2 Caracterização qualitativa

Como essa é uma etapa crucial no estabelecimento de MRC, para caracterização referente à identidade do micro-organismo, diferentes metodologias foram avaliadas por meio de um estudo com cepas representantes daquelas que serão estabelecidas como MRC.

O objetivo foi eleger a metodologia mais rápida, simples e eficiente, dentre métodos fenotípicos e moleculares, que pudesse ser utilizada na caracterização das diferentes espécies estudadas para permitir a confirmação da identidade dos fungos ao longo do processo. Para isso, foram avaliadas inúmeras cepas de *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*, além de cepas representantes do determinado gênero, que já eram bem estabelecidas, depositadas na CFRVS/Fiocruz. As cepas de todas as espécies foram analisadas mediante os aspectos macroscópicos e microscópicos, avaliações fisiológicas por meio do Método Automatizado VITEK 2, MALDI-TOF MS e Sequenciamento da região ITS.

Para *Cryptococcus* foram empregados, além de todas as técnicas, a *Polymerase Chain Reaction (PCR) fingerprinting* – M13 e a *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)* utilizando o gene *URA5*, já que essa é a metodologia recomendada em um consenso mundial para analisar a genotipagem do complexo *C. neoformans/C. gattii* (MEYER *et al.*, 2003).

### 3.3.3 Caracterização fenotípica

#### 3.3.3.1 Avaliação dos aspectos macroscópicos

Os aspectos macroscópicos podem ser observados por meio do crescimento em ágar e do crescimento em caldo.

Para observação em ágar, um fragmento do crescimento fúngico foi estriado em placa contendo YMA, utilizando a técnica de esgotamento. A placa então foi incubada a  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 48 h. Após esse tempo, com auxílio do estereoscópio, foram observadas determinadas características nas colônias isoladas, como textura, cor, tipo de superfície, elevação, se é brilhosa ou fosca e tipo de margem.

Para observação em caldo, um fragmento do crescimento fúngico foi inoculado em dois tubos contendo meio YMB, um foi incubado a  $(25 \pm 2)$  °C e o outro a  $(36 \pm 1)$  °C. A leitura foi realizada após 2 a 3 dias de cultivo, observando a formação de sedimento, película e anel (FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011, LACHANCE *et al.*, 2011; VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

Para *C. neoformans* e *C. gattii*, além dos repiques em YMA, foram feitos repiques das cepas em placas contendo ágar Niger com Cloranfenicol, para verificar a pureza. O meio de cultura com extrato de semente de Niger estimula a produção de melanina em cepas de *Cryptococcus* spp. que são caracterizadas pelo desenvolvimento de colônias de cor marrom, sendo fenoxidase positivas, já que esta é a enzima que catalisa a produção de melanina. (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011). Além disso, foram feitos repiques adicionais em tubos contendo ágar CGB, a fim de diferenciar *C. neoformans* e *C. gattii*.

No caso das cepas de *Candida* spp., além do cultivo em YMA, foram feitos repiques em meio Chromagar.

#### 3.3.3.2 Avaliação dos aspectos microscópicos

Os aspectos microscópicos, tais como brotamento, forma celular, agrupamento e as dimensões, foram observados direto ao microscópio. Além disso, para *Saccharomyces* spp. foi feita a pesquisa de ascósporos, para isso as cepas



foram cultivadas em ágar acetato por 30 dias a  $(25 \pm 2)$  °C. Após esse tempo, fragmentos dos cultivos foram transferidos para lâminas microscópicas que foram coradas com verde malaquita a 5% e contracoradas com fucsina (FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011; LACHANCE *et al.*, 2011; VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

### 3.3.3.3 Avaliação fisiológica

A avaliação fisiológica foi realizada por meio do Método Automatizado VITEK 2, utilizando o cartão de leveduras VITEK 2 YST.

A partir do crescimento em meio YMA a  $(25 \pm 2)$  °C por aproximadamente 24 h, foi preparada uma suspensão em 3 mL de solução salina a 0,45%, em tubo próprio para ser utilizado no Sistema Vitek 2, com turvação ajustada ao valor padrão de 1,80 a 2,20 da escala de McFarland utilizando o *DensiChek™ Vitek® 2*. Essa suspensão foi utilizada para inoculação do cartão VITEK 2 YST. O conteúdo dos poços do cartão YST estão listados no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Conteúdo dos poços do cartão de leveduras VITEK 2 YST

L-lisina arilamidase	L-malato
Leucina - arilamidase	Arginina GP
Eritritol	Glicerol
Tirosina arilamidase	Beta-n-acetil-glucosaminidase
Arbutina	Amigdalina
D-galactose	Gentiobiose
D-glucose	Lactose
Metil-a-d-glucopiranosídeo	D-celobiose
Gama-glutamil-transferase	D-maltose
D-rafinose	Pnp-n-acetil-bd-galactosaminidase 1
D-manose	D-melibiose
D-melezitose	L-sorbose
L-ramnose	Xilitol
D-sorbitol	Sacarose/sucrose
Urease	Alfa-glucosidase
D-turanose	D-trealose
Nitrato	L-arabinose
D-galacturonato	Esculina
L-glutamato	D-xilose
DL-lactato	Acetato
Citrato (sódio)	Glucuronato
L-prolina	2-queto-d-gluconato
N-acetil-glucosamina	D-gluconato

Fonte: SOUTO, 2014.

### 3.3.3.4 Avaliação por MALDI-TOF MS

Os ensaios envolvendo as análises com MALDI-TOF MS foram realizados em colaboração com o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos)/Fiocruz.

Cultivos foram obtidos a partir do crescimento das leveduras em ágar Sangue de carneiro a 3% (BioCen) incubados por aproximadamente 72 h a  $(25 \pm 2)$  °C e cada isolado foi analisado em duplicata. Para o teste, uma pequena porção do crescimento fúngico foi transferida, com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável e estéril, para o poço de uma lâmina descartável modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux), de acordo com as instruções do fabricante. O método de extração utilizado foi o método direto na lâmina alvo com aplicação de 0,5 µL de ácido fórmico (25% v/v).

A lâmina foi deixada em temperatura ambiente para secagem e, após isso, em cada poço foi adicionado um microlitro da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Este procedimento foi realizado para todas as amostras até que todos os poços da lâmina estivessem preenchidos. Nas posições G3 e G4 das lâminas foram realizados esfregaços a partir da cultura de *Escherichia coli* ATCC 8739, que é a cepa recomendada pelo fabricante para o controle de qualidade da análise e como calibrador do equipamento, e esses esfregaços também foram cobertos com a solução matriz CHCA. Após o preparo e secagem a temperatura ambiente das lâminas, estas foram introduzidas no equipamento VITEK MS (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu) e as amostras foram submetidas a sucessivos disparos de um laser de nitrogênio que opera a 337 nanômetros (nm), utilizando o *software* Launchpad versão 2.9.3, 2011. Os perfis de espectros de massa gerados foram analisados por comparação com os perfis do banco de dados SARAMIS Premium (Database version 4.9 e System version 3.5.1.3, 2010). Essa comparação resulta numa identificação associada a um nível de confiança, que é avaliado pelo sistema por meio do pareamento do espectro analisado com os espectros próprios do banco de dados (CRUZ, 2015; WESTBLADE *et al.*, 2013).

### 3.3.4 Caracterização genotípica

#### 3.3.4.1 Extração de DNA dos fungos

O procedimento de extração de DNA das cepas foi realizado conforme descrito por Ferrer *et al.* (2001).

A partir do cultivo em YMA, foram retiradas duas alças cheias de massa celular e transferidas para um microtubo que foi armazenado a  $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$  por um período superior a 30 min. Após esse tempo, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (0,5 g SDS; 1,4 g NaCl; 0,73 g EDTA; 20 mL Tris-HCl 1M; água q.s.p. 100 mL) e 5  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol. O microtubo foi levado à agitação em agitador durante um min. Após isso, o microtubo foi incubado a  $65 ^\circ\text{C}$  por 1 h. Após a incubação, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (v/v/v 25:24:1) e o microtubo sofreu agitação por aproximadamente dois min, a fim de se obter uma suspensão homogênea. O microtubo foi então centrifugado a  $17.085 \times g$  durante 15 min. Após esse tempo, a parte aquosa superior foi transferida para outro microtubo, com o auxílio de uma micropipeta e foi adicionado volume igual de isopropanol, agitando suavemente o conteúdo. O microtubo foi armazenado a  $(-20 \pm 2) ^\circ\text{C}$  durante pelo menos 30 min. Após esse período, o tubo foi levado à centrifugação a  $17.085 \times g$  durante 15 min. O isopropanol foi descartado e uma massa foi observada ao fundo do tubo. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% e homogeneizado suavemente. O microtubo foi levado novamente à centrifugação a  $17.085 \times g$  durante 15 min. O sobrenadante decantado foi descartado e o precipitado depositado ficou secando a temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi hidratado com 50  $\mu\text{L}$  de água purificada estéril e estocado a  $4 ^\circ\text{C}$ . A quantificação foi feita por meio do espectrofotômetro NanoDrop.

#### 3.3.4.2 PCR- fingerprinting

O PCR-fingerprinting utiliza como iniciador específico o minissatélite M13 (obtido da sequência central do fago M13) para amplificar polimorfismos hipervariáveis e foi aplicado em todas as cepas de *Cryptococcus*. O iniciador M13 apresenta a seguinte sequência: 5' GAG GGTGGC GGTCT 3'. As amplificações

foram realizadas para um volume final igual a 50 µL contendo 25 ng de DNA genômico, 10mM de tampão de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de acetato de magnésio, 30 ng do iniciador M13, 2,5 U de Taq DNA polimerase platinum e água purificada estéril para completar o volume da reação. A reação de amplificação foi realizada sob as seguintes condições: 35 ciclos com 20 seg de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento a 50 °C, 20 seg de extensão a 72 °C, seguido por um ciclo de extensão final de 6 min a 72 °C. O produto de PCR foi levado a centrifugação no *SpeedVac* para concentrar a reação e, após isso, aproximadamente 10 µL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1.4% em 1X tampão Tris-borato-EDTA (TBE) e separados por eletroforese a 70 V por aproximadamente 5 h. A visualização foi feita sob luz UV e todas as bandas visíveis foram incluídas na análise, independentemente de suas intensidades (MEYER; MITCHELL, 1995; MEYER *et al.*, 1999; MEYER; MASZEWSKA; SORRELL, 2001).

As PCR foram realizadas de forma que todas as corridas ocorressem juntamente com os padrões dos diferentes tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* (**QUADRO 2**).

Quadro 2 - Padrões referentes aos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*

	Tipo molecular	Nº acesso CFRVS	Nº acesso CFP
<i>C. neoformans</i>	VNI	CFRVS 70295	CFP 55
	VNII	CFRVS 70296	CFP 56
	VNIII	CFRVS 70297	CFP 57
	VNIV	CFRVS 70301	CFP 58
<i>C. gattii</i>	VGI	CFRVS 70298	CFP 59
	VGII	CFRVS 70302	CFP 60
	VGIII	CFRVS 70299	CFP 61
	VGIV	CFRVS 70300	CFP 62

Fonte: SOUTO, 2014.

Legenda: CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária; CFP – Coleção de Fungos Patogênicos.

### 3.3.4.3 Análise de RFLP-URA5

Essa técnica foi utilizada para diferenciação dos oito tipos moleculares do complexo *C. neoformans/C. gattii*. O produto da PCR amplificado do gene *URA5* foi digerido com as enzimas *HhaI* e *Sau96I* e os perfis de RFLP diferenciaram os tipos moleculares. Foi utilizado o protocolo para amplificação do gene *URA5* conforme descrito por Meyer *et al.* (2003), utilizando os iniciadores *URA5* (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G 3') e *SJ101* (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3'). Foi preparada reação de volume final de 30 µL contendo 50 ng de DNA genômico, tampão 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de cada iniciador, 1,5 U de Taq Polymerase e água purificada estéril para completar o volume da reação. A PCR foi realizada sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 seg, 63 °C por 60 seg e 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,4% com TBE 1x para confirmar a especificidade da amplificação. Os produtos foram duplamente digeridos utilizando as enzimas *Sau96I* (10 U/µL) e *HhaI* (20 U/µL). Então, um mix foi preparado utilizando 3 µL de tampão NEB 10x, 0,9 µL de água, 0,4 µL da enzima *HhaI* e 0,7 µL da enzima *Sau96I*. Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 25 µL do produto da PCR da amplificação do gene *URA5* e 5 µL do mix de enzimas. A mistura foi centrifugada, a fim de obter os componentes no fundo do tubo. Os tubos foram incubados a 37 °C por um período de 3 h. Para observação da presença de bandas, foi realizada uma corrida em gel de agarose a 3% com os produtos do RFLP, e a corrida eletroforética ocorreu a 100 V por aproximadamente 2 h. Os padrões de RFLP foram analisados visualmente por comparação dos produtos obtidos em relação aos produtos estabelecidos das cepas padrão (**QUADRO 2**) (MEYER *et al.*, 2003).

### 3.3.4.4 Sequenciamento da região ITS

- Amplificação da região ITS do rDNA por PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') foram utilizados na amplificação do fragmento de rDNA que inclui ITS1, o gene 5.8 S e ITS2, através da reação em

cadeia da polimerase. Cada reação totalizou 50 µL e era composta por 100 ng de DNA (10 ng/mL), tampão 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 U de Taq Polymerase e água para completar o volume da reação. As reações foram realizadas sob as seguintes condições térmicas: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 60 seg, 55 °C por 60 seg, 72 °C por 60 seg, finalizando com 72 °C por 5 min (BRITO-SANTOS *et al.*, 2017).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4% em tampão tris borato EDTA (TBE) 1x a 90 volts, adicionado de brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado *1Kb Plus DNA Ladder*.

- Purificação dos produtos da PCR e sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados, utilizando Polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20%. Em um microtubo, foram adicionados 45 µL de PEG e a mesma quantidade do amplicon. O microtubo foi levado à agitação e incubado a 37 °C por 15 min. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 15 min a 7.322 x g em temperatura ambiente. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e 125 µL de etanol a 80% gelado foram adicionados. O microtubo foi levado à centrifugação por dois min a 5.490 x g. Após isto, o sobrenadante de etanol foi descartado e o microtubo foi colocado com a tampa aberta num termobloco a 60 °C até remover os resíduos de etanol. Posteriormente, 45 µL de água Milliq foram adicionados ao microtubo, este foi agitado por 10 seg e armazenado a -20 °C (BRITO-SANTOS *et al.*, 2017).

Após a purificação, os amplicons foram sequenciados utilizando a Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz.

- Análise das sequências

As sequências foram editadas utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.6 e comparadas com aquelas depositadas no Genbank, utilizando o programa de domínio público *Basic Local Alignment Search Tool*, coleção de nucleotídeos – BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para ser

considerada uma identificação razoável, a similaridade encontrada deveria ser de ao menos 97%, já que não existe um corte universalmente aceito para identificação de espécies fúngicas (NILSSON *et al.*, 2008; RAJA *et al.*, 2017).

Além desse banco, as sequências também foram analisadas no banco de dados da *International Society for Human and Animal Mycology* (ISHAM) para *barcodes* (<https://www.isham.org>). A prática de utilizar o GenBank e um outro banco de sequências para confirmar os dados é recomendado por RAJA *et al.* (2017).

### 3.4 Elaboração do certificado

Um certificado para cada Material de Referência Certificado foi elaborado e o conteúdo permaneceu em conformidade com as orientações do ABNT ISO Guia 31. Esse documento acompanha o MRC declarando os valores de propriedade e suas incertezas e demonstrando que os procedimentos necessários foram realizados a fim de assegurar a rastreabilidade (ABNT, 2017).

O certificado contém itens que são considerados primordiais, como o nome do material de referência, o produtor, o código do material, a descrição geral do material, o uso pretendido, as instruções para o uso apropriado, as instruções para as condições de armazenamento, os valores de propriedade certificados com suas incertezas de medição, o método utilizado na obtenção dos valores de propriedade e a validade do material (ABNT, 2017).

Para o cálculo da incerteza do MRC, foram considerados os detalhes pertinentes dos procedimentos empregados para produção e certificação do material, ou seja, os fatores que poderiam interferir de forma significativa para a incerteza associada aos valores de propriedade do MRC foram incluídos no modelo que constituiu esses valores (ABNT, 2012b).

Para ser completa, o guia ABNT ISO Guia 35 (2012) recomenda que a incerteza do MRC considere que a homogeneidade, a estabilidade em curto e longo prazo também desempenham um papel importante à caracterização do lote. Por essa razão e assumindo que as variáveis são independentes, utilizamos o modelo da equação (2).

$$U_{MRC}^2 = (u_{car}^2 + u_{homog}^2 + u_{ELP}^2 + u_{ECP}^2) \times k \quad (2)$$

onde,  $U_{MRC}$  é a incerteza expandida do material,  $u_{car}$  é a incerteza referente à caracterização,  $U_{homog}$  se refere à incerteza gerada no teste de homogeneidade,  $u_{ELP}$  é a incerteza associada ao estudo de estabilidade em longo prazo,  $u_{ECP}$  se refere ao estudo de estabilidade em curto prazo e  $k$  é o fator de abrangência.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Seleção das cepas utilizadas para o estabelecimento de metodologia para a produção dos MRC

#### 4.1.1 Seleção das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*

Dentre as cepas contidas na CFP/Fiocruz, duas de origem ambiental foram selecionadas por serem o primeiro isolamento, respectivamente, destas espécies em território brasileiro que jamais sofreu ação pelo ser humano, sendo provenientes de oco de árvore *Guettarda acreana* na Ilha de Maracá, Roraima (FORTES *et al.*, 2000).

As cepas estão depositadas na CFRVS/Fiocruz sob registros *C. neoformans* CFRVS 40323 (origem: 78MC2D) e *C. gattii* CFRVS 40324 (origem: 78MC3).

#### 4.1.2 Seleção das cepas de *C. albicans* e *S. cerevisiae*

Dentro do universo de 19 cepas ATCC referentes a *C. albicans* e 12 cepas referentes a *S. cerevisiae* depositadas na CFRVS/Fiocruz, as cepas *C. albicans* CFRVS 40006 (ATCC 10231) e *S. cerevisiae* CFRVS 40001 (ATCC 2601) foram escolhidas, uma vez que se pretende atender à demanda dos laboratórios que utilizam essas cepas preconizadas em ensaios farmacopeicos presentes na Farmacopeia Brasileira.

### 4.2 Estabelecimento de metodologia para produção dos MRC

#### 4.2.1 Planejamento da produção de MRC

Foram elaborados dois diferentes planejamentos, um que contempla as cepas que serão utilizadas pelos laboratórios de análises clínicas (*C. neoformans* e *C. gattii*) (**APÊNDICE A**) e outro contendo os passos para a produção dos MRC que serão utilizados no controle de qualidade de produtos (*C. albicans* e *S. cerevisiae*) (**APÊNDICE B**).

#### 4.2.2 Armazenamento do lote estoque para trabalho

Todos os testes de pureza realizados com as cepas em estudo, tanto durante a preservação, como durante o TVP-pré e TVP-pós, se apresentaram satisfatórios, ou seja, apresentaram colônias puras e com características relacionadas às espécies avaliadas.

As colônias de *C. neoformans* e *C. gattii* em ágar Niger com cloranfenicol se apresentaram marrons, sendo então fenoloxidase positivas. Em ágar CGB, *C. neoformans* se apresentou negativo, enquanto *C. gattii* foi positivo, confirmando a identidade dessas duas espécies por esse teste.

*C. albicans* em meio Chromagar apresentou colônias esverdeadas típicas do crescimento dessa espécie neste meio cromogênico.

#### 4.2.3 Definição do quantitativo de unidade formadora de colônia

Nesta etapa, foi estabelecida a metodologia para que fosse alcançada uma recuperação de até 100 UFC por alíquota de 0,1 mL do material após o processo de liofilização. Então, por meio de vários testes, os parâmetros diretamente ligados à viabilidade do material foram ajustados, como a escala de McFarland e a diluição da suspensão no crioprotetor.

##### 4.2.3.1 Testes com *Cryptococcus*

Os testes para definir este método foram realizados em duas etapas, na primeira foram realizados cinco experimentos a fim de ajustar a escala McFarland e a diluição próxima da pretendida antes da liofilização. Na segunda etapa foram realizados testes simulando o método de produção propriamente dito, realizando testes de liofilização.

Na primeira etapa, para cada escala foram realizadas diferentes diluições em água purificada. A partir de cada diluição, 0,1 mL foi inoculado em duplicata em placas contendo meio YMA, utilizando o método de *spread plate*. As placas foram incubadas a  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 48 h (**FIGURA 1**).

No Teste 1, nenhuma das placas apresentou crescimento fúngico, sendo assim foi necessário diminuir o número de diluições. Para os demais testes (Teste 2

ao 5), houve crescimento em todas as placas. No Teste 2 foram utilizadas as escalas 2, 3 e 3.5 McF, já no Teste 3, as escalas 1, 1.5, 2, 3 e 3.5 McF foram testadas com outras diluições. Porém os resultados julgados promissores foram os encontrados nos Testes 4 e 5, conforme **Figura 1**. O resultado descrito é referente à média dos resultados gerados em duplicata.

Baseada nesses resultados, a segunda etapa foi iniciada utilizando-se a escala 1 McF e duas diferentes diluições, visto que estas representam uma concentração de células na base  $10^6$  UFC/mL.

Na segunda etapa, as escalas e as diluições foram se ajustando de acordo com os resultados de viabilidade obtidos em cada teste, baseando-se nos resultados dos testes de viabilidade anteriores (**TABELA 2**). Basicamente, uma alíquota da suspensão foi inoculada em um tubo de ensaio contendo leite desnatado a 20% previamente autoclavado a 110 °C por 10 min. A quantidade das alíquotas também sofreu variação entre os testes. O tubo foi homogeneizado em agitador de tubos durante 2 min. O TVP-pré do Teste 6 foi realizado em triplicata. O resultado mais uma vez se repetiu ( $5 \times 10^6$  UFC/mL), demonstrando a repetibilidade do método. Os resultados dos Testes (TVP-pré) 7, 8, 9, 10 e 11 estão descritos na **Tabela 2** e representam a média dos resultados gerados em duplicata.

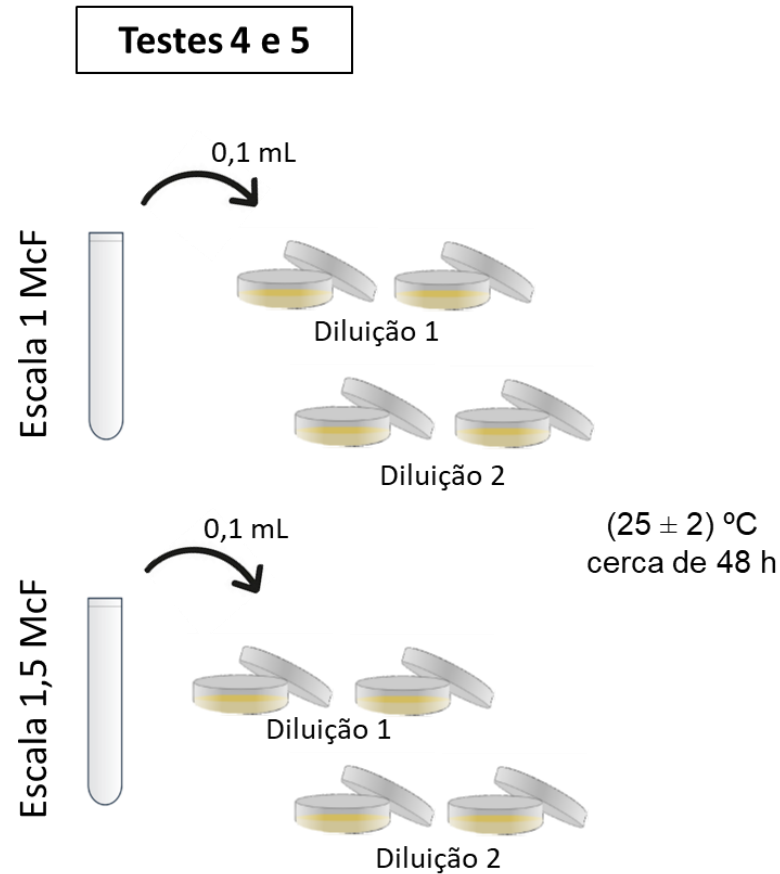
Após a liofilização do material, foi possível chegar aos valores ideais para a escala McFarland e para a diluição na solução crioprotetora. No Teste 6, ocorreram problemas com o aparelho liofilizador durante o ciclo de liofilização, levando à perda do material. No TVP-pós da repetição (Teste 7), não foi observado crescimento fúngico. Sendo assim, concluiu-se que as diluições deveriam ser reduzidas.

Os outros testes (Testes 7 a 12) realizados apresentaram resultados próximos ao desejado (menos que 100 UFC), havendo necessidade apenas de pequenos ajustes. Além disso, os resultados provenientes de testes com os mesmos parâmetros se apresentaram homogêneos e coerentes, como mostra a **Tabela 2**.

Estes últimos testes sugerem a repetição de experimentos utilizando a escala 0,3 McFarland em uma determinada diluição. Após os testes 13 a 16, esses valores se confirmaram como sendo os adequados para a metodologia de produção de *Cryptococcus* como Material de Referência (**TABELA 3**).

Figura 1 - Esquema das escalas e diluições padronizadas na 1ª etapa e que foram utilizadas na 2ª etapa da definição do quantitativo de unidade formadora de colônia

### 1ª etapa (cinco testes)



<b>Resultados - Escala 1 McF</b>		
	Diluições	Contagem (UFC)
Teste 4	1	$5,5 \times 10^6$
	2	$6 \times 10^6$
Teste 5	1	$4,6 \times 10^6$
	2	$1,5 \times 10^6$

<b>Resultados - Escala 1.5 McF</b>		
	Diluições	Contagem (UFC)
Teste 4	1	$6,8 \times 10^6$
	2	$1,2 \times 10^7$
Teste 5	1	$7,3 \times 10^6$
	2	$2,2 \times 10^7$

Fonte: SOUTO, 2014.

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônia; McF – Escala McFarland

Tabela 2 - Variações realizadas nos diferentes experimentos para definição do quantitativo de unidade formadora de colônia e resultados da viabilidade pré e pós liofilização

Experimentos	Escalas (McF)	Diluições plaqueadas	Contagem	Contagem (pós)	
				frasco 1	frasco 2
Teste 6*	1	$10^{-6}$	$5 \times 10^6$ UFC	-	-
		$10^{-8}$	$5 \times 10^6$ UFC	-	-
Teste 7	1	$10^{-6}$	$5,45 \times 10^7$ UFC	NC	NC
		$10^{-8}$	NC	NC	NC
Teste 8	1	$10^{-3}$	$2,7 \times 10^6$ UFC	12 UFC	15 UFC
		$10^{-4}$	$3,9 \times 10^6$ UFC	2 UFC	1 UFC
		$10^{-5}$	$2 \times 10^6$ UFC	NC	NC
Teste 9	1,5	$10^{-4}$	$5 \times 10^6$ UFC	10 UFC	30 UFC
		$10^{-5}$	$6 \times 10^6$ UFC	NC	NC
Teste 10	1	$10^{-1}$	incontável	incontável	incontável
		$10^{-2}$	incontável	168 UFC	170 UFC
Teste 11	0,5	$10^{-1}$	incontável	incontável	incontável
		$10^{-2}$	incontável	126 UFC	113 UFC
Teste 12	0,3	$10^{-2}$	incontável	57 UFC	70 UFC

Fonte: SOUTO, 2014.

Legenda: UFC – Unidade Formadora de Colônia; McF – Escala McFarland; NC – não houve crescimento

\* problemas durante a liofilização

Tabela 3 - Testes utilizando a escala 0,3 McFarland e diluições próximas a  $10^{-3}$  em leite desnatado para definição do quantitativo de unidade formadora de colônia

Experimentos	Escalas (McF)	Média UFC/mL (TVP-Pré)	TVP-pós (UFC)					
			Frascos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5
Teste 13	0,3	$1,4 \times 10^6$	Frasco 1	52	53	47	58	60
			Frasco 3	53	55	49	54	69
			Frasco 6	45	79	50	inc	inc
Teste 14	0,3	$1,2 \times 10^6$	Problemas na liofilização					
Teste 15	0,3	$1,02 \times 10^6$	Frasco 1	133	74	96	59	55
			Frasco 2	44	53	66	69	53
Teste 16	0,3	$1,05 \times 10^6$	Frasco 4	50	44	51	35	43
			Frasco 2	51	30	43	50	34

Fonte: SOUTO, 2014.

Legenda: McF – Escala McFarland; UFC – Unidade Formadora de Colônia; TVP – Teste de Viabilidade e Pureza; inc - incontável

#### 4.2.3.2 Testes com *C. albicans*

Os testes com *C. albicans* foram iniciados utilizando valores para a escala McFarland e diluição em leite desnatado a 20% próximos aos estabelecidos para *Cryptococcus*. Como são dois fungos leveduriformes, os valores foram utilizados como base para começar os estudos. Os testes foram iniciados com a escala 0,3 e 0,5 McFarland e as mesmas diluições em leite desnatado, entretanto o número de colônias recuperado após o processo de liofilização foi bastante reduzido. Houve a necessidade, então, de aumentar a concentração da suspensão a ser liofilizada, testando então a escala 0,8 McF, conforme detalhado na **Tabela 4**. Ficou estabelecido que para a produção utilizando *C. albicans*, a escala McFarland utilizada será de 0,8.

#### 4.2.3.3 Testes com *S. cerevisiae*

Para estabelecimento do método utilizando *S. cerevisiae*, os valores constituídos para *C. albicans* foram utilizados como base e quatro testes com as escalas 0,5 e 0,8 McF foram realizados (**TABELA 5**). Além disso, um teste utilizando a escala 1 McF foi realizado a fim de observar alguma diferença entre as escalas, porém como foram recuperadas quantidades de UFC maiores do que as desejadas, os testes 3 e 4 não englobaram essa escala. Os valores já estabelecidos para *C. albicans* foram os mesmos definidos para *S. cerevisiae* (0,8 McFarland, utilizando a mesma diluição), uma vez que todos os testes mostraram resultados compatíveis com o esperado.

Tabela 4 - Testes para estabelecimento do método de produção de *C. albicans* como MRC

Experimentos	Escalas (McF)	Média UFC/mL (TVP-Pré)	Frascos	TVP-pós (UFC)				
				Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5
Teste 1	0,3	1,00 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 2	11	16	14	11	13
		1,3 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 6	3	1	1	2	1
	0,5	1,76 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 6	24	15	26	25	26
		1,85 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 7	1	1	2	2	2
Teste 2	0,5	1,15 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 3	50	40	36	37	42
	0,8	1,39 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 5	47	53	56	70	59
Teste 3	0,5	2,03 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 1	50	32	53	52	30
			Frasco 3	50	61	55	54	41
	0,8	2,66 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 3	64	54	59	56	64
			Frasco 7	50	50	56	66	50
Teste 4	0,5	1,25 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 4	17	18	22	18	34
			Frasco 7	22	17	19	19	21
	0,8	1,91 x 10 <sup>6</sup>	Frasco 2	30	37	31	36	33
			Frasco 7	33	45	31	43	36

Fonte: SOUTO, 2015.

Legenda: McF – Escala McFarland; UFC – Unidade Formadora de Colônia; TVP – Teste de Viabilidade e Pureza.



Tabela 5 - Testes para estabelecimento do método de produção de *S. cerevisiae* como MRC

Experimentos	Escalas (McF)	Média UFC/mL (TVP-Pré)	TVP-pós (UFC)					
			Frasco	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5
Teste 1	0,5	$1,16 \times 10^6$	Frasco 5	39	33	33	26	32
	0,8	$1,68 \times 10^6$	Frasco 3	58	44	57	57	58
Teste 2	0,5	$1,67 \times 10^6$	Frasco 3	42	43	34	32	35
			Frasco 4	41	41	43	56	55
	0,8	$1,76 \times 10^6$	Frasco 1	58	88	75	67	82
			Frasco 3	53	43	51	42	61
	1	$2,40 \times 10^6$	Frasco 2	61	64	79	77	81
			Frasco 5	81	96	83	97	104
Teste 3	0,5	$1,25 \times 10^6$	Frasco 2	25	C	C	31	C
			Frasco 4	31	C	C	C	C
	0,8	$2,22 \times 10^6$	Frasco 3	53	56	55	63	56
			Frasco 6	57	65	62	64	C
Teste 4	0,5	$1,5 \times 10^6$	Frasco 4	45	38	45	62	47
			Frasco 7	54	46	58	40	61
	0,8	$2,04 \times 10^6$	Frasco 6	59	77	71	57	71
			Frasco 7	69	69	60	69	80

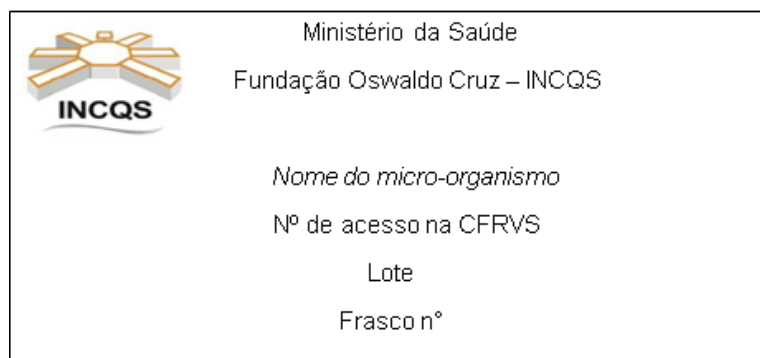
Fonte: SOUTO, 2015.

Legenda: McF – Escala McFarland; UFC – Unidade Formadora de Colônia; TVP – Teste de Viabilidade e Pureza; C – contaminação com ácaros.

### 4.3 Produção dos lotes de *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albicans* E *S. cerevisiae* como MRC

Após o estabelecimento da metodologia, um lote de cada material foi produzido, cada um com 200 unidades de frascos ampola, que foram identificadas com rótulo cujo modelo está demonstrado na **Figura 2**. Durante a produção foi realizado teste de pureza e, para todos os lotes, o resultado se apresentou satisfatório, sendo todas as colônias semelhantes entre si e com características condizentes àquelas encontradas na literatura referenciando a espécie fúngica estudada.

Figura 2 - Modelo de Rótulo utilizado para a identificação do MRC produzido



Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2015).

### 4.4 Estudo de homogeneidade e avaliação estatística

Os testes foram realizados em até um mês após a produção do lote de cada material. As avaliações da pureza em placa contendo YMA e meio Niger se apresentaram satisfatórias. A **Tabela 6** apresenta os dados das contagens do número de colônias observadas nas cinco placas referentes a cada frasco aberto dos materiais produzidos. Para os quatro testes, não foram detectados valores aberrantes, de acordo com os resultados da avaliação utilizando o *software* GraphPad Prism7.

## Avaliação estatística

Para a avaliação estatística dos dados, foi aplicada a ANOVA, de acordo com o recomendado pelo ABNT ISO Guia 35 (2012). Os dados gerados nas análises foram compilados e os parâmetros relevantes para avaliação da homogeneidade e cálculo da incerteza estão expostos na **Tabela 7**.

De acordo com o critério, o  $F$  calculado, em todos os casos, se apresentou menor que o  $F$  crítico, conforme demonstrado na **Tabela 7**, sendo assim os resultados referentes aos diferentes lotes são homogêneos.

Para o cálculo da incerteza relativa à homogeneidade ( $u_{\text{homog}}$ ), considerou-se o conceito adotado quando a Média Quadrática dentro dos frascos ( $MQ_{\text{dentro}}$ ) é menor que a Média Quadrática entre os frascos ( $MQ_{\text{entre}}$ ) (**TABELA 7**). Sendo assim,  $u_{\text{homog}}$  é igual ao desvio padrão entre os frascos ( $S_{bb}$ ), que é calculado a partir da raiz quadrada da diferença de  $MQ_{\text{entre}}$  e  $MQ_{\text{dentro}}$ , divididos por  $n$  (número de replicatas), conforme a equação abaixo:

$$S_{bb} = \sqrt{(MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}})/n} \quad (3)$$

Substituindo então os valores na equação, obteve-se os valores das incertezas relativas à homogeneidade de cada lote produzido (**TABELA 7**).

Tabela 6 - Dados referentes aos resultados do estudo de homogeneidade dos diferentes materiais produzidos

Teste de Homogeneidade													
	frascos	contagens (UFC/100µL)						frascos	contagens (UFC/100µL)				
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	12	32	27	38	37	32	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006		34	44	35	43	48
	35	41	37	36	34	33		29	38	34	50	36	41
	44	32	31	37	33	40		48	34	36	44	37	56
	74	33	34	49	39	47		78	36	40	48	47	45
	92	29	36	33	36	31		100	38	41	37	41	40
	115	24	36	36	37	28		113	49	39	52	43	43
	126	41	38	38	40	38		129	35	44	36	56	34
	154	30	39	45	42	32		148	40	44	49	50	52
	162	43	33	31	32	32		165	41	46	49	56	58
	193	32	24	33	32	30		183	44	50	43	59	59
<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	6	10	13	16	16	14	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001	13	54	50	45	51	52
	21	18	20	16	22	15		35	40	54	43	45	49
	56	17	16	20	19	18		60	45	52	48	49	58
	67	14	12	17	15	16		73	48	52	42	51	53
	90	12	11	14	9	18		97	41	53	46	54	60
	114	12	14	13	13	13		109	52	35	41	48	43
	127	9	12	14	18	13		132	61	52	42	50	48
	156	13	22	9	24	10		156	46	48	41	41	37
	168	17	9	15	7	16		161	45	48	46	50	49
	181	13	13	10	9	20		194	47	44	39	42	49

Fonte: SOUTO, 2015.

Legenda: CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária; MRC - Material de Referência Certificado; UFC - Unidade Formadora de Colônia; C. – *Cryptococcus*; C. – *Candida*; S. - *Saccharomyces*

Tabela 7 - Principais parâmetros gerados durante a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microsoft Excel, para o estudo de homogeneidade dos quatro materiais

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DA HOMOGENEIDADE					
		<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001
Parâmetros ANOVA	MQ <sub>entre</sub>	39,48673469	22,05333333	89,29777778	50,24222222
	MQ <sub>dentro</sub>	20,43974359	13,05	43,29	26,95
	F	1,93186057	1,6899106	2,062780729	1,864275407
	F <sub>crítico</sub>	2,130597059	2,124029264	2,124029264	2,124029264
$u_{\text{homog}}$ (UFC/100 $\mu$ L)		1,380108369	0,948858964	2,144942372	1,526178961

Fonte: SOUTO, 2015.

Legenda: CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária; MRC - Material de Referência Certificado; C. – *Cryptococcus*; C. – *Candida*; S. – *Saccharomyces*; MQ<sub>entre</sub> - Média quadrática entre os diferentes frascos; MQ<sub>dentro</sub> - Média quadrática dentro dos diferentes frascos; F - razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos;  $u_{\text{homog}}$ - incerteza relativa à homogeneidade.

#### 4.5 Estudo de estabilidade em longo prazo e avaliação estatística

As **Tabelas 8, 9, 10 e 11** contêm os dados referentes ao estudo de estabilidade em longo prazo dos lotes produzidos de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324, *C. albicans* CFRVS MRC 40006 e *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, respectivamente, representando o número de colônias presentes em cada uma das cinco placas de YMA referentes a cada frasco analisado. Para cada Tempo são registrados 15 valores, e o Tempo é registrado de forma sequencial, sendo T1 ao T4 referentes ao primeiro mês, T5 e T6 referentes ao segundo mês, T7 e T8 ao terceiro mês, e a partir do T9 é um Tempo representante de cada mês

O Tempo 0 é referente ao Teste de Controle da viabilidade e em todos os testes o resultado da avaliação da pureza se apresentou satisfatório, ou seja, nenhuma contaminação foi verificada.

Na **Tabela 8**, o valor marcado com asterisco representa o valor aberrante encontrado na análise por meio do teste de Grubbs, utilizando o *software* GraphPad Prism7, por isso esse valor foi excluído antes de calcular a mediana dos valores de cada Tempo.

Em todas as placas descartadas devido à contaminação, observou-se a presença de ácaros, o que descarta a possibilidade de algum tipo de contaminação do próprio lote produzido.

Tabela 8 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de *C. neoformans* CFRVS MRC40323

Resultados do Teste de Estabilidade em Longo Prazo								
<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323								
mês	tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)					
1	T0	105	36	36	40	28	38	
		175	35	31	37	26	34	
		188	35	21	22	33	30	
	T1	54	28	36	40	40	32	
		136	24	29	39	38	40	
		171	36	32	44	33	44	
		T2	90	35	26	40	35	37
			128	27	31	21	36	37
			200	43	45	43	37	28
		T3	20	29	25	34	30	30
			36	18	33	29	25	24
			88	31	26	45	29	37
		T4	43	26	33	27	42	24
			77	33	32	31	25	37
			166	36	33	39	35	39
	2	T5	3	26	26	44	40	43
			180	37	35	32	58	35
			195	30	20	29	31	18
T6		112	28	31	41	47	34	
		134	40	30	22	40	32	
		158	13	35	37	22	30	
3	T7	32	35	53	34	40	49	
		45	46	36	44	26	26	
		125	32	39	66	28	84*	
	T8	9	44	31	35	39	31	
		59	22	26	35	34	39	
		150	40	48	36	37	40	
4	T9	6	44	37	42	37	29	
		21	32	37	32	27	34	
		85	36	25	31	38	39	
5	T10	18	42	27	27	30	37	
		42	29	34	31	26	25	
		141	27	44	30	36	41	
6	T11	48	38	34	32	28	33	
		97	25	28	41	36	33	
		174	28	29	40	35	34	
7	T12	91	27	30	30	25	35	
		108	30	38	49	46	32	
		186	34	39	38	38	34	
8	T13	110	40	54	37	54	33	
		153	32	26	21	53	40	
		199	38	35	31	32	26	
9	T14	22	29	31	37	28	31	
		79	38	23	24	43	27	
		121	37	49	39	43	46	
10	T15	30	33	36	38	35	25	
		104	33	22	39	35	29	
		151	46	40	44	41	43	
11	T16	1	35	27	37	39	27	
		72	27	32	33	23	30	
		165	38	34	30	35	29	
12	T17	66	32	29	33	21	39	
		93	30	38	37	33	32	
		190	35	31	35	25	31	

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Cryptococcus*; MRC - Material de Referência Certificado; UFC - Unidade Formadora de Colônia; T – Tempo; \*Valor aberrante.

Tabela 9 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de *C. gattii* CFRVS MRC 40324

Resultados do Teste de Estabilidade em Longo Prazo								
<i>C. gattii</i> CFRVS MRC40324								
mês	tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)					
1	T0	198	14	10	15	13	16	
		173	10	11	18	18	27	
		79	13	15	14	19	16	
	T1	188	cont.	18	21	13	17	
		117	18	25	13	22	15	
		178	13	8	9	18	17	
		T2	138	12	13	10	19	14
			10	23	21	21	16	11
			98	14	12	10	16	14
		T3	151	11	12	7	13	14
			44	15	17	13	12	12
			137	18	14	9	21	15
T4	52	14	14	14	18	15		
	27	9	12	13	13	8		
	120	18	20	12	21	16		
2	T5	81	11	9	13	11	14	
		180	14	12	10	7	12	
		149	15	15	15	20	14	
	T6	199	10	10	11	17	16	
		158	18	18	14	15	19	
		85	14	20	15	18	19	
3	T7	29	16	14	16	9	20	
		13	13	13	10	16	14	
		43	18	21	25	24	30	
	T8	155	7	12	17	9	10	
		82	15	15	16	14	19	
		103	20	15	18	18	17	
4	T9	87	20	17	23	22	16	
		164	12	13	14	16	14	
		142	12	16	14	15	11	
5	T10	191	20	17	17	16	11	
		99	26	22	25	17	30	
		141	12	14	20	23	14	
6	T11	108	17	10	21	12	12	
		18	7	12	9	13	11	
		174	19	26	18	18	20	
7	T12	80	10	13	14	7	11	
		14	cont.	cont.	cont.	10	19	
		106	15	19	10	13	18	
8	T13	186	18	21	14	16	16	
		8	14	8	16	17	20	
		133	20	8	10	14	9	
9	T14	109	15	14	20	9	19	
		53	cont.					
		185	12	11	10	11	15	
10	T15	5	15	23	15	15	12	
		65	16	27	13	11	15	
		179	12	8	10	9	16	
11	T16	128	9	14	11	14	7	
		31	15	11	9	16	13	
		61	16	12	15	15	16	
12	T17	70	10	14	17	17	10	
		126	12	11	16	15	19	
		32	16	19	21	14	29	

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Cryptococcus*; MRC - Material de Referência Certificado; UFC - Unidade Formadora de Colônia; T – Tempo; cont. – contaminado por ácaros.



Tabela 10 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de *C. albicans* CFRVS MRC 40006

Resultados do Teste de Estabilidade em Longo Prazo								
<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006								
mês	tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)					
1	T0	64	cont.					
		110	61	70	79	67	70	
		105	46	60	60	65	67	
	T1	19	29	42	35	30	27	
		43	28	22	49	32	27	
		72	17	26	16	27	19	
		T2	55	20	32	31	29	24
			184	44	52	76	49	56
			63	20	21	26	23	23
		T3	115	58	79	68	53	60
			82	25	12	32	24	27
			65	26	14	19	38	18
T4	106	57	48	54	49	64		
	158	74	47	65	56	61		
	35	48	38	32	41	38		
2	T5	173	60	71	57	77	57	
		123	50	67	56	66	57	
		86	17	26	17	19	39	
	T6	79	38	33	30	25	24	
		112	55	77	69	69	80	
		68	24	22	34	31	32	
3	T7	116	44	69	63	52	49	
		61	12	17	22	14	17	
		114	75	67	50	49	48	
	T8	98	12	12	11	17	17	
		77	23	31	25	19	30	
		47	28	31	28	35	30	
4	T9	56	23	26	26	28	32	
		154	68	58	65	78	75	
		130	57	51	56	45	64	
5	T10	26	27	21	31	23	28	
		102	24	21	18	24	23	
		80	14	20	18	14	18	
6	T11	128	45	41	47	51	49	
		2	30	24	41	32	26	
		174	73	72	54	53	63	
7	T12	70	27	33	28	20	20	
		38	24	25	33	28	31	
		88	24	21	21	19	20	
8	T13	30	37	35	31	34	31	
		67	18	31	26	29	23	
		109	54	52	55	84	60	
9	T14	118	63	57	58	67	83	
		142	58	46	49	48	56	
		122	61	66	60	52	56	
10	T15	15	27	33	44	36	35	
		194	35	45	41	61	65	
		133	52	75	63	69	60	
11	T16	58	14	15	12	17	13	
		96	7	13	9	15	13	
		197	51	33	47	43	54	
12	T17	4	30	25	24	34	39	
		160	48	48	44	43	47	
		27	26	24	16	24	26	

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Candida*; MRC - Material de Referência Certificado; UFC - Unidade Formadora de Colônia; T – Tempo; cont – contaminado por ácaros

Tabela 11 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em longo prazo de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001

Resultados do Teste de Estabilidade em Longo Prazo								
<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001								
mês	tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)					
1	T0	10	69	95	70	71	89	
		42	50	45	54	54	49	
		76	80	56	80	86	82	
	T1	125	37	42	58	67	71	
		115	66	70	69	73	83	
		108	73	74	69	68	72	
		T2	142	37	39	39	39	47
			29	42	43	36	44	55
			51	32	30	30	46	47
		T3	101	32	40	40	37	46
			5	60	55	71	67	92
			59	67	59	74	61	89
	T4	16	24	33	28	32	32	
		82	37	27	40	55	39	
		183	31	27	29	24	46	
2	T5	67	33	32	41	46	47	
		27	29	33	40	38	54	
		159	24	28	34	32	41	
	T6	167	55	49	49	48	46	
		157	74	54	57	69	72	
		41	41	39	41	52	43	
3	T7	34	32	35	25	43	45	
		162	26	36	23	48	44	
		199	36	53	40	46	57	
	T8	83	35	30	38	20	43	
		3	31	30	44	32	32	
		15	cont.					
4	T9	104	65	70	69	75	98	
		129	57	49	57	46	61	
		68	17	23	32	34	26	
5	T10	48	36	34	43	35	49	
		31	70	65	75	63	78	
		152	17	18	28	33	30	
6	T11	179	59	52	68	56	65	
		171	30	20	27	18	20	
		87	16	23	17	26	18	
7	T12	138	18	25	21	25	21	
		188	19	13	14	18	16	
		106	11	21	9	18	16	
8	T13	75	8	16	26	16	26	
		71	8	17	14	11	15	
		197	12	12	11	16	15	
9	T14	176	22	13	12	14	23	
		160	12	8	12	12	17	
		72	11	12	13	9	10	
10	T15	14	11	12	23	29	21	
		49	16	9	27	12	22	
		61	13	15	20	21	15	
11	T16	119	23	36	23	25	31	
		114	57	74	65	94	98	
		69	20	26	17	24	25	
12	T17	110	63	76	*	*	75	
		44	29	13	17	16	24	
		154	15	19	10	15	16	

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: S. – *Saccharomyces*; MRC - Material de Referência Certificado; UFC - Unidade Formadora de Colônia; T – Tempo; cont – contaminado por ácaros; \* acidente com as placas.

## Avaliação estatística

Após a análise de valores aberrantes, foi calculada a mediana dos valores de cada tempo (**TABELA 12**), para então avaliar estatisticamente os dados por meio do teste de regressão linear. Como a regressão é calculada a partir de uma variável dependente em função de uma variável independente (BEIGUELMAN, 2006), que nesse trabalho foi representada pelo tempo em meses, calculamos separadamente a mediana do Tempo 1 ao Tempo 4 (quatro semanas do primeiro mês), depois dos Tempos 5 e 6 (quinzenas do segundo mês) e também dos Tempos 7 e 8 (quinzenas do terceiro mês), para os valores finais serem representados pelo mensurado em função do mês, excluindo as diferentes frequências.

Tabela 12 - Cálculo das medianas em função do tempo em meses no estudo de estabilidade em longo prazo dos diferentes MRCs

Período de análise (variável X)	Mensurando			
	<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001
Tempo 0	34 UFC	15 UFC	64 UFC	70 UFC
Mês 1	34 UFC	14 UFC	28 UFC	49 UFC
Mês 2	32 UFC	14 UFC	45 UFC	41 UFC
Mês 3	36 UFC	15 UFC	37 UFC	36 UFC
Mês 4	36 UFC	15 UFC	56 UFC	57 UFC
Mês 5	30 UFC	17 UFC	21 UFC	36 UFC
Mês 6	33 UFC	13 UFC	47 UFC	26 UFC
Mês 7	34 UFC	13 UFC	24 UFC	18 UFC
Mês 8	35 UFC	16 UFC	34 UFC	15 UFC
Mês 9	37 UFC	13 UFC	57 UFC	12 UFC
Mês 10	36 UFC	15 UFC	45 UFC	16 UFC
Mês 11	32 UFC	14 UFC	25 UFC	26 UFC
Mês 12	32 UFC	15 UFC	30 UFC	17 UFC

Fonte: SOUTO, 2017.

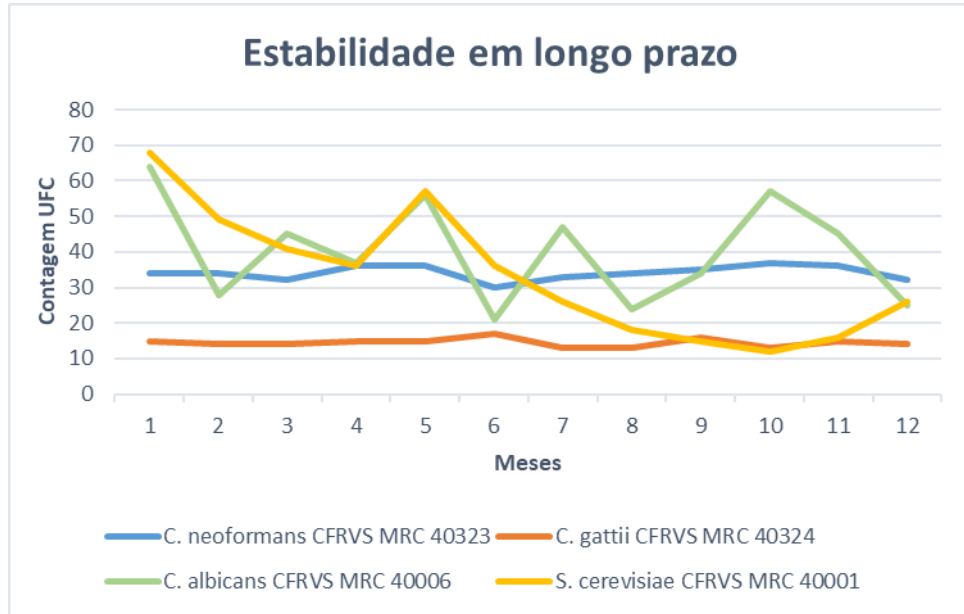
Legenda: *C.* - *Cryptococcus*; *C.* - *Candida*; *S.* - *Saccharomyces*; MRC - Material de Referência Certificado; UFC - Unidade Formadora de Colônia.

Analisando o gráfico das medianas calculadas nos 12 meses de estudo, a partir da data de produção do lote, (**FIGURA 3**), fica evidente a maior estabilidade nos valores dos materiais *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 e *C. gattii* CFRVS MRC 40324, pode-se observar ainda que os valores de *C. albicans* CFRVS MRC 40006 apresentam uma variação maior, porém não há declínio constante.

Quanto ao material *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, observou-se um declínio nos valores a partir do quarto mês, diminuindo a cada mês até o final do estudo. Cabe destacar que, analisando os valores do estudo de homogeneidade

deste material, não foram observados valores tão baixos como os encontrados no estudo de estabilidade em longo prazo.

Figura 3 - Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em longo prazo dos quatro MRC armazenados a -20°C durante 12 meses.



Fonte: SOUTO, 2017.

Para avaliação da estabilidade, o teste de regressão linear foi aplicado utilizando o programa Microsoft Excel 2016, no qual foi gerada uma planilha com os parâmetros estatísticos calculados. Os principais parâmetros estão expressos na **Tabela 13**.

Avaliando os parâmetros, verificou-se que os valores referentes ao coeficiente de determinação ( $R^2$ ), no estudo com *C. neoformans* e *C. gattii*, foram bem baixos quando avaliados os 12 meses, sendo satisfatório, e o mesmo ocorreu para *C. albicans*. Já no teste com *S. cerevisiae*, utilizando os dados dos 12 meses, esse material não se apresentou estável, já que 70% da variável dependente se correlaciona com o tempo. Esse valor se apresentou baixo e, portanto, satisfatório quando o teste foi aplicado utilizando os dados dos primeiros cinco meses.

O valor de F de significação no teste com *S. cerevisiae* durante 12 meses foi menor que 0,05 (intervalo de confiança), o que indica que a regressão é significativa, portanto mais um parâmetro comprova que o material não é estável por 12 meses. Para todos os outros testes, esse valor foi maior que 0,05.

Os maiores valores do coeficiente da variável X foram encontrados nos testes avaliando *S. cerevisiae*, tanto ao longo de 12 meses, como durante 6 meses, ou

seja, os testes mostraram que a quantidade de UFC do material tem correlação com o tempo.

A hipótese nula do teste de *S. cerevisiae* (x=12 meses) foi rejeitada, uma vez que o valor-P foi menor que 0,05, demonstrando que existe correlação significativa entre o tempo e a quantidade de UFC das alíquotas dentro dos frascos. Em contrapartida, esse valor foi bem alto nos testes com *C. neoformans* (x=12 meses), *C. gattii* (x=12 meses) e *C. albicans* (x=12 meses).

Diante da avaliação de todos os parâmetros em conjunto, a validade de armazenamento de cada material foi definida. *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 e *C. albicans* CFRVS MRC 40006 se apresentaram estáveis por 12 meses, quando armazenados a -20 °C. Já *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001 apresentou estabilidade de armazenamento de apenas 5 meses.

Tabela 13 - Principais parâmetros gerados no cálculo do teste de regressão linear dos diferentes MRC

Parâmetros da análise de regressão	<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001	
	X = 12 meses	X = 12 meses	X = 12 meses	X = 12 meses	X = 6 meses	X = 5 meses	
R <sup>2</sup>	0,000107898	0,005102041	0,093633836	0,705673438	0,346852374	0,188229871	
F de significação	0,973133182	0,816628041	0,309258379	0,000325504	0,218725309	0,465454376	
Variável X	Coefficiente	-0,005494505	-0,021978022	-1,098901099	-3,818681319	-4,028571429	-3,5
	Erro padrão	0,159478393	0,092535754	1,030855282	0,743583797	2,764104215	3,267389376
	valor-P	0,973133182	0,816628041	0,309258379	0,000325504	0,218725309	0,748137947

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: C - *Cryptococcus*; C - *Candida*; S - *Saccharomyces*; MRC - Material de Referência Certificado; R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação; F - razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos.

Para o cálculo das incertezas inerentes à estabilidade em longo prazo, foi utilizado o parâmetro “Erro padrão”, o qual foi multiplicado pelo tempo em meses de estudo, que variou de acordo com o resultado da estabilidade de cada MRC (TABELA 14).

Tabela 14 - Incertezas inerentes à estabilidade em longo prazo dos diferentes MRC

MRC	<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001
Tempo (Variável X)	T = 12 meses	T = 12 meses	T = 12 meses	T = 5 meses
$u_{\text{estabLP}}$	1,9 UFC/100 $\mu$ L	1,1 UFC/100 $\mu$ L	12 UFC/100 $\mu$ L	16 UFC/100 $\mu$ L

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: C - *Cryptococcus*; C – *Candida*; S – *Saccharomyces*; MRC – Material de Referência Certificado; T – Tempo;  $u_{\text{estabLP}}$  – incerteza inerente à estabilidade; UFC – Unidade Formadora de Colônia.

#### 4.6 Estudo de estabilidade em curto prazo e avaliação estatística

As **Tabelas 15, 16, 17 e 18** contêm os dados referentes ao estudo de estabilidade em curto prazo dos lotes produzidos de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324, *C. albicans* CFRVS MRC 40006 e *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, respectivamente, representando o número de colônias presentes em cada uma das cinco placas de YMA referentes a cada frasco analisado. Para cada lote, foram testadas três diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 35 °C) em um prazo de sete dias. Para cada dia o teste foi realizado em triplicata.

Em todos os testes o resultado da avaliação da pureza se apresentou satisfatório, não sendo encontrada nenhuma contaminação.

Nas tabelas, os valores marcados com asterisco representam aqueles encontrados como aberrantes na análise por meio do teste de Grubbs, utilizando o *software* GraphPad Prism7, por isso esses valores foram excluídos antes de calcular a mediana dos valores de cada Tempo.

Em todos os testes, foi verificada a pureza do material de cada frasco, e em todos o resultado se apresentou satisfatório.

Tabela 15 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, frente a três diferentes temperaturas

Resultados do Teste de Estabilidade em Curto Prazo																		
<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323																		
Temperatura: 4 ° C							Temperatura: 25 ° C						Temperatura: 35 ° C					
tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)					frascos	contagens (UFC/100µL)					frascos	contagens (UFC/100µL)				
1º dia	146	38	42	30	29	28	15	33	42	43	35	45	17	19	24	17	17	27
	130	26	31	33	30	41	138	28	27	56	26	30	13	16	38	28	30	26
	142	32	35	26	42	29	100	33	31	40	31	36	160	11	20	15	27	23
2º dia	198	31	37	34	29	35	107	33	27	37	30	40	168	23	31	31	35	23
	60	36	29	40	38	41	181	34	39	32	34	38	89	19	24	21	24	26
	177	25	22	32	31	19	102	35	69*	36	45	30	71	22	24	14	32	34
3º dia	28	29	37	39	31	31	41	33	41	47	33	50	8	19	17	9	10	11
	176	27	27	33	32	31	52	27	43	30	31	29	145	25	23	24	22	23
	109	36	30	31	47*	32	76	37	36	35	47	36	38	20	24	29	32	18
4º dia	82	40	47	47	44	42	169	26	44	35	33	39	31	28	25	30	24	34
	182	25	28	28	24	29	69	30	36	34	41	33	87	17	21	24	31	30
	98	29	31	81*	47	21	119	32	39	38	35	28	173	23	38	31	40	40
5º dia	132	40	35	32	36	35	194	19	29	47	30	33	27	24	27	23	22	24
	70	24	23	29	29	37	80	63	35	33	18	27	103	23	29	27	22	26
	113	37	33	30	31	30	40	30	32	31	28	55	23	18	18	22	13	22
6º dia	163	27	32	32	31	34	56	30	35	25	59	34	16	39	24	24	37	37
	170	30	43	40	20	44	148	62	29	63	48	42	185	26	33	29	22	39
	184	32	21	30	31	27	106	39	28	42	35	47	120	29	33	50	41	40
7º dia	133	45	26	29	26	30	137	30	26	28	35	34	117	35	27	35	38	25
	84	38	35	31	26	27	65	37	31	48	38	36	156	33	29	27	36	38
	68	21	44	41	36	33	197	33	35	39	37	39	101	26	35	29	41	25

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: *C.* – *Cryptococcus*; UFC – Unidade Formadora de Colônia; MRC – Material de Referência Certificado; \* - valores aberrantes.

Tabela 16 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de *C. gattii* CFRVS MRC 40324, frente a três diferentes temperaturas

Resultados do Teste de Estabilidade em Curto Prazo																		
<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324																		
Temperatura: 4 °C						Temperatura: 25 °C						Temperatura: 35 °C						
tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)				frascos	contagens (UFC/100µL)				frascos	contagens (UFC/100µL)						
1º dia	92	15	16	18	17	13	9	10	20	10	15	22	194	9	13	15	23	25
	57	11	21	21	11	20	3	14	20	15	17	17	115	5	8	6	4	9
	116	17	22	14	21	17	163	7	8	5	5	5	187	15	22	15	15	18
2º dia	4	21	25	19	24	13	161	19	15	19	21	15	139	11	23	25	22	18
	7	22	15	14	19	16	97	19	25	19	18	12	63	12	8	13	6	9
	168	17	13	10	15	14	157	14	12	25	13	16	59	14	11	15	23	18
3º dia	159	18	10	15	12	21	64	15	15	29*	16	10	119	16	22	19	12	12
	130	14	18	13	20	15	50	11	7	9	10	11	150	7	3	10	12	11
	71	16	15	18	22	11	30	8	7	6	15	5	75	11	7	6	8	7
4º dia	72	21	12	16	7	8	193	14	13	21	22	10	189	16	12	12	14	12
	41	16	13	21	12	11	176	16	8	13	16	18	73	23	20	12	18	15
	51	10	14	14	15	12	147	8	11	10	21	24	36	19	9	13	13	10
5º dia	95	14	9	10	14	10	196	15	16	10	5	8	169	13	17	6	9	8
	39	15	17	18	20	20	84	20	14	15	26	24	86	12	8	12	10	8
	22	15	7	11	13	9	136	17	17	18	14	19	76	19	19	17	20	17
6º dia	182	6	13	13	15	14	83	23	18	18	20	24	66	15	14	16	17	14
	105	9	17	9	9	15	58	10	13	25	20	19	154	13	9	11	16	5
	12	18	19	24	26	19	145	19	12	11	17	14	104	14	12	13	9	14
7º dia	60	19	17	24	20	19	135	11	18	19	14	15	171	17	17	6	17	16
	17	16	15	16	18	12	172	11	16	13	18	12	69	17	18	23	23	23
	146	11	21	16	9	14	152	13	10	14	18	11	162	11	16	15	17	18

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Cryptococcus*; UFC – Unidade Formadora de Colônia; MRC – Material de Referência Certificado; \* - valor aberrante



Tabela 17 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de *C. albicans* CFRVS MRC 40006, frente a três diferentes temperaturas

Resultados do Teste de Estabilidade em Curto Prazo																		
<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006																		
Temperatura: 4 °C							Temperatura: 25 °C						Temperatura: 35 °C					
tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)					frascos	contagens (UFC/100µL)					frascos	contagens (UFC/100µL)				
1º dia	127	42	59	41	48	50	121	38	53	43	55	53	22	22	19	18	13	13
	3	21	32	27	28	22	10	22	33	27	20	23	59	6	15	10	17	21
	21	40	25	35	22	26	185	43	46	46	47	45	178	32	29	25	36	24
2º dia	125	76	77	63	57	70	46	24	22	25	30	23	117	41	37	31	37	36
	60	26	23	17	17	24	31	20	25	23	23	28	134	36	40	42	34	55
	75	11	12	8	6	11	188	52	31	54	51	48	57	12	17	19	11	6
3º dia	163	46	57	56	54	42	42	24	26	29	32	23	94	18	12	12	13	16
	124	50	60	71	78	61	92	17	16	26	14	15	44	17	19	27	20	24
	11	35	34	46	42	33	182	43	47	43	48	32	111	33	37	38	40	42
4º dia	177	67	75	57	53	64	191	23	30	29	29	25	89	14	20	17	18	20
	33	32	44	38	28	34	159	42	53	43	54	48	195	33	31	28	35	27
	138	51	49	45	36	54	190	54	31	38	43	55	108	49	59	61	48	52
5º dia	52	19	30	32	20	17	176	45	56	58	56	63	76	18	11	19	15	18
	101	16	17	17	24	17	1	14	13	20	15	35	40	12	19	11	20	24
	23	20	36	34	20	45	8	31	27	33	43	28	85	19	33	26	24	19
6º dia	151	48	58	55	65	56	120	66	61	60	54	43	140	34	66	37	49	53
	126	32	54	51	49	42	41	34	30	34	19	32	39	22	14	21	23	16
	144	64	44	53	52	47	20	51	34	33	33	32	95	11	24	24	13	17
7º dia	198	32	37	30	42	38	162	50	56	48	50	41	49	26	20	36	23	25
	181	37	49	48	42	48	175	54	67	49	53	66	50	30	39	28	33	41
	119	68	62	54	69	68	131	57	61	63	56	51	107	38	49	56	59	60

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Candida*; UFC – Unidade Formadora de Colônia; MRC – Material de Referência Certificado

Tabela 18 - Dados referentes aos resultados do estudo de estabilidade em curto prazo de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, frente a três diferentes temperaturas

Resultados do Teste de Estabilidade em Curto Prazo																		
<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001																		
Temperatura: 4 °C						Temperatura: 25 °C						Temperatura: 35 °C						
tempo	frascos	contagens (UFC/100µL)				frascos	contagens (UFC/100µL)				frascos	contagens (UFC/100µL)						
1º dia	139	22	23	23	20	28	76	8	14	3	3	3	184	2	2	1	2	6
	40	46	63	59	53	67	94	7	8	9	5	2	123	26	39	37	39	30
	100	27	21	26	27	20	84	7	8	6	4	8	111	1	3	1	8	4
2º dia	64	16	24	22	15	24	28	3	7	4	2	4	65	1	4	1	2	2
	130	16	24	19	25	19	124	4	3	3	4	6	52	1	1	1	2	2
	150	24	27	32	28	24	149	3	3	3	4	9	98	1	5	2	2	3
3º dia	53	21	23	18	26	27	18	2	5	5	4	1	148	1	2	2	4	1
	120	15	23	20	21	17	93	3	4	2	4	2	17	27	41	38	31	47
	155	16	27	20	18	23	175	7	4	4	7	2	91	4	1	4	4	2
4º dia	116	12	13	17	37	31	89	3	3	3	3	1	173	45	45	71	56	69
	174	20	16	8	18	28	11	4	8	1	3	2	46	4	3	4	2	2
	8	24	31	28	31	34	56	2	6	7	6	1	38	4	5	4	10	3
5º dia	187	35	35	39	44	46	137	15	16	14	9	10	180	3	4	3	4	10
	144	25	44	38	28	32	43	10	7	6	9	8	12	2	7	6	5	5
	134	42	42	41	47	48	24	8	9	7	10	9	36	3	5	7	6	4
6º dia	45	36	34	41	33	42	85	12	10	8	13	17	198	7	5	9	4	5
	146	19	18	21	20	22	32	6	12	12	17	10	77	70	69	74	61	88
	70	28	28	36	22	31	30	7	8	15	6	10	80	2	3	4	5	2
7º dia	131	50	48	41	47	32	78	8	4	8	8	6	177	42	46	54	54	62
	147	34	38	40	37	32	164	10	10	12	13	18	39	5	10	10	8	8
	25	35	24	32	33	36	26	16	13	8	7	23	21	8	5	1	9	8

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: S. – *Saccharomyces*; UFC – Unidade Formadora de Colônia; MRC – Material de Referência Certificado

### Avaliação estatística – *C. neoformans* CFRVS MRC 40323

Após a análise de valores aberrantes, foi calculada a mediana dos valores para cada material, nas diferentes temperaturas, para então realizar a avaliação estatística dos dados por meio do teste de regressão linear. A mediana foi calculada para cada dia referente a cada temperatura diferente (**TABELA 19**).

Tabela 19 - Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323

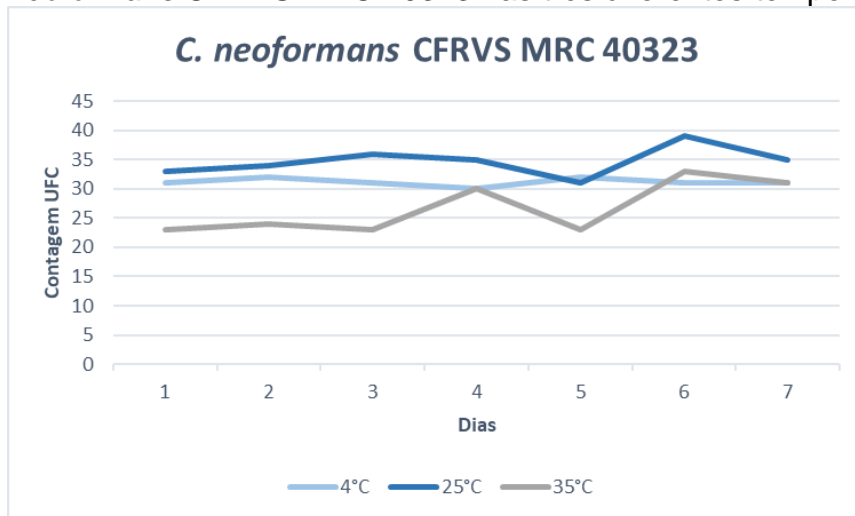
<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323			
Período de análise (variável X)	4 °C (UFC/100µL)	25 °C (UFC/100µL)	35 °C (UFC/100µL)
1º dia	31	33	23
2º dia	32	34	24
3º dia	31	36	23
4º dia	30	35	30
5º dia	32	31	23
6º dia	31	39	33
7º dia	31	35	31

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Cryptococcus*; MRC – Material de Referência Certificado; UFC – Unidade Formadora de Colônia

O gráfico que ilustra a variação das medianas nas três diferentes temperaturas durante sete dias está expresso na **Figura 4**, em que se observa um resultado constante nas avaliações das diferentes temperaturas.

Figura 4 - Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 nas três diferentes temperaturas



Fonte: SOUTO, 2016.

Após o cálculo das medianas, o teste de regressão linear foi aplicado utilizando o programa Microsoft Excel 2016. A **Tabela 20** apresenta os principais parâmetros gerados na análise e que auxiliam na interpretação da estabilidade do material.

Os critérios de avaliação foram os mesmos utilizados na avaliação da estabilidade em longo prazo. O material se mostrou mais estável quando estudado nas temperaturas de 4 °C e 25 °C, visto que, avaliando os parâmetros gerados na análise de regressão linear, o valor de  $R^2$  para essas duas temperaturas foi bem menor. De qualquer forma, as três temperaturas cumpriram com os critérios que indicam a estabilidade do material, já que os valores de F de significação e os valores de P se apresentaram maiores que 0,05, que é o nível de significância do teste.

Tabela 20 - Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, frente a três diferentes temperaturas

<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323			
Parâmetros da análise de regressão	4 °C	25 °C	35 °C
	X = 7 dias	X = 7 dias	X = 7 dias
$R^2$	0,0125	0,096711799	0,53649635
F de significação	0,811380698	0,497209629	0,061188078
Variável X Coeficiente	-0,035714286	0,357142857	1,5
Erro padrão	0,141961478	0,488124273	0,623518653
valor-P	0,811380698	0,497209629	0,061188078

Fonte: SOUTO, 2016

Legenda: C - *Cryptococcus*; MRC – Material de Referência Certificado;  $R^2$  – Coeficiente de determinação; F - razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos

Para o cálculo da incerteza inerente à estabilidade em curto prazo de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, o valor do erro padrão foi multiplicado pelo tempo de estudo, que neste caso foram 7 dias. Sendo assim, a incerteza relativa ao transporte a 4 °C é igual a **0,99 UFC/100 $\mu$ L**, o valor referente ao transporte a 25 °C é **3,42 UFC/100 $\mu$ L** e o referente ao transporte a 35 °C é **4,36 UFC/100 $\mu$ L**.

### Avaliação estatística – *C. gattii* CFRVS MRC 40324

Após o cálculo das medianas dos valores referentes aos sete dias de estudo nas diferentes temperaturas (**TABELA 21**), foi gerado um gráfico para demonstrar a variação desses dados, em que podemos observar uma maior estabilidade nos valores referentes ao estudo a 4 °C (**FIGURA 5**).

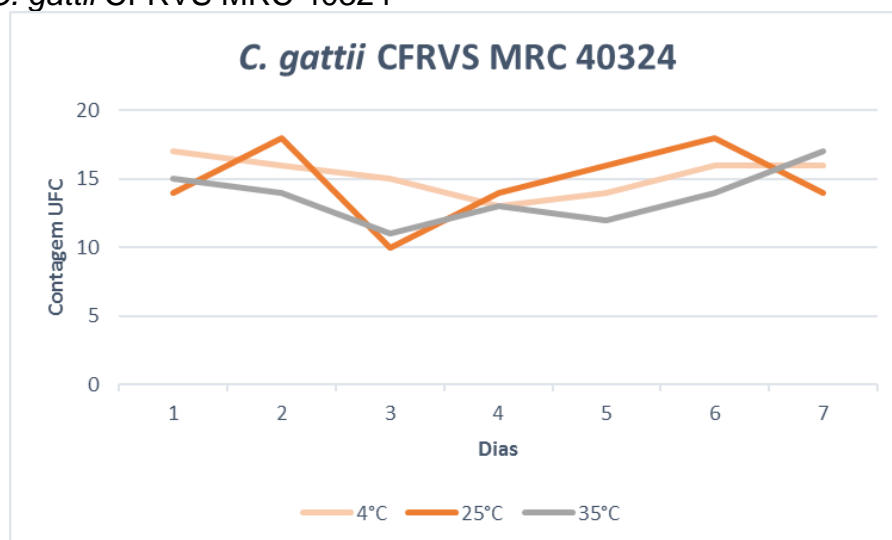
Tabela 21 - Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura diferente do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de *C. gattii* CFRVS MRC 40324

<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324			
Período de análise (variável X)	4 °C (UFC/100µL)	25 °C (UFC/100µL)	35 °C (UFC/100µL)
1º dia	17	14	15
2º dia	16	18	14
3º dia	15	10	11
4º dia	13	14	13
5º dia	14	16	12
6º dia	16	18	14
7º dia	16	14	17

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Cryptococcus*; MRC – Material de Referência Certificado; UFC – Unidade Formadora de Colônia.

Figura 5 - Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de *C. gattii* CFRVS MRC 40324



Fonte: SOUTO, 2016.

O teste de regressão linear foi aplicado também para o material *C. gattii* CFRVS MRC 40324, gerando resultados que indicam estabilidade durante 7 dias para o transporte nas três diferentes temperaturas. Os valores de  $R^2$ , de F de significação e valor-P aceitam a hipótese nula de que o tempo não se correlaciona com os valores de UFC avaliados, como mostrado na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, frente a três diferentes temperaturas

		<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324		
Parâmetros da análise de regressão		4 °C	25 °C	35 °C
		X = 7 dias	X = 7 dias	X = 7 dias
	$R^2$	0,05	0,027439024	0,074695122
	F de significação	0,629811871	0,722630582	0,553157011
Variável X	Coeficiente	-0,142857143	0,214285714	0,25
	Erro padrão	0,278479838	0,570535016	0,393505958
	valor-P	0,629811871	0,722630582	0,553157011

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C - *Cryptococcus*; MRC – Material de Referência Certificado;  $R^2$  – Coeficiente de determinação; F - razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos.

O cálculo da incerteza foi realizado utilizando os valores do erro padrão, então a incerteza inerente ao transporte a 4 °C é igual a **1,95 UFC/100 $\mu$ L**, o valor referente ao transporte a 25 °C é **3,99 UFC/100 $\mu$ L** e a incerteza referente ao transporte a 35 °C é **2,75 UFC/100 $\mu$ L**.

#### **Avaliação estatística – *C. albicans* CFRVS MRC 40006**

Para o material *C. albicans* CFRVS MRC 40006, assim como para os materiais anteriores, foram calculadas as medianas dos valores gerados nos estudos com as diferentes temperaturas por sete dias (**TABELA 23**). O gráfico elaborado indica variação dos valores, porém não há decréscimo constante em nenhuma temperatura avaliada, sendo esses valores concentrados nas faixas entre 20 e 50 UFC durante o estudo integral (**FIGURA 6**).

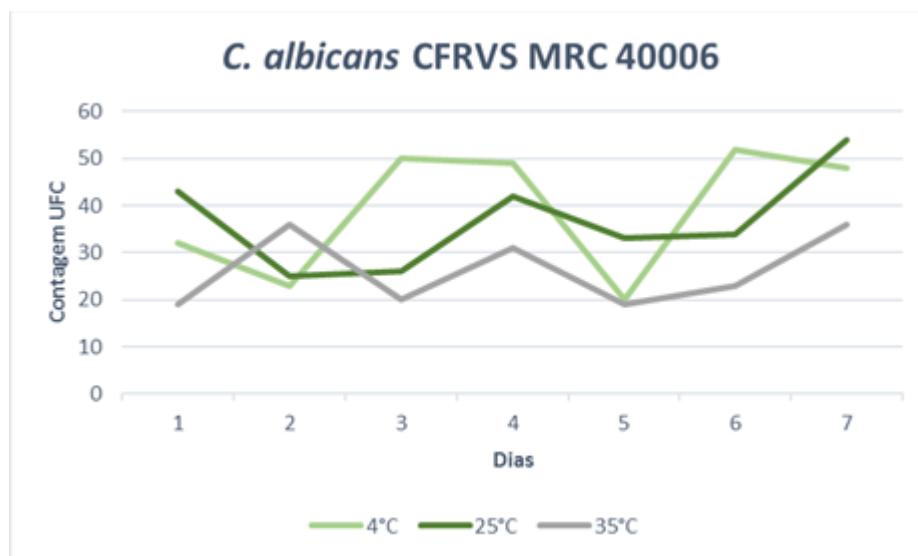
Tabela 23 - Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura diferente do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de *C. albicans* CFRVS MRC 40006

<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006			
Período de análise (variável X)	4 °C (UFC/100µL)	25 °C (UFC/100µL)	35 °C (UFC/100µL)
1º dia	32	43	19
2º dia	23	25	36
3º dia	50	26	20
4º dia	49	42	31
5º dia	20	33	19
6º dia	52	34	23
7º dia	48	54	36

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C. – *Candida*; MRC – Material de Referência Certificado; UFC – Unidade Formadora de Colônia.

Figura 6 - Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de *C. albicans* CFRVS MRC 40006



Fonte: SOUTO, 2016.

Ao analisar os dados da aplicação do teste de regressão linear, aplicando os mesmos critérios adotados para o estudo da estabilidade em curto prazo dos materiais anteriores, observou-se que o material é estável em todas as temperaturas estudadas (**TABELA 24**).

Tabela 24 - Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de *C. albicans* CFRVS MRC 40006, frente a três diferentes temperaturas

<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006			
Parâmetros da análise de regressão	4 °C	25 °C	35 °C
	X = 7 dias	X = 7 dias	X = 7 dias
R <sup>2</sup>	0,181452626	0,187890974	0,055987558
F de significação	0,34062904	0,331266008	0,609456509
Variável X	Coeficiente	2,714285714	2,071428571
	Erro padrão	2,578165777	1,925924109
	valor-P	0,34062904	0,331266008

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: C – *Candida*; MRC – Material de Referência Certificado; R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação; F - razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos.

Para o cálculo da incerteza, foram utilizados os valores do erro padrão, sendo assim, a incerteza inerente ao transporte a 4 °C é igual a **18,04 UFC/100µL**, a incerteza referente ao transporte a 25 °C é **13,48 UFC/100µL** e o valor ligado ao transporte a 35 °C é **11,01 UFC/100µL**.

#### **Avaliação estatística – *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001**

Para o material *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, as medianas foram calculadas e, observando a **Tabela 25** e a **Figura 7**, podemos verificar uma queda na quantidade de colônias recuperadas após o período de incubação a 25 °C e 35 °C.



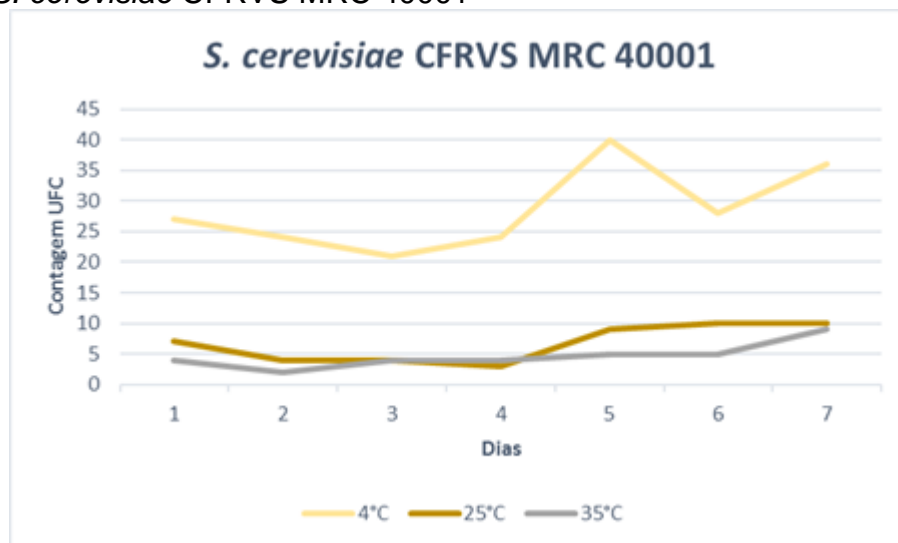
Tabela 25 - Mediana dos valores de cada dia referente a cada temperatura do estudo de estabilidade em curto prazo do lote de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001

<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001			
Período de análise (variável X)	4 °C (UFC/100µL)	25 °C (UFC/100µL)	35 °C (UFC/100µL)
1º dia	27	7	4
2º dia	24	4	2
3º dia	21	4	4
4º dia	24	3	4
5º dia	40	9	5
6º dia	28	10	5
7º dia	36	10	9

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: S. – *Saccharomyces*; MRC – Material de Referência Certificado; UFC – Unidade Formadora de Colônia.

Figura 7 - Gráfico das medianas calculadas no estudo de estabilidade em curto prazo de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001



Fonte: SOUTO, 2017.

Ao aplicar o teste de regressão linear, foi confirmado que o transporte a 35 °C de fato interferiu na estabilidade do material, visto que o F de significação e o valor-P foram menores que 0,05. Para as temperaturas de 4 °C e 25 °C, o material se apresentou estável (**TABELA 26**). Os valores de incerteza para essas temperaturas foram **8,01 UFC/100µL** e **3,30 UFC/100µL**, respectivamente.

Tabela 26 - Principais parâmetros gerados na análise de regressão linear para o estudo de estabilidade em curto prazo de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, frente a três diferentes temperaturas

<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001			
Parâmetros da análise de regressão	4 °C	25 °C	35 °C
	X = 7 dias	X = 7 dias	X = 7 dias
R <sup>2</sup>	0,361966236	0,43556701	0,630208333
F de significação	0,152958256	0,106700172	0,033048396
Variável X	Coeficiente	0,928571429	0,785714286
	Erro padrão	1,14508711	0,269163481
	valor-P	0,152958256	0,106700172

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: S – *Saccharomyces*; MRC – Material de Referência Certificado; R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação; F - razão entre as variâncias entre e dentro dos frascos.

#### 4.7 Caracterização quantitativa

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, foram realizados testes com três diferentes analistas e o tratamento estatístico aplicado foi o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, que é utilizado quando se deseja testar a hipótese de que várias amostras tem a mesma distribuição. O teste foi realizado com o auxílio da ferramenta *Action Stat* ([www.portalaction.com.br](http://www.portalaction.com.br)) que se integra ao Microsoft Excel 2016.

Esse teste foi aplicado já que o estudo trata da comparação de três grupos independentes.

O P-valor é o parâmetro utilizado na interpretação do teste, teoricamente, se esse valor for maior que o nível de significância (0,05), não é possível rejeitar a hipótese nula de que, em média, os três testes com os diferentes analistas possuem a mesma distribuição. Isso significaria que o analista que realiza o teste não influencia no resultado final, as diferenças entre as medianas não são estatisticamente significativas.

Na avaliação do valor de propriedade quantitativo dos diferentes lotes de materiais produzidos neste estudo, todos os valores de P-valor foram maiores que 0,05, conforme demonstrado na **Tabela 27** sendo assim o teste se apresentou

reprodutível. Os valores de P-valor ajustado representam o valor de comparação de cada analista (A, B e C), e todos os valores também foram superiores a 0,05.

Tabela 27 - Parâmetros gerados na aplicação do teste de Kruskal-Wallis para os diferentes lotes de materiais

CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA				
Parâmetros Kruskal-Wallis	<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001
P-valor	0,085008445	0,083410352	0,073165836	0,060728147
P-valor ajustado	A-B	0,524086	0,800916	0,175444
	A-C	0,229424	0,120648	0,056556
	B-C	0,091086	0,138832	0,450934

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: A – Analista A, B – Analista B, C – Analista C, C. – *Cryptococcus*, C. – *Candida*, S. – *Saccharomyces*.

Para o cálculo da incerteza inerente à caracterização, foi calculada a mediana dos valores gerados nos testes realizados por cada analista e, então, foi calculado o desvio padrão, que foi o representante da incerteza ( $u_{car}$ ) desta etapa (**TABELA 28**).

Tabela 28 - Valores de propriedade dos diferentes MRC e suas incertezas

MRC	Valor de propriedade (UFC/100 $\mu$ L)	$u_{car}$ (UFC/100 $\mu$ L)
<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	33	4,1
<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	15	1,7
<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	46	13
<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001	45	7,8

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: UFC – Unidade Formadora de Colônia;  $u_{car}$  – incerteza inerente à caracterização dos materiais.

## 4.8 Caracterização taxonômica

### 4.8.1 Caracterização fenotípica

#### 4.8.1.1 Aspectos macroscópicos, microscópicos e avaliação fisiológica de *Cryptococcus spp.*

Os primeiros testes realizados com as cepas de *Cryptococcus spp.*, pertencentes ao acervo da CFRVS/Fiocruz, foram o teste da presença de fenoloxidase, teste da diferenciação entre *C. neoformans* e *C. gattii* por meio do ágar CGB e a avaliação fisiológica utilizando o Método Automatizado Vitek 2, como mostra a **Tabela 29**.

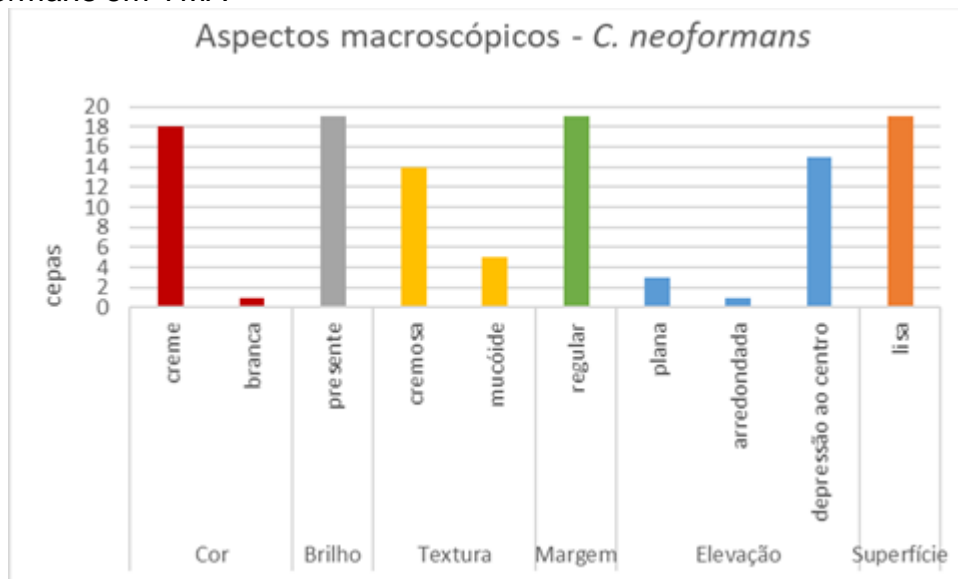
A síntese de melanina foi observada em todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* estudadas, confirmando a sua natureza fenoloxidase positiva, diferente das cepas de *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. podzolicus* e *C. humicola*. Além disso, o teste de CGB diferenciou todas as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo negativo para o primeiro e positivo para *C. gattii*. Para as cepas de *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. podzolicus* e *C. humicola* esse teste não se aplica, não sendo então realizado (**TABELA 29**).

Além desses dois testes imprescindíveis para a caracterização fenotípica de *Cryptococcus spp.*, os aspectos macroscópicos do crescimento em YMA foram observados e estão registrados detalhadamente no **Apêndice C**.

A **Figura 8** ilustra o perfil da macroscopia de *C. neoformans*, em que observamos pouca variação na cor da colônia, porém diferenças significativas na textura e elevação das colônias. Já as cepas de *C. gattii* apresentam considerável variação apenas no tipo de elevação das colônias, quanto à textura, apenas uma cepa dentre as 11 de *C. gattii* se apresentou cremosa, enquanto as outras tiveram textura mucóide (**FIGURA 9**). Essas duas espécies são muito semelhantes quanto aos aspectos macroscópicos, e essa aproximação também ocorre com as outras espécies estudadas. *C. laurentii* e *C. podzolicus* apresentam características idênticas à maioria das cepas de *C. neoformans*, já as características de *C. albidus* são bem semelhantes as de *C. gattii*. Apenas *C. humicola* se diferencia um pouco mais das outras espécies por possuir colônias com pouco brilho, quase opacas, enquanto todas as outras apresentam brilho intenso.

Os aspectos microscópicos de *C. neoformans* e *C. gattii* foram expressos de forma idêntica em todas as cepas dessas espécies, sendo observadas características que compreendem a presença de brotamento, forma celular globosa e agrupamento simples. *C. albidus* é a outra espécie que mais se assemelha às duas anteriores, já *C. laurentii*, *C. podzolicus* e *C. humicola* apresentaram forma celular diferente das outras.

Figura 8 - Aspectos macroscópicos observados a partir do crescimento das cepas de *C. neoformans* em YMA



Fonte: SOUTO, 2017.

Em relação às dimensões das colônias, foram medidas três células de cada lâmina referente à determinada cepa. Todas as dimensões se encontram dentro do previsto e de acordo com o descrito na literatura, esses registros estão detalhados no **Apêndice C** deste trabalho.

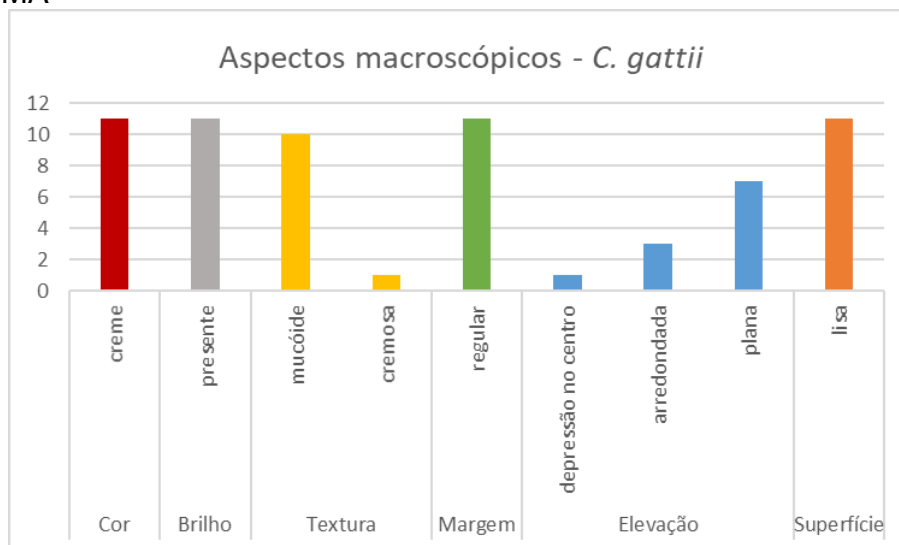
Tabela 29 - Resultados dos testes de presença de Fenoxidase, teste de CGB e avaliação fisiológica por método automatizado Vitek 2 das cepas de *Cryptococcus*

<i>Cryptococcus</i> spp.						
Fungo	Nº de acesso na Fiocruz/CFRVS	Origem	Presença de Fenoxidase	Teste de CGB	Avaliação fisiológica Vitek 2	Probabilidade
<i>Cryptococcus laurentii</i>	CFRVS 40043	ATCC 44096	Fenoxidase -	Não se aplica	<i>C. laurentii</i>	99%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40044	ATCC 32045	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	94%
<i>Cryptococcus albidus</i>	CFRVS 40077	ATCC 10666	Fenoxidase -	Não se aplica	<i>C. albidus</i>	98%
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 40113	ATCC 32269	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	96%
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. B	CFRVS 40122	ATCC 24065	Fenoxidase +	Negativo	Não identificado	-
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40123	ATCC 28957	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	99%
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40124	ATCC 34868	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	99%
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 40141	ATCC 56990	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	95%
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40142	ATCC 28958	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. C	CFRVS 40143	ATCC 24066	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	94%
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. AD	CFRVS 40150	ATCC 48184	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. C	CFRVS 40166	ATCC 32608	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	94%
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. A	CFRVS 40168	ATCC 34872	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. D	CFRVS 40192	ATCC 32719	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CFRVS 40193	ATCC 52817	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CFRVS 40215	CBS 6901	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40218	CBS 7000	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	97%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40221	ATCC 66031	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	CFRVS 40232	CBS 7717	Fenoxidase -	Não se aplica	ausente no banco de dados	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40282	ATCC 90112	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40283	ATCC 90113	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus humicola</i>	CFRVS 40292	ATCC 64676	Fenoxidase -	Não se aplica	ausente no banco de dados	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> MRC 40323	CFRVS MRC 40323	CFRVS 40323	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus gattii</i> MRC 40324	CFRVS MRC 40324	CFRVS 40324	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	92%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 70295	WM 148	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 70296	WM 626	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 70297	WM 628	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	98%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 70301	WM 629	Fenoxidase +	Negativo	<i>C. neoformans</i>	94%
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 70298	WM 179	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	95%
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 70302	WM 178	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	94%
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 70299	WM 161	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	94%
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 70300	WM 779	Fenoxidase +	Positivo	<i>C. neoformans</i> *	94%

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: var. – variedade; sor. - sorotipo; C. – *Cryptococcus*; ATCC – American Type Culture Collection; CBS – Central Bureau of Fungal Cultures; \*Identificação incorreta.

Figura 9 - Aspectos macroscópicos observados a partir do crescimento das cepas de *C. gattii* em YMA



Fonte: SOUTO, 2017.

Outro teste realizado foi o crescimento das culturas em caldo YM, incubados em duas diferentes temperaturas: 25 °C e 36 °C (**APÊNDICE C**). Todas as cepas estudadas, com exceção de *C. laurentii*, apresentaram resultado positivo apenas para o sedimento, independente da temperatura de incubação. *C. laurentii* foi a única cepa estudada que apresentou película ao final da incubação a 25 °C.

Testes utilizando o sistema automatizado Vitek 2 também foram realizados, a fim de aferir mais uma técnica de caracterização das cepas deste estudo. Avaliando os resultados gerados, foi constatada a impossibilidade em diferenciar as cepas referentes à espécie *C. neoformans* daquelas referentes à *C. gattii*. Essas duas espécies apresentam uma única identificação como *C. neoformans*. Já *C. albidus* CFRVS 40077 e *C. laurentii* CFRVS 40043 foram identificadas corretamente, porém para a autenticação de *C. podzolicus* CFRVS 40232 e *C. humicola* CFRVS 40292 não foi possível a utilização do sistema, uma vez que esses micro-organismos não compõem a lista de espécies que podem ser identificadas por meio do uso do cartão YST. Além disso, a cepa *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* sor. *B* CFRVS 40122 não foi identificada de acordo com o relatório gerado pelo sistema (**TABELA 29**).

#### 4.8.1.2 Aspectos macroscópicos, microscópicos e avaliação fisiológica de *Candida spp.*

Todas as cepas foram, a princípio, estriadas em YMA, a fim de avaliar a pureza das cepas antes de iniciar os outros testes, e como resultado, todas se apresentaram puras. Após o repique em YMA, todas as cepas foram inoculadas em Chromagar e, conforme apresentado na **Tabela 30**, o crescimento de todas as cepas de *C. albicans* e a de *C. dubliniensis* se apresentou conforme o estabelecido na literatura, exibindo colônias verdes, típicas de *C. albicans* principalmente.

Tabela 30 - Resultados do teste em Chromagar e avaliação fisiológica por método automatizado Vitek 2 das cepas de *Candida*

<i>Candida spp.</i>				
Fungo	Nº de acesso na Fiocruz/CFRVS	Repique em Chromagar	Avaliação fisiológica Vitek 2	Probabilidade
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40006	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	98%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40040	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40041	Colônias verdes	<i>C. albicans</i> / <i>C. rugosa</i> *	baixa discriminação
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40070	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40071	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i> sor. A	CFRVS 40119	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i> sor. B	CFRVS 40120	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	98%
<i>Candida dubliniensis</i>	CFRVS 40172	Colônias verdes	<i>C. dubliniensis</i>	98%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40175	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	98%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40176	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	98%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40177	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40178	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40179	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40260	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40277	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i>	CFRVS 40278	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i> MRC 40001 (frasco 61)	CFRVS MRC40006	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%
<i>Candida albicans</i> MRC 40001 (frasco 186)	CFRVS MRC40006	Colônias verdes	<i>C. albicans</i>	99%

Fonte: SOUTO, 2016.

Legenda: sor. – sorotipo; C. – *Candida*.

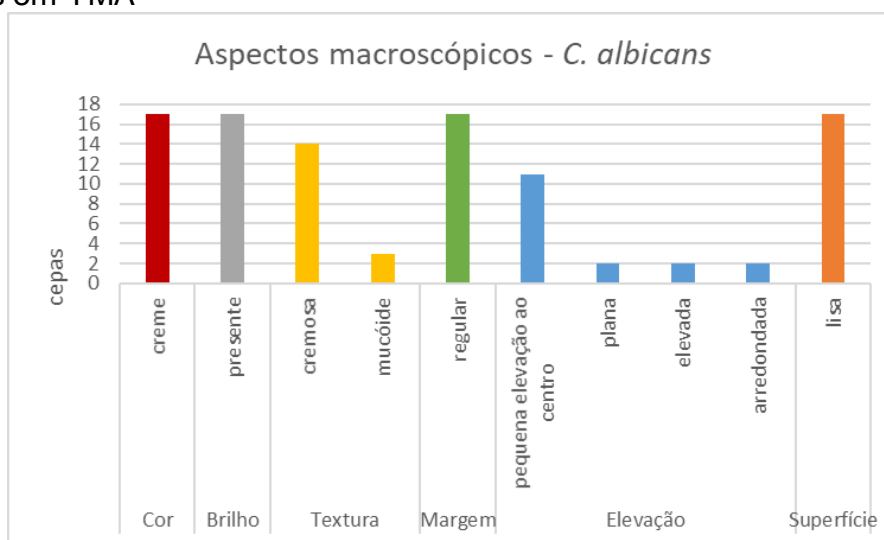
\*identificação incorreta

As cepas também foram inoculadas em YMA para avaliação dos aspectos macroscópicos das colônias. As cepas de *C. albicans* apresentaram variação na



elevação da colônia e na textura, sendo a maioria das colônias de textura cremosa com pequena elevação ao centro (**FIGURA 10**). *C. dubliniensis* se assemelha bastante com as cepas de *C. albicans*, porém a elevação da colônia é arredondada, compatível com poucos representantes da espécie (**APÊNDICE C**). De qualquer forma, a avaliação das duas espécies em relação aos aspectos macroscópicos leva a uma autenticação questionável.

Figura 10 - Aspectos macroscópicos observados a partir do crescimento das cepas de *C. albicans* em YMA



Fonte: SOUTO, 2017.

Os aspectos microscópicos das 18 cepas, incluindo *C. dubliniensis*, são bem semelhantes. Todas apresentam brotamento, possuem forma celular globosa e, em sua maioria, as cepas aparecem em grupos. A diferença encontrada foram algumas células elipsoidais na avaliação de *C. dubliniensis*. Além disso, as dimensões das células se encontravam dentro do especificado na literatura e estão registradas no **Apêndice C** deste trabalho. A maioria das cepas desenvolveu pseudo-hifas, que são de fato características dessas espécies.

Quanto ao teste de crescimento das culturas em caldo YM em duas diferentes temperaturas, todas as cepas apresentaram resultado positivo apenas para o sedimento, tanto a 25 °C, como a 36 °C, inclusive *C. dubliniensis*.

A avaliação fisiológica das cepas de *Candida* spp. por meio do sistema automatizado Vitek 2 gerou resultados concordantes com a identificação já estabelecida anteriormente pela CFRVS/Fiocruz, exceto a cepa *C. albicans* CFRVS 40041, que foi identificada como *C. albicans*/*C. rugosa*, porém este resultado

apresentou baixa discriminação. Esse tipo de resultado representa baixa discriminação entre as opções do banco de dados (abaixo de 50% de nível de confiança), não sugerindo uma autenticação confiável. Uma vez que todas as outras 16 cepas de *C. albicans* foram identificadas corretamente, acredita-se que houve algum erro de execução para essa amostra.

#### 4.8.1.3 *Avaliação dos aspectos macroscópicos, microscópicos e avaliação fisiológica de Saccharomyces spp.*

Todas as cepas foram inoculadas em YMA, com o propósito de avaliar suas características quanto à pureza antes de dar início aos testes seguintes, e o resultado se apresentou satisfatório. Após essa avaliação, foi realizada a pesquisa de ascósporos, sendo encontrados em todas as cepas, exceto em *S. uvarum* (**TABELA 31**).

Outro método de autenticação aplicado para essas cepas foi a avaliação fisiológica pelo sistema automatizado Vitek 2. As cepas de *S. cerevisiae* foram identificadas corretamente pelo método, porém *S. pastorianus* e *S. bayanus* também foram identificados como *S. cerevisiae*, sendo que apenas no teste com *S. pastorianus* o resultado foi gerado com baixa discriminação (**TABELA 31**).

Todas as cepas foram inoculadas em YMA para avaliação dos aspectos macroscópicos das colônias. As cepas de *S. cerevisiae* apresentaram perfil único, sem variação alguma, como apresentado no **Quadro 3**. O mesmo ocorreu quando os aspectos microscópicos foram analisados, com pequenas diferenças apenas nas dimensões das células.

*S. uvarum* e *S. pastorianus* apresentam características macroscópicas bem semelhantes às de *S. cerevisiae*, variando apenas a cor, que nesse caso são colônias brancas. *S. bayanus*, além da cor branca, difere na textura da colônia, pois apresentam colônias bem mucóides. Quanto aos aspectos microscópicos, a única espécie que expressa alguma diferença das outras é *S. pastorianus* por apresentar forma celular cilíndrica, além da globosa (**APÊNDICE C**).

O perfil de crescimento em caldo, a 25 °C e 36 °C, também foi o mesmo para todas as cepas. As leveduras não formaram anel ou película, apenas sedimento (**APÊNDICE C**).

Tabela 31 - Resultados da pesquisa de ascósporos nas cepas de *Saccharomyces* spp. e avaliação fisiológica por método automatizado Vitek 2

<i>Saccharomyces</i> spp.				
Fungo	Nº de acesso na Fiocruz/CFRVS	Ascosporos	Avaliação fisiológica Vitek 2	Probabilidade
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40001	presente	<i>S. cerevisiae</i>	99%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40002	presente	<i>S. cerevisiae</i>	99%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40003	presente	<i>S. cerevisiae</i>	98%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40083	presente	<i>S. cerevisiae</i>	99%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CFRVS 40125	presente	<i>S. cerevisiae</i>	94%
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CFRVS 40090	presente	<i>Candida spherica</i> / <i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	95%
<i>Saccharomyces uvarum</i>	CFRVS 40088	não observado	<i>Candida spherica</i> *	91%
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CFRVS 40235	presente	<i>S. cerevisiae</i> *	99%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MRC40001 (frasco 125)	CFRVS MRC 40001	presente	<i>S. cerevisiae</i>	99%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MRC40001 (frasco 170)	CFRVS MRC 40001	presente	<i>S. cerevisiae</i>	99%

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: S. – *Saccharomyces*

\* Identificação incorreta

Quadro 3 - Perfil apresentado por *S. cerevisiae* quanto aos aspectos macroscópicos e microscópicos

Parâmetros		<i>S. cerevisiae</i>
Aspectos macroscópicos	Cor	creme
	Superfície	lisa
	Brilho	presente
	Textura	cremosa
	Margem	regular
	Elevação	depressão no centro
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente
	Forma celular	globosa
	Agrupamento	maioria simples, alguns em par
	Dimensões	4,52x4,82µm / 3,21x4,08µm / 4,6x5,5µm

Fonte: SOUTO, 2017.

#### 4.8.1.4 Avaliação por MALDI-TOF MS

Três diferentes testes foram realizados utilizando todas as cepas de *Cryptococcus* spp., *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp. O primeiro teste foi realizado pelo analista A e o ácido fórmico foi utilizado no preparo das amostras na placa. Os resultados estão expressos na **Tabela 32**, para o teste com *Cryptococcus* spp, **Tabela 34**, para o teste realizado com *Candida* spp. e **Tabela 36**, para *Saccharomyces* spp.

Os outros dois testes foram executados pelo analista B, um teste foi realizado sem o uso de ácido fórmico, enquanto no outro foi utilizado o ácido fórmico no preparo das placas. Os resultados dos testes realizados pelo analista B estão expressos na **Tabela 33**, para o teste com *Cryptococcus* spp, **Tabela 35**, para o teste com *Candida* spp. e **Tabela 37**, para *Saccharomyces* spp.

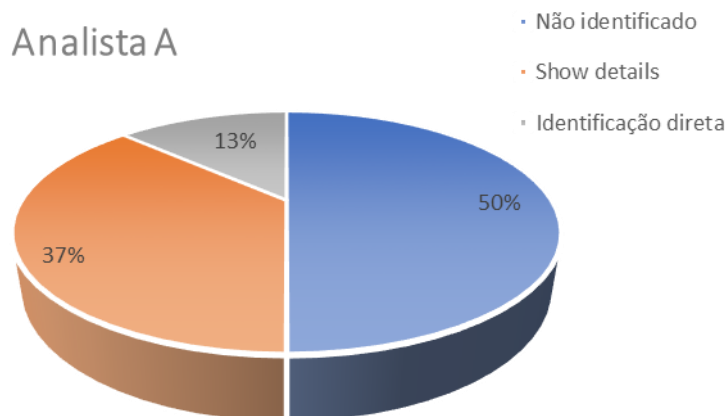
Como resultados dos testes as seguintes variáveis são apresentadas: não identificado, *show details* (identificação correta e identificação incorreta), identificação duvidosa, identificação incorreta e identificação direta. Os resultados do tipo *show details* ocorrem quando a porcentagem de pareamento (*matches*) dos espectros, ou seja, a comparação entre os espectros de massa gerados no teste e aqueles de referência do banco de dados, não atinge o valor de identificação de

70% (identificação direta), o que resultaria na identificação da cepa, porém apresenta similaridade (acima de 40% de *matches*) com alguma referência inserida no banco de dados, podendo resultar numa identificação correta ou incorreta. Já os resultados cujo termo atribuído é identificação duvidosa decorrem quando mais de uma espécie é identificada em uma mesma replicata.

A análise dos resultados foi realizada pelo número total de replicatas, já que os testes foram feitos em duplicata para cada amostra e, em alguns casos, pode ocorrer de cada replicata da mesma amostra apresentar um resultado diferente do outro. Os testes com *Cryptococcus* spp. totalizaram 66 replicatas para cada teste, com *Candida* spp., 36 replicatas e os testes com *Saccharomyces* spp., 20 replicatas.

Para os testes com *Cryptococcus* spp., realizados pelo analista A, 50% das amostras não foram identificadas. A identificação direta ocorreu apenas em 13% das amostras, porém para todos os resultados do tipo *show details*, as espécies indicadas estavam corretas (**FIGURA 11**).

Figura 11 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Cryptococcus* spp. realizada pelo Analista A



Fonte: SOUTO, 2017.

Tabela 32 - Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF, realizada pelo analista A, utilizando *Cryptococcus* spp.

Fungos	Nº das Amostras	Replicatas	%	Resultados
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40044	1	80,5	<i>C. neoformans</i>
		2	76.20	<i>C. neoformans</i>
<i>C. albidus</i>	CFRVS 40077	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. gattii</i>	CFRVS 40113	1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. B	CFRVS 40122	1		não identificado
		2		não identificado
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40123	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40124	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 40141	1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40142	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. C	CFRVS 40143	1		não identificado
		2		não identificado
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. AD	CFRVS 40150	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> sor. C	CFRVS 40166	1		não identificado
		2		não identificado
<i>F. neoformans</i> sor. A	CFRVS 40168	1		não identificado
		2		não identificado
<i>F. neoformans</i> sor. D	CFRVS 40192	1	84.00	<i>C. neoformans</i>
		2	80.50	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i>	CFRVS 40193	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i>	CFRVS 40215	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40218	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40221	1	84.00	<i>C. neoformans</i>
		2	94.50	<i>C. neoformans</i>
<i>C. podzolicus</i>	CFRVS 40232	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40282	1	91.00	<i>C. neoformans</i>
		2	88.00	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40283	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. humicola</i>	CFRVS 40292	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. neoformans</i>	CFRVS MRC 40323	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. gattii</i>	CFRVS MRC 40324	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70295	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70296	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70297	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70298	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70299	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70300	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70301	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70302	1		não identificado
		2	Show details	<i>C. gattii</i>

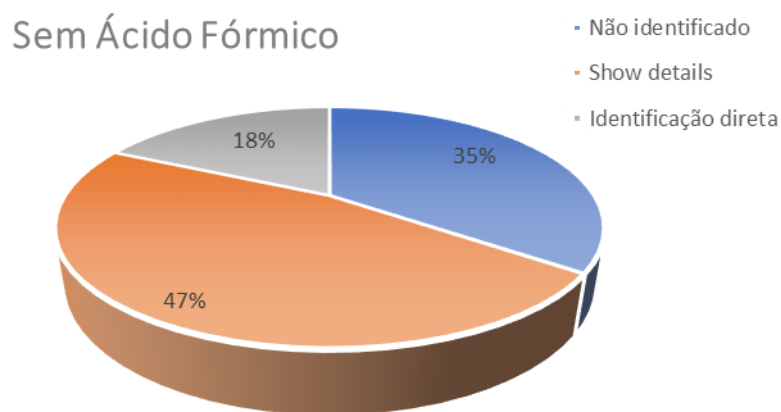
Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: C. – *Cryptococcus*; F. – *Filobasidiella*; var. – variedade; sor. – sorotipo.

Os testes com *Cryptococcus* spp., realizados pelo analista B, sem a utilização de ácido fórmico mostraram que 35% das replicatas não foram identificadas, enquanto que com o uso do ácido fórmico esse valor diminuiu para 18%. A identificação direta nos testes sem ácido fórmico ocorreu em apenas 18% das replicatas, o restante foi corretamente identificado dentro do grupo *show details* (47%) (**FIGURA 12**).

Já com o uso de ácido fórmico, a identificação direta aumentou para 33% das replicatas, e os resultados *show details* ocorreram em 49%, porém dentro desse número, apenas 87% foi identificado corretamente, não apresentando uma totalidade correta como nos testes sem ácido fórmico (**FIGURA 13**). Em resumo, somando a identificação direta e a identificação correta dentro do grupo *show details*, podemos observar um total de 65% de identificação das replicatas no teste sem ácido fórmico e 76% no teste com ácido fórmico (**FIGURA 14**), sugerindo que os testes com ácido fórmico se apresentam mais promissores na identificação de *Cryptococcus* spp.

Figura 12 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Cryptococcus* spp., sem o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B



Fonte: SOUTO, 2017.

Tabela 33 - Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF, realizada pelo analista B, utilizando *Cryptococcus* spp.

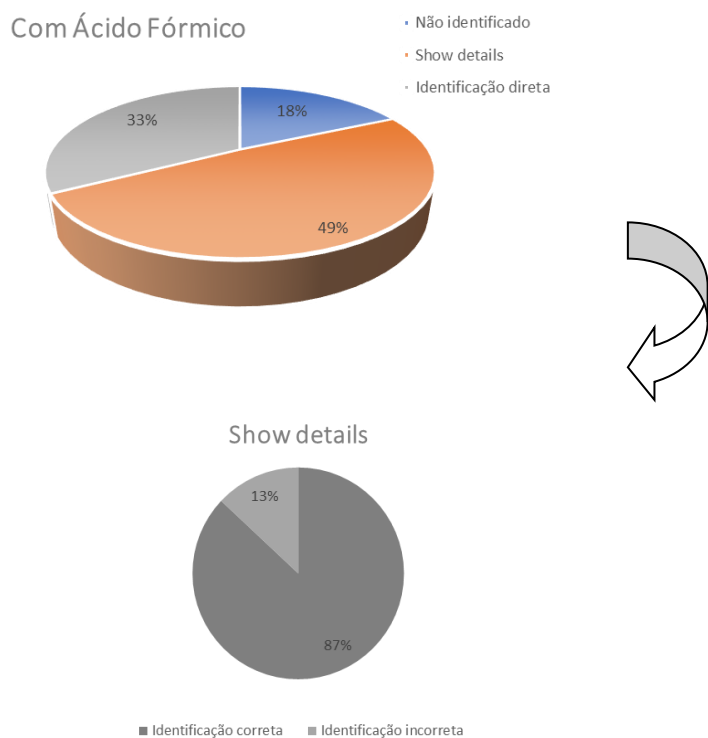
Fungos	Nº das Amostras	Sem ácido fórmico			Com ácido fórmico		
		Replicatas	%	Resultado	Replicatas	%	Resultado
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40044	1	98	<i>C. neoformans</i>	1	87.5	<i>C. neoformans</i>
		2	91	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>C. albidus</i>	CFRVS 40077	1	não identificado		1	não identificado	
		2			2		
<i>C. gattii</i>	CFRVS 40113	1	Show details	<i>C. gattii</i>	1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2	Show details	<i>C. gattii</i>	2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. B	CFRVS 40122	1	Show details	<i>C. gattii</i>	1	não identificado	
		2	Show details	<i>C. gattii</i>	2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40123	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40124	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	76.8	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	76.8	<i>C. neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 40141	1	Show details	<i>C. gattii</i>	1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2	Show details	<i>C. gattii</i>	2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40142	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. C	CFRVS 40143	1	não identificado		1	não identificado	
		2			2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. AD	CFRVS 40150	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	84	<i>C. neoformans</i>
		2	não identificado		2	87.5	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> sor. C	CFRVS 40166	1	Show details	<i>C. gattii</i>	1	Show details	<i>S. kluyveri</i>
		2	Show details	<i>C. gattii</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> sor. A	CFRVS 40168	1	99.9	<i>C. neoformans</i>	1	99.9	<i>C. neoformans</i>
		2	99.9	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> sor. D	CFRVS 40192	1	84.4	<i>C. neoformans</i>	1	99.9	<i>C. neoformans</i>
		2	98	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i>	CFRVS 40193	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	81.6	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i>	CFRVS 40215	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>F. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40218	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	76.8	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40221	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	98	<i>C. neoformans</i>
		2	87.5	<i>C. neoformans</i>	2	98	<i>C. neoformans</i>
<i>C. podzolicus</i>	CFRVS 40232	1	não identificado		1	Show details	<i>T. mucoides</i>
		2			2	não identificado	
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40282	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	99.9	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40283	1	84.1	<i>C. neoformans</i>	1	99.9	<i>C. neoformans</i>
		2	80.1	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>C. humicola</i>	CFRVS 40292	1	não identificado		1	não identificado	
		2			2		
<i>C. neoformans</i>	CFRVS MRC 40323 f26	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	não identificado		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS MRC 40323 f47	1	não identificado		1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	não identificado		2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS MRC 40324 f55	1	não identificado		1	não identificado	
		2			2		
<i>C. gattii</i>	CFRVS MRC 40324 f26	1	não identificado		1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2			2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70295	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	99.9	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70296	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	77.5	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70297	1	94.5	<i>C. neoformans</i>	1	98	<i>C. neoformans</i>
		2	99.9	<i>C. neoformans</i>	2	99.9	<i>C. neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70298	1	Show details	<i>C. gattii</i>	1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2	não identificado		2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70299	1	não identificado		1	Show details	<i>S. kluyveri</i>
		2			2	não identificado	
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70300	1	não identificado		1	não identificado	
		2			2	Show details	<i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70301	1	Show details	<i>C. neoformans</i>	1	Show details	<i>C. neoformans</i>
		2	Show details	<i>C. neoformans</i>	2	Show details	<i>C. neoformans</i>
<i>C. gattii</i>	CFRVS 70302	1	não identificado		1	Show details	<i>C. gattii</i>
		2			2	não identificado	

Fonte: SOUTO, 2017.



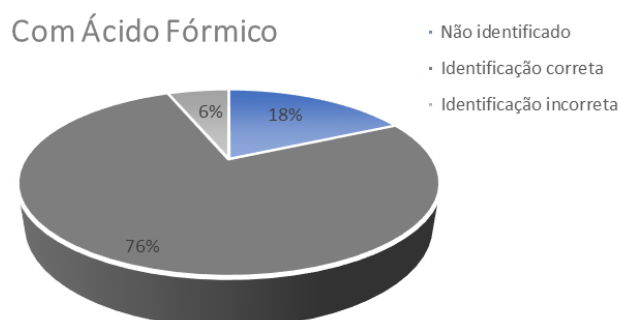
Legenda: C. – *Cryptococcus*; F. – *Filobasidiella*; S. – *Saccharomyces*; T. – *Trichosporon*; var. – variedade; sor. – sorotipo. Os resultados destacados se referem às identificações incorretas.

Figura 13 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Cryptococcus* spp., com o uso de ácido fórmico, realizado pelo analista B, destacando os resultados *show details*



Fonte: SOUTO, 2017.

Figura 14 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Cryptococcus* spp. com o uso de ácido fórmico, realizado pelo analista B, totalizando as identificações corretas



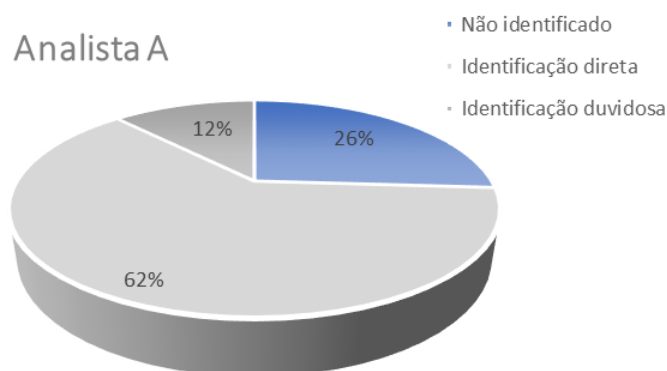
Fonte: SOUTO, 2017.

Vale ressaltar que há uma variação grande entre os resultados obtidos a partir da análise com os diferentes analistas para os testes com *Cryptococcus* spp.,

utilizando o ácido fórmico. Enquanto 50% das replicatas não foram identificadas nos testes com o analista A, esse valor se limitou a 18% quando os testes foram executados pelo analista B.

Para *Candida* spp., analisando os resultados do teste realizado pelo analista A, de acordo com a **Figura 15**, observou-se que 26% das replicatas não foram identificadas. Além disso, 12% apresentou identificação duvidosa, ou seja, a identificação resultou em duas espécies distintas. Em todos os casos as replicatas foram identificadas como *C. albicans* e *C. africana* (**TABELA 34**).

Figura 15 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Candida* spp., realizada pelo analista A



Fonte: SOUTO, 2017.

Para os testes com *Candida* spp., realizados pelo analista B, conforme a **Tabela 35**, nenhum resultado do tipo *show details* foi encontrado, tanto para o teste com a utilização de ácido fórmico, como para aquele em que não se utilizou. Novamente, a identificação das amostras com ácido fórmico foi superior ao outro teste. Com ácido fórmico, todas as amostras foram identificadas, enquanto que sem a utilização de ácido fórmico, encontramos um percentual de 8% de não identificação. Além disso, no teste sem ácido fórmico, 14% das identificações foram duvidosas, uma vez que além de *C. albicans*, três amostras também foram identificadas como *C. africana*, esse valor é reduzido para 6% quando se realizou o teste com ácido fórmico (**FIGURAS 16 e 17**).

**Tabela 34** - Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF, realizada pelo analista A, utilizando *Candida* spp.

Fungos	Nº das Amostras	Replicatas	%	Resultados
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40006	1	89.40	<i>Candida albicans</i>
		2	99.90	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40040	1		não identificado
		2	90.3	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40041	1	99.90	<i>Candida albicans</i>
		2	90.50	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40070	1	80.60	<i>Candida albicans</i>
		2	77.60	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40071	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40119	1	90.60	<i>Candida albicans</i>
		2	88.20	<i>Candida africana / albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40120	1	96.10	<i>Candida albicans</i>
		2	80.00	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	CFRVS 40172	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40175	1	80.2	<i>Candida albicans</i>
		2	95.5	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40176	1	87.5	<i>Candida albicans</i>
		2	87.5	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40177	1	88.20	<i>Candida africana / albicans</i>
		2	91.00	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40178	1		não identificado
		2		não identificado
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40179	1	99.9	<i>Candida albicans</i>
		2	95.7	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40260	1	93.10	<i>Candida albicans</i>
		2	87.80	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40277	1	85.5	<i>Candida albicans</i>
		2		não identificado
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40278	1	89.40	<i>Candida albicans</i>
		2	92.40	<i>Candida africana / albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS MRC 40006	1	88.30	<i>Candida africana / albicans</i>
		2		não identificado

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: C. – *Candida*

Assim como ocorreu com *Cryptococcus* spp., os testes com os diferentes analistas apresentaram grande variação, enquanto apenas 62% das replicatas foram identificadas diretamente no teste realizado pelo analista A, a identificação direta ocorreu em 94% das replicatas dos testes com o analista B.

Ao analisar os dados gerados nos testes realizados pelo analista B, observa-se que a identificação por meio da análise por MALDI-TOF foi bastante expressiva para *C. albicans* e *C. dubliniensis*, principalmente quando se utilizou o ácido fórmico. Esse resultado está de acordo com o esperado diante da afirmativa de que os resultados são influenciados pela quantidade de espectros de referência depositados no banco que representem as espécies estudadas. No banco utilizado neste estudo são encontrados 114 espectros de referência representantes de *C. albicans* e 60 de *C. dubliniensis*.

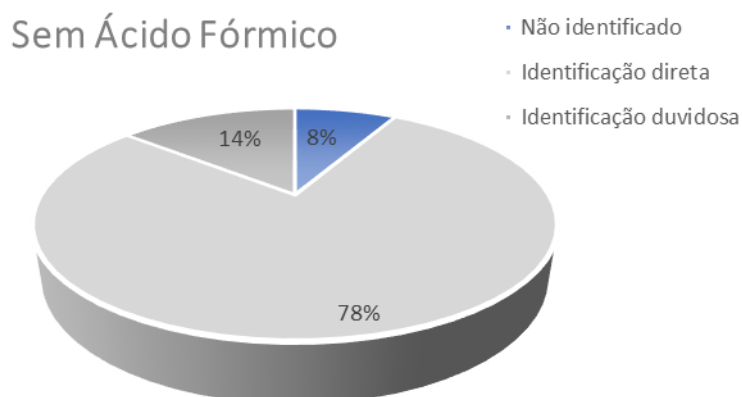
Tabela 35 - Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF utilizando *Candida* spp., realizada pelo analista B

Fungos	Nº das Amostras	Sem ácido fórmico			Com ácido fórmico		
		Replicatas	%	Resultado	Replicatas	%	Resultado
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40006	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	94.5	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40040	1	77.1	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>	1	98	<i>C. albicans</i>
		2	93	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40041	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	92.6	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40070	1	85.8	<i>C. albicans</i>	1	82.8	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>
		2		não identificado	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40071	1	89.2	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40119	1		não identificado	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40120	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	CFRVS 40172	1	99.9	<i>C. dubliniensis</i>	1	99.9	<i>C. dubliniensis</i>
		2	99.9	<i>C. dubliniensis</i>	2	99.9	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40175	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	98	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40176	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40177	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	94.5	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40178	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	98	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40179	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40260	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	96.6	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40277	1	94.6	<i>C. africana</i> / <i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	98.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40278	1	99.9	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS MRC 40006 f186	1	32.5	<i>C. albicans</i>	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	88.6	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	CFRVS MRC 40006 f61	1		não identificado	1	99.9	<i>C. albicans</i>
		2	99.9	<i>C. albicans</i>	2	99.9	<i>C. albicans</i>

Fonte: SOUTO, 2017.

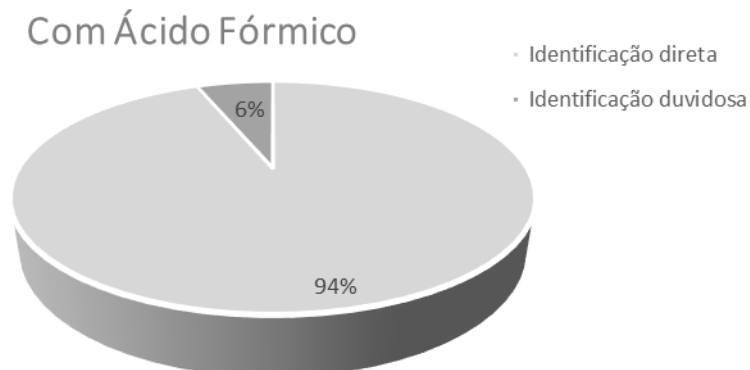
Legenda: C. - *Candida*

Figura 16 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Candida* spp. sem o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B



Fonte: SOUTO, 2017.

Figura 17 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Candida* spp. com o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B



Fonte: SOUTO, 2017.

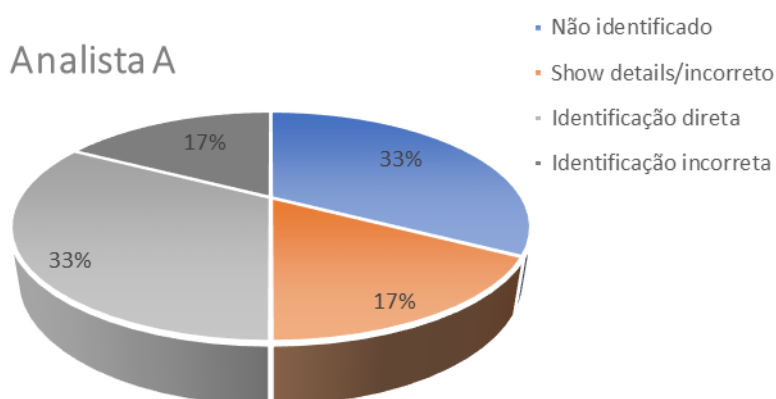
Para *Saccharomyces* spp., os resultados dos testes realizados pelo analista A não foram promissores, visto que apenas 33% das replicatas foram identificadas diretamente, sendo as outras replicatas identificadas incorretamente ou não identificadas (**FIGURA 18**). De acordo com o expresso na **Tabela 36**, as identificações incorretas se concentram nas espécies *S. pastorianus*, *S. uvarum* e *S. bayanus*.

Tabela 36 - Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF utilizando *Saccharomyces* spp., realizada pelo analista A

Fungos	Nº das Amostras	Replicatas	%	Resultados
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40001	1		não identificado
		2		não identificado
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40002	1	99.90	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.90	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40003	1	96.20	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.90	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40083	1	94.40	<i>S. cerevisiae</i>
		2	94.40	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40125	1		não identificado
		2		não identificado
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	1	99.90	<i>S. cerevisiae</i>
		2	88.50	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	1	Show details	<i>S. cerevisiae</i>
		2	90.10	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i>	CFRVS 40235	1	Show details	<i>S. cerevisiae</i>
		2	Show details	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS MRC 40001	1		não identificado
		2		não identificado

Fonte: SOUTO, 2017.

Figura 18 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Saccharomyces* spp., realizado pelo analista A

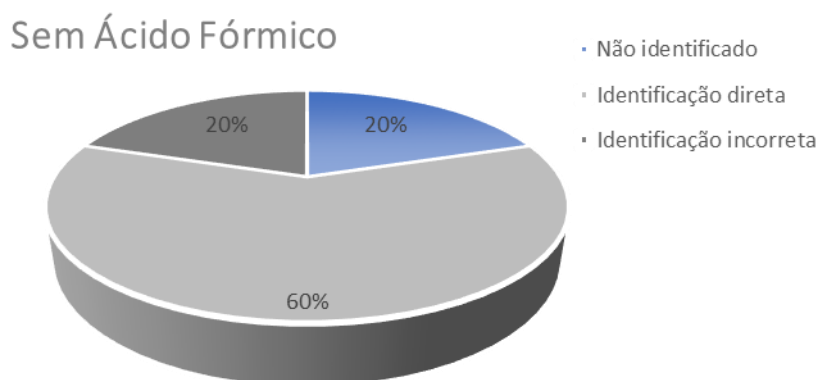


Fonte: SOUTO, 2017.

Nos testes realizados pelo analista B (**TABELA 37**) sem o uso de ácido fórmico, a identificação direta ocorreu em 60% das amostras, enquanto 20% não foram identificados e 20% foram identificados incorretamente (**FIGURA 19**). Já com a aplicação de ácido fórmico, todas as amostras foram de alguma forma

identificadas, porém 70% das replicatas foram corretamente identificadas, 20% incorretamente e 10% apresentaram resultado do tipo *show details* (FIGURA 20).

Figura 19 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Saccharomyces* spp. sem o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B



Fonte: SOUTO, 2017.

Tabela 37 - Resultados gerados pela análise por MALDI-TOF utilizando *Saccharomyces* spp., realizada pelo analista B

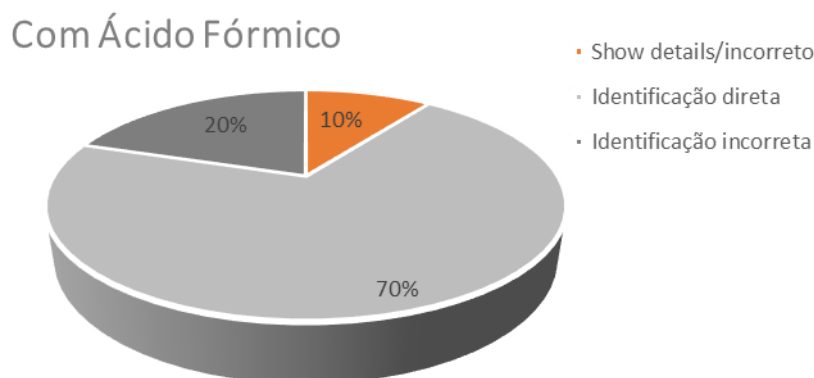
Fungos	Nº das Amostras	Sem ácido fórmico			Com ácido fórmico		
		Replicatas	%	Resultado	Replicatas	%	Resultado
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40001	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40002	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40003	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40083	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40125	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	96.2	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	95	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	1	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i>	CFRVS 40235	1			1	Show details	<i>C. neoformans/T. cutaneum/S. cerevisiae/S. kluyveri</i>
		2	não identificado		2	Show details	<i>S. pastorianus/ S. cerevisiae/ T. cutaneum</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS MRC 40001 f125	1			1	86.2	<i>S. cerevisiae</i>
		2	não identificado		2	76.7	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS MRC 40001 f170	1	90.5	<i>S. cerevisiae</i>	1	90.5	<i>S. cerevisiae</i>
		2	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	2	84	<i>S. cerevisiae</i>

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: *S.* – *Saccharomyces*, *C.* – *Cryptococcus*, *T.* *Trichosporon*

Os resultados destacados na tabela se referem aos incorretamente identificados

Figura 20 - Resultados da análise por MALDI-TOF de *Saccharomyces* spp. com o uso de ácido fórmico, realizada pelo analista B



Fonte: SOUTO, 2017.

#### 4.8.2 Caracterização genotípica

##### 4.8.2.1 PCR-fingerprinting e RFLP-URA5

A análise visual com base na comparação das bandas das amostras com as bandas das cepas-padrão foi realizada a fim de identificar o perfil molecular de cada cepa estudada do complexo *C. neoformans/C. gattii*.

As cepas *C. laurentii* CFRVS 40043, *C. albidus* CFRVS 40077, *C. podzolicus* CFRVS 40232 e *C. humicola* CFRVS 40292 foram avaliadas apenas utilizando PCR-fingerprinting e apresentaram perfis bem diferentes dos padrões moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*. O método RFLP-URA5 não foi aplicado para essas cepas, pois não são pertencentes ao complexo *C. neoformans/C. gattii*.

As amostras dos dois frascos do material de referência *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 apresentaram perfis compatíveis com o padrão VNIV, tanto na análise de PCR-fingerprinting, como no RFLP-URA5. As amostras dos frascos referentes ao material *C. gattii* CFRVS MRC 40324 designam-se ao perfil molecular VGII, quando analisado pelos dois métodos em questão.

O híbrido *F. neoformans* var. *neoformans* sor. AD CFRVS 40150 apresentou perfis moleculares diferentes quando comparamos as técnicas de tipagem molecular aplicadas neste estudo. Com a utilização do PCR-fingerprinting, o



tipo molecular reconhecido foi VNII, já com a aplicação do RFLP-URA5, foi identificado o tipo molecular VNIII. Todas as outras cepas apresentaram o mesmo tipo molecular quando foram utilizadas as duas diferentes técnicas moleculares (TABELA 38).

Tabela 38 - Tipos moleculares das cepas do complexo *C. neoformans/C. gattii* resultantes das análises genotípicas RFLP-URA5 e PCR-fingerprinting

Fungo	Nº de acesso na Fiocruz/CFRVS	Tipo molecular RFLP-URA5	Tipo molecular PCR-fingerprinting
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40044	VNIII	VNIII
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 40113	VGI	VGI
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. B	CFRVS 40122	VGIII	VGIII
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40123	VNIV	VNIV
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40124	VNIV	VNIV
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFRVS 40141	VGI	VGI
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. D	CFRVS 40142	VNIV	VNIV
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i> sor. C	CFRVS 40143	VGIII	VGIII
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> sor. AD	CFRVS 40150	VNIII	VNII
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. C	CFRVS 40166	VGIII	VGIII
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. A	CFRVS 40168	VNI	VNI
<i>Filobasidiella neoformans</i> sor. D	CFRVS 40192	VNIII	VNIII
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CFRVS 40193	VNIV	VNIV
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CFRVS 40215	VNIV	VNIV
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	CFRVS 40218	VNIV	VNIV
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40221	VNIII	VNIII
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40282	VNI	VNI
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFRVS 40283	VNI	VNI
<i>Cryptococcus neoformans</i> MRC 40323 (frasco 26)	CFRVS MRC 40323	VNIV	VNIV
<i>Cryptococcus neoformans</i> MRC 40323 (frasco 47)	CFRVS MRC 40323	VNIV	VNIV
<i>Cryptococcus gattii</i> MRC 40324 (frasco 26)	CFRVS MRC 40324	VGII	VGII
<i>Cryptococcus gattii</i> MRC 40324 (frasco 55)	CFRVS MRC 40324	VGII	VGII

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: sor. – sorotipo; MRC – Material de Referência Certificado; CFRVS – Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária; var. – variedade.

#### 4.8.2.2 Sequenciamento da região ITS

Todas as cepas deste estudo foram submetidas ao sequenciamento da região ITS, para a autenticação ao nível de espécie.

As sequências obtidas, tanto pela amplificação utilizando o iniciador ITS1, como o ITS4, foram analisadas frente a dois bancos de dados, GenBank e ISHAM-ITS. Ao comparar as sequências com as contidas no GenBank, foram considerados apenas os resultados provenientes de sequências de cepas de coleções de cultura reconhecidas, como CBS e ATCC, ou cepas do ISHAM.

Analisando os resultados do gênero *Cryptococcus* spp. (**TABELA 39**), observou-se que na análise no GenBank foi possível uma correta identificação das espécies *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. podzolicus* e *C. humicola*, com uma similaridade de 99% com as sequências do banco. O mesmo não ocorreu para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, já que a maioria das cepas foi identificada com o mesmo percentual de similaridade entre as duas espécies em questão. Dentre as 18 cepas de *C. neoformans*, apenas duas (11% das cepas) foram identificadas corretamente, sem que fosse sugerido *C. gattii* com a mesma similaridade. Para sete cepas desta espécie, observou-se que tanto para a direção *forward*, como para *reverse*, a identificação resulta com um *max score* maior para *C. neoformans*, porém com a mesma similaridade para *C. gattii*. O *max score* indica a pontuação da melhor sequência alinhada, ou seja, os números maiores significam maior similaridade, porém a diferença do valor da espécie correta para a incorreta foi, em todos os casos, bem pequena. Para nove cepas, o resultado foi correto quando analisado apenas a direção *reverse*, com 99% de similaridade com as sequências relacionadas a *C. neoformans*. Já para autenticação de *C. gattii*, todas as cepas também foram identificadas como *C. neoformans* com a mesma similaridade de 99%. Sendo assim, o sequenciamento não foi efetivo na diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Tabela 39 - Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de *Cryptococcus* spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS

<i>Cryptococcus</i> spp.													
Espécie	Amostras	Direção	GenBank				ISHAM-ITS						
			Percentual de similaridade	Max score	Nº acesso GenBank	Identificação incorreta	Percentual de similaridade	Score	Nº acesso ISHAM	Identificação incorreta			
<i>C. laurentii</i>	CFRVS 40043	F	99%	900	KY104469	—	94,299%	732,253	MITS1317	—			
		R		911			97,473%	672,024	MITS3396				
<i>C. albidus</i>	CFRVS 40077	F	99%	1061	KP131891	—	96,154%	906,599	MITS1187	—			
		F		95,214%			871,729	MITS2863	<i>C. adeliensis</i>				
		R		97,45%			900,259	MITS3063	—				
		R		96,376%			881,239	MITS3271	<i>C. adeliensis</i>				
<i>C. podzolicus</i>	CFRVS 40232	F	99%	876	KY102922	—	Nenhuma sequência similar no banco de dados						
		R		867			KY102929						
<i>C. humicola</i>	CFRVS 40292	F	99%	874	DQ667177	—	94,282%	705,308	MITS1312	—			
		R		894			KY105806	99,331%			746,517		
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 40044	F	99%	939	KC254022	—	98,565%	756,027	MITS1348	—			
		R		942			KY102819	96,739%	781,387		MITS3649		
	CFRVS 40123	F	99%	946	KC254022	—	94,271%	790,896	MITS1375	—			
		F		933			KY102787	<i>C. gattii</i>	93,528%		763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>
		R		948			KY102819	—	98,673%		789,311	MITS3649	—
		R		920			KY102969	<i>C. gattii</i>					
	CFRVS 40142	F	99%	941	KY102636	—	94,242%	798,821	MITS1375	—			
		F		933			KY102787	<i>C. gattii</i>	93,491%		781,387	MITS1237	<i>C. gattii</i>
	CFRVS 40150	R	99%	939	KY102819	—	96,301%	781,387	MITS3649	—			
		F		937			KC254022	98,789%	756,027		MITS2923	—	
	CFRVS 40168	F	99%	917	KY102787	<i>C. gattii</i>	98,044%	763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>			
		F		935			KY102819	97,809%	773,462	MITS3649	—		
		R		942			KY102839	96,977%	784,556	MITS3638	—		
		R		928			KY102781	<i>C. gattii</i>	91,272%	775,047	MITS1348	—	
	CFRVS 40192	F	99%	946	KC254022	—	93,844%	778,217	MITS3631	—			
		F		922			KY102648	<i>C. gattii</i>	93,758%		782,971	MITS1237	<i>C. gattii</i>
	CFRVS 40193	R	99%	944	KY102819	—	94,11%	781,387	MITS3649	—			
		F		935			KC254022	96,721%	762,367		MITS1374	—	
		F		96,036%			738,593	MITS1237	<i>C. gattii</i>				
		R		937			KY102819	95,944%	779,802		MITS3649	—	
	CFRVS 40215	F	99%	939	KC254022	—	95,812%	763,952	MITS1374	—			
		F		952			KY102819	95,086%	740,177		MITS1237	<i>C. gattii</i>	
		R		926			KY102969	<i>C. gattii</i>	97,409%		794,066	MITS3649	—
		R		941			KC254022	96,051%	784,556		MITS3630	—	
	CFRVS 40218	F	99%	924	JN939462	<i>C. gattii</i>	95,361%	763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>			
		F		948			KY102819	96,903%	787,726	MITS3649	—		
		R		915			KY102969	<i>C. gattii</i>	99,073%	784,556	MITS3649	—	
		R		920			JN939462	<i>C. gattii</i>	98,391%	763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>	
	CFRVS 40221	F	99%	939	KY102819	—	96,596%	778,217	MITS3649	—			
		F		941			KY102839	100%	782,971		MITS3638	—	
CFRVS 40282	F	99%	941	KY102787	<i>C. gattii</i>	99,595%	757,612	MITS1201	<i>C. gattii</i>				
	R		957			EU240004	97,337	803,576	MITS1330	—			
	R		931			KY102781	<i>C. gattii</i>	98,464%	770,292	MITS1345	—		
	F		944			KY102667	<i>C. gattii</i>	97,917%	763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>		
CFRVS 40283	R	99%	976	EU240004	—	98,606%	819,426	MITS1330	—				
	R		950			KY102781	<i>C. gattii</i>						
	F		939			KC254022	95,949%	787,726		MITS1374	—		
	F		922			KY102667	<i>C. gattii</i>	95,25%		763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>	
CFRVS MRC 40323 f27	R	99%	942	KY102819	—	96,067%	781,387	MITS3649	—				
	F		946			KC254022	96,437%	787,726		MITS1374	—		
CFRVS MRC 40323 f46	F	99%	928	KY102787	<i>C. gattii</i>	95,766%	763,952	MITS1237	<i>C. gattii</i>				
	R		941			KY102819	97,972%	784,556	MITS3649	—			

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: ISHAM- *International Society for human and animal Mycology*; C- *Cryptococcus*; F- Forward; R- Reverse; MRC- Material de Referência Certificado; f- frasco.

Tabela 39 (continuação). Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de *Cryptococcus* spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS

<i>Cryptococcus</i> spp.											
Espécie	Amostras	Direção	GenBank				ISHAM-ITS				
			Percentual de similaridade	Max score	Nº acesso GenBank	Identificação incorreta	Percentual de similaridade	Score	Nº acesso ISHAM	Identificação incorreta	
<i>C. neoformans</i>	CFRVS 70295	F	99%	942	KC254023	—	99,447%	770,292	MIT1345	—	
		F		933	KY102667	<i>C. gattii</i>	99,036%	763,952	MIT1237	<i>C. gattii</i>	
		R		957	EU240004	—	97,03%	778,217	MIT1227	—	
		R		931	KY102781	<i>C. gattii</i>					
	CFRVS 70296	F	99%	937	KY102839	—	98,101%	787,726	MIT1328	—	
		F		929	KY102781	<i>C. gattii</i>	97,555%	763,952	MIT1237	<i>C. gattii</i>	
		R		953	EU240004	—	96,324%	781,387	MIT3638	—	
		R		928	KY102781	<i>C. gattii</i>					
	CFRVS 70297	F	99%	937	KC254022	—	97,791%	787,726	MIT1375	—	
		F		917	KY102667	<i>C. gattii</i>	97,139%	763,952	MIT1237	<i>C. gattii</i>	
		R		933	KY102887	—	97,988%	778,217	MIT3649	—	
	CFRVS 70301	F	99%	937	KY102909	—	97,442%	787,726	MIT1375	—	
		F		920	KY102667	<i>C. gattii</i>	96,79%	763,952	MIT1237	<i>C. gattii</i>	
		R		931	KY102887	—	97,519%	778,217	MIT3649	—	
	<i>C. gattii</i>	CFRVS 40113	F	99%	942	KY102706	—	90,856%	789,311	MIT1205	—
			F		935	KY102900	<i>C. neoformans</i>	90,493%	773,462	MIT3631	<i>C. neoformans</i>
R			929		KY102710	—	94,092%	789,311	MIT2907	—	
R			929		KY102710	—	93,822%	787,726	MIT1328	<i>C. neoformans</i>	
CFRVS 40122		F	99%	941	JN939487	—	96,807%	757,612	MIT1284	—	
		F		928	KY102832	<i>C. neoformans</i>	96,322%	756,027	MIT3632	<i>C. neoformans</i>	
		R		939	KY102616	—	98,308%	801,991	MIT2907	—	
		R		933	KY102807	<i>C. neoformans</i>	97,804%	794,066	MIT1328	<i>C. neoformans</i>	
CFRVS 40141		F	99%	942	JN939459	—	99,099%	740,177	MIT1205	—	
		F		935	KY102832	<i>C. neoformans</i>	98,44%	738,593	MIT1348	<i>C. neoformans</i>	
		R		950	KY102900	<i>C. neoformans</i>	96,996%	805,161	MIT2887	—	
		R		946	KY102790	—					
CFRVS 40143		F	99%	937	JN939487	—	94,223%	725,913	MIT1284	—	
		F		918	KY102839	<i>C. neoformans</i>	94,214%	730,668	MIT1248	<i>C. neoformans</i>	
		R		953	KY102618	—	98,465%	808,331	MIT2907	—	
		R		946	KY102900	<i>C. neoformans</i>	97,832%	800,406	MIT1328	<i>C. neoformans</i>	
CFRVS 40166	F	99%	939	JN939487	—	92,5%	757,612	MIT1284	—		
	F		924	KY102832	<i>C. neoformans</i>	92,054%	756,027	MIT3638	<i>C. neoformans</i>		
	R		937	KY102618	—	92,808%	790,896	MIT2907	—		
	R		931	KY102900	<i>C. neoformans</i>	92,254%	781,387	MIT1350	<i>C. neoformans</i>		
CFRVS MRC 40324 f26	F	99%	950	JN939462	—	96,292%	770,292	MIT1237	—		
	F		937	KY102839	<i>C. neoformans</i>	95,78%	763,952	MIT1345	<i>C. neoformans</i>		
	R		939	KY102682	—	97,42%	781,387	MIT1328	<i>C. neoformans</i>		
	R		922	KY102879	<i>C. neoformans</i>	96,605%	789,311	MIT2895	—		
CFRVS MRC 40324 f55	F	99%	941	JN939462	—	96,387%	781,387	MIT3644	—		
	F		929	KY102839	<i>C. neoformans</i>	94,451%	778,217	MIT3631	<i>C. neoformans</i>		
	R		917	KY102682	—	94,061%	765,537	MIT2910	—		
	R		898	KY102906	<i>C. neoformans</i>	93,306%	765,537	MIT1355	<i>C. neoformans</i>		
CFRVS 70298	F	99%	942	JN939459	—	95,866%	767,122	MIT1205	—		
	F		933	KY102832	<i>C. neoformans</i>	95,184%	757,612	MIT3631	<i>C. neoformans</i>		
	R		935	KY102782	—	97,284%	787,726	MIT2907	—		
	R		920	KY102963	<i>C. neoformans</i>	97,125%	784,556	MIT2915	<i>C. neoformans</i>		
CFRVS 70302	F	99%	942	JN939462	—	97,071%	770,292	MIT1237	—		
	F		929	KC254023	<i>C. neoformans</i>	96,524%	763,952	MIT1345	<i>C. neoformans</i>		
	R		929	KY102682	—	98,363%	779,802	MIT2896	—		
	R		926	KY102688	<i>C. neoformans</i>	97,876%	771,877	MIT1328	<i>C. neoformans</i>		
CFRVS 70299	F	99%	933	JN939487	—	99,06%	757,612	MIT1280	—		
	F		920	KY102807	<i>C. neoformans</i>	98,398%	756,027	MIT1328	<i>C. neoformans</i>		
	R		928	KP068818	—	96,764%	792,481	MIT2907	—		
	R		920	KY102807	<i>C. neoformans</i>	96,154%	784,556	MIT1328	<i>C. neoformans</i>		
CFRVS 70300	F	99%	939	JN939487	—	98,904%	757,612	MIT1303	—		
	F		931	KY102832	<i>C. neoformans</i>	98,529%	759,197	MIT3631	<i>C. neoformans</i>		
	R		928	KY102963	—	94,49%	800,406	MIT2910	—		
	R		922	KY102969	<i>C. neoformans</i>						

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: ISHAM- *International Society for human and animal Mycology*; C- *Cryptococcus*; F- Forward; R- Reverse; MRC- Material de Referência Certificado; f- frasco.

No banco de dados ISHAM-ITS, diferente do resultado do GenBank, não foi observada uma correta identificação para as espécies *C. albidus* e *C. podzolicus*. A cepa *C. neoformans* CFRVS 40044 foi identificada corretamente nos dois bancos de dados, já para as demais cepas desta espécie, a amplificação com o iniciador ITS4 se mostrou mais confiável, uma vez que a identificação como *C. neoformans* se apresentou correta e única (TABELA 39).

Tabela 40 - Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de *Candida* spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS

<i>Candida</i> spp.								
Espécie	Amostras	Direção	GenBank			ISHAM-ITS		
			Percentual de similaridade	Max score	Nº acesso GenBank	Percentual de similaridade	Score	Nº acesso ISHAM
<i>C. albicans</i>	CFRVS 40006	F	99%	942	KP878247*	97,12%	749,687	MIT2816
		R		924	KY101862	96,90%	719,573	MIT482
	CFRVS 40040	F	99%	935	MF797624	98,27%	637,155	MIT455
		R		893	KY101832	99,80%	687,874	MIT445
	CFRVS 40041	F	98%	874	KY101878	95,16%	710,063	MIT473
		R		99%	904	KY101832	97,27%	
	CFRVS 40070	F	99%	926	KP674471	98,80%	730,668	MIT3055
		R		898	KY101862	92,17%	697,384	MIT482
	CFRVS 40071	F	99%	918	KY101860	97,09%	730,668	MIT3055
		R		889	KY101886	97,56%	646,665	MIT446
	CFRVS 40119	F	99%	900	KP675521*	93,68%	725,913	MIT467
		R		98%	839	KY101852	98,86%	749,687
	CFRVS 40120	F	99%	911	KP675247*	95%	730,668	MIT3055
		R		893	KY101884	96,30%	743,347	MIT2817
	CFRVS 40175	F	99%	907	KY101860	97,66%	692,629	MIT451
		R		887	GU319991	Nenhuma sequência similar no banco de dados		
	CFRVS 40176	F	99%	928	KY101860	95,51%	768,707	MIT463
		R		911	KY101886	96,41%	710,063	MIT451
	CFRVS 40177	F	99%	905	KP131670	96,02%	703,723	MIT474
		R		881	KY101918	95,45%	721,158	MIT479
	CFRVS 40178	F	99%	905	KP675061*	95,44%	727,498	MIT474
		R		97%	819	KY101846	98,01%	719,573
	CFRVS 40179	F	99%	913	KY101918	98,29%	738,593	MIT3055
		R		904	KY101862	97,86%	744,932	MIT454
	CFRVS 40260	F	99%	931	KP878249*	95,312	724,328	MIT479
		R		898	KY101862	99,29%	686,289	MIT449
	CFRVS 40277	F	99%	898	KP675375*	97,72%	710,063	MIT461
		R		889	KY101852	99,14%	737,008	MIT468
	CFRVS 40278	F	99%	900	JN882317	99,49%	752,857	MIT465
		R		889	KY101849	98,59%	697,384	MIT473
CFRVS MRC40006f61	F	99%	922	KP131669	96,18%	730,668	MIT3055	
	R		891	KY101862	97,78%	744,932	MIT454	
CFRVS MRC40006f186	F	99%	924	KP131669	95,34%	752,857	MIT467	
	R		902	KY101862	98,89%	683,119	MIT451	
<i>C. dubliniensis</i>	CFRVS 40172	F	99%	845	EF567999	93,99%	778,217	MIT3057
		R		854	JQ070103	98,01%	719,573	MIT581

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: ISHAM- *International Society for human and animal Mycology*; C- *Candida*; F- Forward; R- Reverse; MRC- Material de Referência Certificado; f- frasco

\*Identificação não proveniente de cepa da CBS ou ISHAM.

Na análise das sequências de *Candida* no GenBank, dentre as 17 cepas de *C. albicans*, apenas duas amplificadas pelo iniciador ITS4 apresentaram similaridade de 97 e 98% e uma amplificada pelo ITS1 apresentou valor também de 98%, de qualquer forma todas foram identificadas corretamente. Todas as outras sequências foram identificadas com similaridade de 99% com as sequências do banco. O mesmo ocorreu para *C. dubliniensis* (**TABELA 40**).

De acordo com o apresentado na **Tabela 40**, dentre as cepas de *C. albicans*, seis sequências da direção *forward* não apresentaram similaridade com nenhuma cepa CBS, ATCC ou ISHAM, porém, ainda assim, foram identificadas corretamente, com alto valor de similaridade (99%).

Avaliando as sequências no banco de dados ISHAM-ITS, a identificação também foi correta resultando numa única espécie, com exceção de uma sequência da cepa *C. albicans* CFRVS 40175, em que não foi encontrado nenhum resultado durante o pareamento (**TABELA 40**).

Para o gênero *Saccharomyces*, durante a comparação com as sequências do GenBank, a identificação não foi correta a nível de espécie quase que na totalidade das amostras. Para *S. cerevisiae*, apenas uma sequência das cepas *S. cerevisiae* CFRVS 40002 e *S. cerevisiae* CFRVS 40083 foram corretamente identificadas, as outras cinco (71%) cepas foram identificadas como *S. paradoxus* ou *S. cerevisiae/paradoxus*. Já *S. uvarum* e *S. pastorianus* foram identificadas incorretamente como *S. cerevisiae*, enquanto *S. bayanus* foi identificada como *S. paradoxus* ou *S. bayanus/pastorianus* (**TABELA 41**).

Na comparação com as sequências do ISHAM-ITS, todas as cepas da espécie *S. cerevisiae* foram identificadas corretamente. Apenas uma das sequências da cepa CFRVS 40083 e outra da CFRVS 40125 não foram encontradas. Assim como no GenBank, *S. uvarum* e *S. pastorianus* foram identificadas de maneira incorreta como *S. cerevisiae*. Já *S. bayanus* teve uma sequência comparada à espécie *S. kudriavzevii* e a outra sequência à *S. cerevisiae* (**TABELA 41**).

Tabela 41 - Análise do sequenciamento da região ITS das cepas de *Saccharomyces* spp., utilizando dois diferentes bancos de dados: Genbank e ISHAM-ITS

Saccharomyces spp.										
Espécie	Amostras	Direção	GenBank				ISHAM-ITS			
			Percentual de similaridade	Max score	Nº acesso GenBank	Identificação incorreta	Percentual de similaridade	Score	Nº acesso ISHAM	Identificação incorreta
<i>S. cerevisiae</i>	CFRVS 40001	F	99%	1441	KY105212	<i>S. paradoxus</i>	98,60%	1193,48	MITS3248	—
		R		1415			98,02%	1166,5	MITS3248	—
	CFRVS 40002	F	Nenhuma sequência similar no banco de dados				67,94%	326,5	MITS2459	—
		R	99%	1127	KY105120	—	94,80%	855,88	MITS2758	—
	CFRVS 40003	F	99%	1400	KU729073	<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	99,34%	1138	MITS2760	—
		R		1417	KY105086		99,04%	1073,02	MITS2752	—
	CFRVS 40083	F	Nenhuma sequência similar no banco de dados				Nenhuma sequência similar no banco de dados			
		R	91%	994	KY105054	—	88,61%	862,22	MITS2762	—
	CFRVS 40125	F	Nenhuma sequência similar no banco de dados				Nenhuma sequência similar no banco de dados			
		R	97%	1314	KY105140	<i>S. cerevisiae/paradoxus</i>	97,12%	1008,04	MITS2750	—
CFRVS MRC 40001f125	F	99%	1435	KY105212	<i>S. paradoxus</i>	96,14%	1212,5	MITS3248	—	
	R		1441			97,57%	1198,23	MITS3248	—	
CFRVS MRC 40001f170	F	99%	1447	KY105212	<i>S. paradoxus</i>	96,63%	1217,25	MITS3248	—	
	R		1435			97,32%	1193,48	MITS3248	—	
<i>S. uvarum</i>	CFRVS 40088	F	Nenhuma sequência similar no banco de dados				79,31%	595,946	MITS2749	<i>S. cerevisiae</i>
		R	89%	979	KF953906	<i>S. cerevisiae</i>	85,11%	632,4	MITS2753	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. pastorianus</i>	CFRVS 40090	F	99%	1423	KP132593	<i>S. cerevisiae</i>	98,96%	1187,14	MITS2762	<i>S. cerevisiae</i>
		R	98%	1369	KY105033	<i>S. cerevisiae</i>	97,80%	1150,68	MITS2754	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. bayanus</i>	CFRVS 40235	F	99%	1428	KY105212	<i>S. paradoxus</i>	98,53%	1214,08	MITS3248	<i>S. kudriavzevii</i>
		F			KY104973	<i>S. bayanus/pastorianus</i>				
		R			KY105215	<i>S. paradoxus</i>				
		R		1419	KY104973	<i>S. bayanus/pastorianus</i>				

Fonte: SOUTO, 2017.

Legenda: ISHAM- *International Society for human and animal Mycology*; S- *Saccharomyces*; F- Forward; R- Reverse; MRC- Material de Referência Certificado; f- frasco.

#### 4.9 Elaboração do certificado

Os certificados foram gerados seguindo as orientações do guia ABNT ISO Guia 31 e as recomendações das normas ABNT NBR ISO/IEC 17034, ABNT NBR ISO/IEC 17025 e da NIT-DICLA-061.

Os certificados dos quatro materiais se encontram no **Apêndice D** deste trabalho, contendo inicialmente o número do lote, os dados do material, como o nome do micro-organismo, número de catálogo, a data de produção e validade, a apresentação do material e as devidas condições de armazenamento. Destacado na primeira página encontram-se os dados de quantificação, com o valor de propriedade e a incerteza associada. Em seguida, informações sobre a descrição do material, os métodos utilizados na caracterização do MRC, o uso pretendido, as instruções para o uso e devidas informações sobre segurança foram incluídas.

Estes certificados acompanharão o material nele descrito, não sendo extensivo a quaisquer outros e serão emitidos sob responsabilidade do produtor, INCQS.

Para o cálculo da incerteza expandida de cada MRC produzido foi utilizado o modelo matemático que considera as incertezas geradas nos testes de homogeneidade, estabilidade a longo e curto prazo e caracterização (**TABELA 42**).

Na **Tabela 43** estão expressos os resultados dessa aplicação matemática, apresentando os valores de propriedade e suas respectivas incertezas.

**Tabela 42 - Resultados das incertezas associadas aos testes de homogeneidade, estabilidade a longo e curto prazo e caracterização**

Incerteza (UFC/100 $\mu$ L)	<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001
$U_{\text{homog}}$	1,4	0,9	2,1	1,5
$U_{\text{estabLP}}$	1,9	1,1	12	16
$U_{\text{estabCP}}$	4,4	4	18	8
$U_{\text{car}}$	4,1	1,7	13	7,8

Fonte: SOUTO, 2018.

Legenda: UFC – Unidade Formadora de Colônia;  $\mu_{\text{homog}}$  – incerteza associada à homogeneidade;  $\mu_{\text{estabLP}}$  – incerteza associada à estabilidade em longo prazo;  $\mu_{\text{estabCP}}$  – incerteza associada à estabilidade em curto prazo;  $\mu_{\text{car}}$  – incerteza associada à caracterização; C. – *Cryptococcus*; C. – *Candida*; S. – *Saccharomyces*.

**Tabela 43 - Resultados das incertezas associadas aos valores de propriedade de cada MRC produzido**

MRC	Valor de propriedade (UFC/100 $\mu$ L)	$U_{\text{MRC}}$ (UFC/100 $\mu$ L)
<i>C. neoformans</i> CFRVS MRC 40323	33	13
<i>C. gattii</i> CFRVS MRC 40324	15	9,2
<i>C. albicans</i> CFRVS MRC 40006	46	26
<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001	45	20

Fonte: SOUTO, 2018.

Legenda: MRC – Material de Referência Certificado; UFC – Unidade Formadora de Colônia;  $U_{\text{MRC}}$  – incerteza expandida do MRC; C. – *Cryptococcus*; C. – *Candida*; S. – *Saccharomyce*.



## 5 DISCUSSÃO

A produção de MRC microbiológico, no Brasil e no mundo, ainda é um grande desafio, visto que a confiabilidade desse material está atrelada a diversas propriedades que não são prontamente determinadas. A robustez do método de produção, assim como a estabilidade e a homogeneidade do material são exemplos das longas fases a se alcançar para que o estabelecimento de um MRC seja um sucesso. No entanto, esses materiais são ferramentas indispensáveis para o controle de qualidade na análise microbiológica (PHILIPP *et al.*, 2007).

Esse processo ainda ocorre de forma vagarosa e árdua. No Brasil, a Cgcre/Inmetro ainda não possui nenhum produtor de Material de Referência acreditado para material microbiológico, e mesmo em nível mundial a oferta é bem reduzida, entretanto os esforços para o estabelecimento desses materiais ocorrem por há algum tempo. Há mais de 30 anos pesquisadores já estudavam a possível produção e certificação de material de referência microbiológico (in't VELD *et al.*, 1996; JANNING *et al.*, 1995). Na década de 90, pesquisadores já relatavam a dificuldade da disponibilização de MRC microbiológico, mostrando o contraste com outras áreas como a química, inclusive registrando os longos estudos preliminares a fim de desenvolver este tipo de material (in't VELD *et al.*, 1995; MAIER *et al.*, 1993).

Os resultados apresentados neste trabalho quanto à produção de MRC microbiológico apontam o factível estabelecimento desses materiais em território nacional. Os MRC desenvolvidos no presente estudo percorreram todas as etapas exigidas pela norma ABNT NBR ISO 17034. Esta norma, publicada em junho de 2017, aponta os requisitos gerais para a produção de materiais de referência, substituindo o guia ABNT ISO Guia 34:2012. Nesta recente norma, os guias ABNT ISO Guia 31 e ABNT ISO Guia 35 passam a ser orientativos e não mais obrigatórios, no entanto, o presente trabalho deu prosseguimento aos testes de acordo com o descrito nesses documentos, visto que são abordagens já consideradas positivas entre os produtores de MR e MRC. Além disso, a publicação da norma ABNT NBR ISO 17034 não gerou modificações ao longo deste estudo, já que não foram realizadas mudanças impactantes em relação ao descrito nos requisitos técnicos do ABNT ISO Guia 34.

Os lotes dos quatro diferentes materiais produzidos neste trabalho se apresentaram homogêneos, conforme mostrado na **Tabela 7**. Para seguir com as

etapas de estabilidade, esse teste requer unicamente a homogeneidade dos dados como resultado (ABNT, 2017), sendo uma etapa fundamental para o estabelecimento de um MRC. Os resultados encontrados no presente trabalho estão em concordância com a avaliação da homogeneidade de outros materiais. No estudo desenvolvido pelo instituto belga denominado *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), estabelecendo *Candida albicans* NCPF 3179 como MRC, também foi observada a homogeneidade do material (De BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009), assim como ocorreu em outro trabalho cujo objetivo era desenvolver metodologia para o estabelecimento de MR para microbiologia de alimentos, usando as bactérias *Bacillus cereus* ATCC 13061 e *Clostridium perfringens* NCTC 8237, sendo que os dois materiais se mostraram homogêneos (ABDELMASSIH *et al.*, 2011).

Neste trabalho, a maior dificuldade ocorreu em torno do estudo da estabilidade, tanto em longo, quanto em curto prazo. Alguns autores têm relatado, há algumas décadas, que a estabilidade é um dos pontos críticos a serem vencidos na produção de um MRC, já que é difícil ultrapassar a barreira da instabilidade natural dos micro-organismos, existindo outros fatores que podem interferir, como a temperatura e a umidade. Por isso, tanto o estudo de estabilidade em longo prazo, avaliando o comportamento do material durante o seu armazenamento, como o estudo em curto prazo para analisar o material em condições de transporte, se tornam atividades cruciais no desenvolvimento de um MRC (JANNING *et al.*, 1995; LAMBERTY *et al.*, 1998).

Para grupos de pesquisa envolvidos com o estabelecimento de MRC fica evidente a dificuldade relacionada à estabilização de micro-organismos vivos, limitando os resultados que devem ser altamente confiáveis fundamentados em células viáveis (PHILIPP *et al.*, 2007). No presente trabalho, dentre os quatro fungos estudados, não foi possível estipular o prazo de validade de um ano apenas para *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, uma vez que foi detectada grande queda no número das Unidades Formadoras de Colônia ao longo dos meses, conforme observado na **Figura 3**. A estabilidade foi comprovada apenas por cinco meses, de acordo com a avaliação dos dados estatísticos presentes na **Tabela 13**.

Além disso, ainda para *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, conforme apresentado na **Tabela 26**, o resultado instável a 35 °C encontrado neste trabalho corrobora com resultados de outros estudos utilizando materiais microbiológicos. Em

outro estudo microbiológico utilizando *Escherichia coli*, foi também apresentada a diminuição do número de células bacterianas viáveis durante o estudo de estabilidade, observando-se perda de 15 UFC com cinco dias de incubação a 22 °C e chegando a perda total aos sete dias de incubação a 37 °C, neste caso empregou-se o *spray drying* como método de preservação, que consiste na secagem dos líquidos por pulverização, gerando um pó como produto final (JANNING *et al.*, 1995). O mesmo ocorreu em outro estudo durante a produção dessa mesma espécie bacteriana como MRC, em que ao longo dos sete dias de estudo frente às temperaturas de 30 °C e 37 °C, foi detectada perda da estabilidade do material, havendo um decréscimo da média geométrica de UFC de 55 para aproximadamente 8 (MAIER *et al.*, 1993). Durante o estabelecimento de MR de *Salmonella* em outro trabalho, se observou perda da estabilidade a 37 °C, diminuindo para menos da metade a média de UFC em aproximadamente 20 dias (In't VELD, 1998).

No processo de certificação do MRC de *C. albicans* NCPF 3179 produzido pelo *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), resultando em *C. albicans* IRMM-354, não foi feito estudo de estabilidade a curto prazo, já que a partir de estudos anteriores era sabido que para o tipo de material produzido, a única forma segura de envio é na forma congelada (De BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009). No presente estudo, o MRC liofilizado de *C. albicans* CFRVS MRC 40006 se apresentou estável nas três diferentes temperaturas testadas, conforme mostrado na **Tabela 24**, assim como os outros materiais de *C. neoformans* (**TABELA 20**) e *C. gattii* (**TABELA 22**).

Outra questão importante são as incertezas inerentes aos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização dos materiais estabelecidos neste trabalho. Esses valores pareceram extrapolar os números ideais, principalmente nos testes relacionados a *C. albicans* CFRVS MRS 40006 e *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, como mostra a **Tabela 39** com os valores de incerteza expandida, porém considerando que se trata de material biológico e que trabalhou-se com grandes quantidades de UFC (até 100 UFC), esse valor não é tão crítico. Nota-se que no estabelecimento de materiais de referência biológicos os valores das incertezas associados aos valores de propriedade, não são representados por valores ínfimos, diferentes dos materiais químicos, por exemplo. Isso pode se relacionar com a instabilidade natural do micro-organismo contribuindo para a variação entre as contagens.

O MRC microbiológico *C. albicans* IRMM-354 produzido pelo IRMM que apresenta valor de propriedade igual a 917 UFC quando plaqueado em ágar nutriente, tem incerteza associada a esse valor igual a 168 UFC, e quando plaqueado em ágar extrato de oxitetraciclina-glicose levedura, o valor atribuído é 912 e sua incerteza é 173 (De BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009). O MRC *C. albicans* CFVRS MRC 40006 estabelecido no presente trabalho apresenta algumas diferenças em relação ao material do IRMM, que é uma cepa diferente (originalmente NCPF 3179) da cepa do presente estudo (originalmente ATCC 10231), incluindo o tipo de material, que neste trabalho é material liofilizado, já o material do IRMM é esférico - resultante de um processo de liofilização - e congelado; além do valor de propriedade, que no atual estudo se estabeleceu como 46 UFC em meio YMA, enquanto o do IRMM é igual a 917 UFC ou 912, dependendo do meio de cultura utilizado.

A caracterização do material é a etapa realizada somente após a constatação da homogeneidade dos lotes. Assim como a homogeneidade e estabilidade, esta é uma fase crucial no estabelecimento de um MRC. Sendo assim, definir o melhor método para caracterização do material microbiológico é de grande relevância. No presente trabalho foram utilizados métodos fenotípicos e genotípicos para a caracterização dos materiais produzidos.

Uma das técnicas fenotípicas utilizadas no presente trabalho foi a análise por MALDI-TOF MS, que tem sido apontada como uma ferramenta de sucesso na identificação de diversas espécies (LIMA-NETO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Entretanto, é reconhecido que a maior limitação da utilização de MALDI-TOF MS é a identificação estar atrelada à disponibilidade de espectros de referência das espécies estudadas no banco de dados (IRIART *et al.*, 2012; PANDA *et al.*, 2015). No presente trabalho, em todos os testes essa relação pode ser observada. Para os testes com *Cryptococcus* spp. realizados pelo analista B, em que foi utilizado ácido fórmico, pode-se constatar que das 12 replicatas que não foram identificadas, cinco são referentes a três fungos (*C. humicola*, *C. albidus* e *C. podzolicus*) que não integram o banco de dados do equipamento utilizado. Por outro lado, as outras sete replicatas são referentes a *C. gattii* que é representado por apenas três espectros de referência no banco. Da mesma forma ocorreu para as identificações incorretas, das quatro replicatas, três são referentes a *C. gattii* e uma a *C. podzolicus*, conforme apresentado na **Tabela 33**.

O mesmo foi verificado nos testes com *Saccharomyces* spp., dentre as identificações incorretas as espécies *S. pastorianus*, *S. uvarum* e *S. bayanus* são as mais envolvidas, sendo que *S. pastorianus* foi representada por apenas dois espectros de referência no banco de dados, enquanto as outras duas espécies não têm representantes no banco.

Esses resultados estão em concordância com diversos trabalhos que afirmam que o sucesso desse método de identificação está atrelado ao banco de dados de espectros, sendo este o ponto chave para obtenção de resultados confiáveis (DE CAROLIS *et al.*, 2014; LACROIX *et al.*, 2014; TURHAN *et al.*, 2017).

Para as espécies que não tem espectros de referência que as represente, a não identificação como resultado seria mais apropriado do que uma falsa identificação, entretanto não foi o registrado nos resultados do presente trabalho que se referem ao gênero *Saccharomyces*, como expresso nas **Tabela 36** e **Tabela 37**, divergindo do relato de Iriart *et al.* (2012) que afirmaram que o equipamento Vitek MS, o mesmo utilizado no presente trabalho, geralmente, apresenta a vantagem de gerar uma resposta “sem identificação” em vez de identificar incorretamente.

Para a análise do perfil proteômico utilizando MALDI-TOF MS a fim de identificar as cepas de *Candida*, foi observado que houve um índice de não identificação nos testes realizados pelo analista A (**FIGURA 15**), que não está em concordância com inúmeros trabalhos que estimam a performance da técnica na identificação de espécies desse gênero (BUCHAN; LEDEBOER, 2013; CHALUPOVÁ *et al.*, 2013; DE CAROLIS *et al.*, 2014; LACROIX *et al.*, 2014; TURHAN *et al.*, 2017).

Entretanto, com os testes realizados pelo analista B (**FIGURA 17**), observou-se resultados diferentes dos que foram encontrados pelo analista A (**FIGURA 15**), sendo mais acurados. Estes resultados para *Candida* spp. são corroborados por outros estudos em que a performance observada foi de 96 a 100% de identificação correta de espécies deste gênero (BUCHAN; LEDEBOER, 2013; DHIMAN *et al.*, 2011; GORTON *et al.*, 2014; WESTBLADE *et al.*, 2013). Em alguns casos, dentro do gênero *Candida*, a identificação incorreta está conexas às espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* por se apresentarem fortemente relacionadas (WESTBLADE *et al.*, 2013), porém, no presente estudo, a única cepa de *C. dubliniensis* estudada foi corretamente identificada, assim como nenhuma cepa de *C. albicans* foi identificada incorretamente como *C. dubliniensis*, conforme observa-se na **Tabela 35**.

Observa-se que há uma variação grande entre os resultados obtidos a partir da análise com os diferentes analistas, utilizando o ácido fórmico. Enquanto 38% das replicatas de *Candida* spp. não foram identificadas nos testes com o analista A (**FIGURA 15**), esse valor se limitou a 6% quando os testes foram executados pelo analista B (**FIGURA 17**). Sabe-se que o preparo da amostra a ser analisada por esse método influencia diretamente nos resultados gerados. Ou seja, o preparo inadequado do poço (*spot*) correspondente a cada isolado pode resultar na não identificação da amostra (ANAGNOSTEC, 2008; MEDEIROS, 2015). As análises realizadas por diferentes analistas podem estar associadas à variação dos resultados.

O ácido fórmico é recomendado para os testes com leveduras, uma vez que auxiliam no rompimento da parede celular, composta por glucanas e quitinas. A fim de facilitar e agilizar o teste, a aplicação do ácido fórmico neste trabalho foi realizada direto sobre os analitos depositados na placa alvo antes da adição da matriz, já que é uma técnica apresentada em diversos trabalhos com excelente performance (CRUZ, 2015; GORTON *et al.*, 2014; IRIART *et al.*, 2012). A aplicação ou a ausência de ácido fórmico antes da aplicação da matriz pode influenciar diretamente nos resultados, levando à não identificação da amostra. O que pode estar associado à diferença de resultados entre os testes com e sem ácido fórmico encontrados no presente trabalho.

Nos testes com as espécies de *Cryptococcus* sem ácido fórmico, 35% das replicatas não foram identificadas, esse valor reduziu para 18% quando o ácido fórmico foi utilizado. Para as cepas de *Candida*, quando o ácido fórmico não foi utilizado, 78% das replicatas foram identificadas corretamente, enquanto com o uso de ácido fórmico esse valor aumenta para 94%. O mesmo ocorreu para *Saccharomyces* spp., em que foi notado um aumento de 60% para 70% de identificação direta quando o ácido fórmico foi utilizado.

Um aspecto importante a ser discutido ainda nas análises por MALDI-TOF MS com as cepas de *C. albicans* do presente trabalho está relacionado com os resultados duvidosos, em que a identificação é dividida entre *C. africana* e *C. albicans*, como informado na **Tabela 34** e **Tabela 35**. *C. africana* foi descrita recentemente como uma espécie altamente relacionada com *C. albicans*, e alguns autores sugerem que a diferenciação possa ocorrer por meio do sequenciamento da região ITS e do gene *hwp1* (THEILL *et al.*, 2016). Anteriormente, *C. africana* era

considerada uma cepa atípica de *C. albicans*, porém diante de diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas foi proposta a descrição como nova espécie (TIETZ *et al.*, 2001). Essa proximidade entre espécies pode explicar os resultados duvidosos obtidos por esse método.

A utilização da análise por MALDI-TOF MS vem trazendo há alguns anos a expectativa de um método promissor para identificação de leveduras, principalmente as de importância clínica, como os gêneros *Cryptococcus* e *Candida* (BUCHAN; LEDEBOER, 2013; WASTBLADE *et al.*, 2013). O presente trabalho se encontra de acordo com esse indicativo, uma vez que os resultados tendem a mostrar que quando a espécie tem uma quantidade significativa de espectros de referência no banco de dados, a probabilidade de identificação correta é elevada, o que vai de encontro à teoria de que a identificação por esse método é limitada pelo tamanho da biblioteca de espectros de referência (BUCHAN; LEDEBOER, 2013; TURHAN *et al.*, 2017).

Em outro trabalho de MALDI-TOF MS, utilizando o sequenciamento da região ITS em paralelo, se recomenda que quando houver falhas na identificação por meio de análises por MALDI-TOF, se aplique técnicas genotípicas, porém em apenas 0,3% (1/297) das cepas se fez necessário essa aplicação, demonstrando a eficiência do método de identificação de micro-organismos por análise de proteínas (GORTON *et al.*, 2014).

O conjunto composto por identificação precisa, resposta rápida e baixo custo impactam positivamente na utilização da análise por MALDI-TOF na prática clínica (BUCHAN; LEDEBOER, 2013; WESTBLADE *et al.*, 2013). No presente trabalho, compreende-se que essa concordância não foi observada devido à ausência de espectros de referência, no banco de dados utilizado, suficientes para a comparação com os perfis gerados, ocorrendo, conseqüentemente, a não identificação ou identificação incorreta das espécies. Além disso, outro problema constatado foi a influência do analista nos resultados, o que não é adequado para se obter identificações acuradas.

Alguns autores já discutem por longa data que além dos testes fisiológicos e morfológicos, técnicas moleculares devem ser utilizadas com o objetivo de estreitar o conhecimento acerca da identificação e distinção mais precisa de cepas de leveduras. Sabe-se que a sistemática baseada em critérios fenotípicos nem sempre

é suficiente para a caracterização de espécies de leveduras (COTTRELL *et al.*, 1986).

A região ITS do rDNA tem sido o marcador mais utilizado tanto para taxa único, como para amostras ambientais mistas. Neste último caso, essa região se mostra bastante interessante devido ao grande número de cópias de ITS por célula, já que a quantidade de DNA presente em substratos ambientais geralmente é baixa (BELLEMAIN *et al.*, 2010).

Essa região se apresenta como o marcador genético de fungos sequenciado com maior frequência quando comparado a outros marcadores, porém apresenta alguns problemas como marcador universal de código de barras para esse grupo. Alguns autores citam que a presente variabilidade intraespecífica, por exemplo, pode ser uma problemática na identificação ao nível de espécie (NILSSON *et al.*, 2008).

No presente estudo, essa teoria se confirma para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, que são altamente relacionadas, não sendo possível a diferenciação por esse método. Assim como para as espécies do gênero *Saccharomyces*, integrantes do grupo *Saccharomyces sensu stricto*, que apresentam grandes semelhanças fenotípicas e não foram diferenciadas pelo sequenciamento da região ITS.

O banco de dados de sequências genéticas mais utilizado, tanto pelos microbiologistas clínicos, como pela comunidade científica em geral, é o GenBank, que é o principal repositório de sequências de nucleotídeos atualmente. Entretanto existem muitas limitações, como dados obsoletos e erros técnicos na identificação. Por isso, em 2011, foi criado um grupo de trabalho no ISHAM para criar um banco de dados, denominado ISHAM-ITS, que minimize esses problemas (IRINYI *et al.*, 2015; IRINYI *et al.*, 2016).

Neste estudo as sequências foram comparadas com as sequências dos dois bancos de dados. Para o gênero *Candida* não foi observada nenhuma diferença significativa entre as análises, em contrapartida para *Saccharomyces* spp. e *Cryptococcus* spp. foram observadas algumas distinções. O GenBank gerou identificação correta para as cepas de *C. albidus* CFRVS 40077, *C. podzolicus* CFRVS 40232, *C. laurentii* CFRVS 40043 e *C. humicola* CFRVS 40292, enquanto no ISHAM-ITS esse resultado não ocorreu. Já para *Saccharomyces* spp. o banco de dados mais eficiente foi o ISHAM-ITS, apresentando melhores resultados, inclusive para todas as cepas estudadas de *S. cerevisiae*.



O sequenciamento da região ITS para diferenciação de espécies do gênero *Saccharomyces* é um método reconhecido como promissor em alguns trabalhos (IRINYI *et al.*, 2015; LEAW *et al.*, 2006; NAUMOV *et al.*, 2000). *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. pastorianus* foram diferenciados corretamente por meio do sequenciamento do ITS em um estudo que realizava a análise do sequenciamento do 18S em paralelo. Inclusive, o sequenciamento da região ITS apresentou resultados mais eficientes para a discriminação das espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto* quando comparado ao gene 18S rRNA (NAUMOV *et al.*, 2000).

Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo não foram promissores ao nível de diferenciação da espécie *S. cerevisiae* diante das outras analisadas, além disso, a espécie *S. paradoxus* foi detectada em vários resultados. Essa identificação pode estar relacionada aos dados da literatura, que apresentam *S. paradoxus* como a espécie mais estreitamente relacionada à *S. cerevisiae*, com base em estudos filogenéticos (BORNEMAN; PRETORIUS, 2015).

Bellemain *et al.* (2010) realizaram análises de PCR *in silico*, utilizando combinação de iniciadores comumente aplicados. Foi observado então que alguns iniciadores foram tendenciosos a amplificar determinados grupos taxonômicos. ITS1-F, ITS1 e ITS5 se mostraram tendenciosos na amplificação de fungos da classe dos basidiomicetos, enquanto ITS2, ITS3 e ITS4 amplificaram com mais precisão os fungos ascomicetos. Esses dados não convergem com os encontrados no presente trabalho, em que se pode observar uma vantagem maior para os fungos basidiomicetos, representados pelas espécies de *Cryptococcus*, quando a amplificação é melhor realizada com ITS4. Dentre os fungos ascomicetos representados neste trabalho por *Candida* spp. não foi observada nenhuma diferença. Já nas análises de outros representantes dos fungos ascomicetos, as espécies de *Saccharomyces*, uma pequena vantagem foi observada durante a análise com o ITS4, uma vez que algumas cepas de *S. cerevisiae* só foram identificadas a partir desse iniciador (**APÊNDICE C**), concordando com os resultados de Bellemain *et al.* (2010).

Um outro trabalho avaliou as regiões ITS1 e ITS2 de 373 cepas (299 de referência e 74 isolados clínicos), incluindo 86 diferentes espécies, entre elas, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *S. cerevisiae*, *C. albidus*, *C. humicola*, *C. laurentii* e *C. neoformans*, e demonstrou que o sequenciamento da região ITS, principalmente a

região ITS2, visando a identificação de leveduras clinicamente importantes, é confiável e pode ser utilizado como um bom método alternativo aos métodos fenotípicos (LEAW *et al.*, 2006). Entretanto, o presente estudo apresenta resultados concordantes apenas para *C. albicans* e *C. dubliniensis*, já que essas duas espécies foram diferenciadas pelos dois bancos de dados, conforme apresentado no **Apêndice C**.

O ponto crítico dessa identificação está relacionado à variação intraespécie média das sequências ITS incluídas na base de dados ISHAM-ITS, que varia entre 0 e 2,25% (IRINYI; MEYER, 2015). Entretanto alguns dos valores resultantes do pareamento das sequências de *C. albicans* do presente trabalho foram menores que 97,75%, o que gera questionamentos aos valores de referência do ISHAM-ITS, uma vez que dentre os resultados obtidos não foi apresentada nem mesmo uma segunda opção de identificação para estas cepas.

A identificação correta de espécies fúngicas é cada vez mais importante nos diagnósticos clínicos, uma vez que as infecções causadas por esses agentes são um grande problema de saúde pública. Os laboratórios de micologia, de uma forma geral, utilizam com mais frequência a identificação fenotípica convencional, baseada na morfologia e bioquímica, porém sabe-se que, comparada às técnicas genotípicas, essas demandam mais tempo e são totalmente operador dependente, já que requerem *expertise* em morfologia e taxonomia (IRINYI; MEYER, 2015; IRINYI *et al.*, 2016).

Diante disso se torna necessário buscar alternativas mais práticas como o DNA *barcode*, que consiste em sequenciar fragmentos curtos para identificação ao nível de espécie por meio de comparação com espécies contidas numa coleção de referência (IRINYI; MEYER, 2015). Por isso foi realizada a tentativa de identificação por meio da região ITS no presente trabalho, visto que essa região se tornou o marcador genético mais popular na identificação de fungos e na taxonomia molecular e, conseqüentemente, um candidato promissor para o *Barcode* para fungos (IRINYI *et al.*, 2016).

No caso dos MRC desenvolvidos nesse estudo que apresentam importância clínica, *C. neoformans* e *C. gattii*, o sequenciamento da região ITS não é a melhor opção para a identificação inequívoca, visto que essas duas espécies não foram diferenciadas por essa técnica. Diferente dos resultados do trabalho desenvolvido por Irinyi *et al.* em 2015, em que a diversidade intraespécie de 176 espécies

fúngicas foi avaliada, incluindo os diferentes tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*, além de *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *S. cerevisiae*. Dentre estes, foi demonstrado que apenas para *C. neoformans* VNI e *C. neoformans* VNII, a região ITS não foi suficiente para identificação. O presente trabalho corrobora esses resultados no caso de *Candida* spp., *C. albidus* e *C. laurentii*, em que o sequenciamento da região ITS foi eficiente para a identificação das espécies.

Irinyi *et al.* (2016) sugerem que, mesmo a região ITS sendo adotada como o marcador mais indicado como o código de barras para fungos, para algumas espécies o uso de marcadores secundários pode ser necessário. No presente trabalho foi observada essa necessidade frente às espécies altamente relacionadas, como *C. neoformans* e *C. gattii*, e as cepas do grupo *Saccharomyces sensu stricto*, já que esse método não foi suficiente para a diferenciação dessas espécies.

Para *Cryptococcus*, sabe-se que há a alta diversidade na região ITS, sendo assim métodos complementares são recomendados para realização de uma identificação confiável, como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *PCR-fingerprinting*, *RFLP-URA5* e *Multilocus sequence typing* (MLST) (IRINYI *et al.*, 2015).

No presente trabalho, as técnicas *PCR-fingerprinting* e *RFLP-URA5* foram aplicadas para a identificação das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. O método *PCR-fingerprinting* é mais difícil de reproduzir e mais oneroso para a realização em laboratórios de análises clínicas. Já *RFLP-URA5* se mostrou inteiramente eficiente para a diferenciação das cepas dessas duas espécies ao nível de tipo molecular, conforme apresentado na **Tabela 38**. Além disso, também no presente trabalho, esta técnica foi capaz de identificar corretamente, de acordo com o estudo de Meyer *et al.* (2009), o tipo molecular do híbrido *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* sor. AD CFRVS 40150, se comportando como padrão VNIII, já na análise por *PCR-fingerprinting*, essa cepa foi identificada como tipo VNII.

O ideal é que, sempre que possível, a caracterização das espécies fúngicas abordadas neste trabalho seja realizada a partir da combinação de dados obtidos a partir de métodos fenotípicos e genotípicos. Para os quatro MRC estabelecidos, apenas na certificação de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001 não se utilizou métodos de caracterização genotípica, uma vez que o sequenciamento da região ITS não foi capaz de gerar resultados seguros e inquestionáveis.

Neste trabalho, a maior dificuldade relacionada à caracterização foi a diferenciação de *S. cerevisiae* diante das outras espécies do mesmo gênero, integrantes do complexo *Saccharomyces sensu stricto*. A diferenciação entre essas espécies se torna bastante complexa devido à grande semelhança fenotípica, tanto morfológica, quanto no que diz respeito ao perfil bioquímico (BORNEMAN; PRETORIUS, 2015).

Para esta espécie, o método automatizado VITEK 2 poderia ser cotado como um método confiável para caracterização taxonômica do material, já que é amplamente utilizado pelos laboratórios de controle de qualidade, sendo apontado em dados da literatura como eficiente para *S. cerevisiae* (POSTERARO *et al.*, 2015, PUPPALA *et al.* 2018). Entretanto, os resultados da **Tabela 31**, indicaram que *S. pastorianus* e *S. bayanus* foram equivocadamente identificados como *S. cerevisiae*, demonstrando a fragilidade do método dentro deste grupo taxonômico. Sendo assim, o presente trabalho não concluiu a certificação de *S. cerevisiae* CFRVS MRC 40001, por não selecionar o método capaz de caracterizar essa espécie de maneira inequívoca.

Para os outros materiais, a composição de métodos fenotípicos e genotípicos foi aplicada. Na certificação de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 e *C. gattii* CFRVS MRC 40324, foram utilizados os testes de síntese de melanina e CGB para avaliação das características fisiológicas, assim como a técnica RFLP-URA5, que se apresenta muito eficiente na tipagem molecular dessas espécies (KIDD *et al.*, 2004; MEYER *et al.*, 2003).

Para a certificação de *C. albicans* CFRVS MRC 40006, também foram utilizadas as diferentes abordagens em conjunto. O crescimento em meio Chromoagar juntamente com o método bioquímico automatizado Vitek 2 foram utilizados para a caracterização fenotípica. Para a abordagem genotípica, o sequenciamento da região ITS foi eleito como a metodologia inequívoca para esta espécie. Este resultado se apresenta em concordância com os relatos da literatura que sustentam a teoria dessa região ser considerada a mais apropriada para caracterização de fungos. Um estudo bem recente mostrou que tem aumentado o número de trabalhos publicados em que os dados moleculares, principalmente os relacionados à região ITS, são frequentemente utilizados para a identificação de espécies fúngicas (RAJA *et al.*, 2017).

A região ITS, reconhecida como o atual *barcode* para fungos, mostra características melhores que outros locus, já que é facilmente amplificável, com iniciadores e condições de PCR gerais para a maioria dos taxa. Entretanto, não se mostra suficiente para resolver todos os problemas e uma possível razão para isso seria a baixa variabilidade nessa região. Para determinados taxa, será de fato interessante o estabelecimento de um *barcode* secundário, que deve manter as principais características, como sequência simples com alta divergência interespecie e baixa intraespecie, alta cobertura taxonômica, além dos requisitos de iniciadores universais e boas condições de PCR. Genes codificadores de proteínas são cotados como *barcodes* secundários, porém serão necessários vários estudos para que isso possa se concretizar. Enquanto não houver o estabelecimento de um *barcode* secundário, a região ITS continua sendo a melhor opção (IRINYI *et al.*, 2016). No atual trabalho, os resultados foram favoráveis apenas para o gênero *Candida*, em contrapartida, para os outros dois gêneros e suas espécies representantes, os resultados corroboram a teoria da necessidade de *barcode* secundário para as espécies altamente relacionadas.

A produção e certificação de um material de referência devem sempre ser acompanhadas de registros, a fim de demonstrar a rastreabilidade do processo por inteiro, sendo esta uma regra dos órgãos fiscalizadores. Os MRC estabelecidos no presente trabalho foram produzidos no Setor de Fungos do Laboratório de Microorganismos de Referência, situado no Departamento de Microbiologia do INCQS. Este setor se encontra inserido no contexto que circunda o sistema da qualidade e possui acreditação na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 em três ensaios, evidenciando ainda mais o rigor no critério discutido neste estudo.

O presente trabalho lança-se como pioneiro na produção de fungos como Materiais de Referência Certificados no Brasil, seguindo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017, a fim de atender às demandas dos laboratórios de controle de qualidade que necessitam implementar a utilização desses materiais em suas análises devido às exigências dos órgãos fiscalizadores. Adicionalmente, contribui para o desenvolvimento do projeto institucional que visa a estruturação do CRB-Saúde da Fiocruz.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Foram selecionadas duas cepas de origem ambiental, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, por serem o primeiro isolamento destas espécies no Brasil em área não antropizada;
- ✓ As cepas de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas foram provenientes da ATCC, sendo as mesmas citadas em ensaios farmacopéicos;
- ✓ Foram estabelecidas metodologias para a produção de três MRC, *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 e *C. albicans* CFRVS MRC 40006, seguindo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17034:2017;
- ✓ Os três lotes de MRC se apresentaram homogêneos frente aos estudos recomendados pelo ABNT ISO Guia 35:2012;
- ✓ Pela realização dos estudos de estabilidade foi verificado que *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 e *C. albicans* CFRVS MRC 40006 se apresentaram estáveis por um período de um ano quando armazenados a -20°C;
- ✓ *C. neoformans* CFRVS MRC 40323, *C. gattii* CFRVS MRC 40324 e *C. albicans* CFRVS MRC 40006 se apresentaram estáveis, durante sete dias, frente às três diferentes temperaturas avaliadas a fim de verificar as propriedades do material em condições de transporte;
- ✓ Aos três lotes de MRC foram atribuídos valores de propriedades quantitativos, bem como suas incertezas associadas;
- ✓ Para a caracterização taxonômica de *C. neoformans* CFRVS MRC 40323 e *C. gattii* CFRVS MRC 40324 foram eleitos os testes fenotípicos de síntese de melanina e CGB, adicionado à técnica genotípica RFLP-URA5;

- ✓ Para caracterização taxonômica de *C. albicans* CFRVS MRC 40006, foi escolhida avaliação do crescimento em meio Chromoagar e o método bioquímico automatizado Vitek 2, além da abordagem genotípica por meio do sequenciamento da região ITS;
- ✓ Não foi possível a definição de um método inequívoco para diferenciação das cepas do gênero *Saccharomyces* estudadas no presente trabalho;
- ✓ Estudos adicionais serão necessários para a conclusão da caracterização do material relacionado a *S. cerevisiae* e, posterior, certificação;
- ✓ Foi evidenciado que o sucesso das análises por MALDI-TOF MS foi totalmente dependente da quantidade de espectros de referência representantes das espécies estudadas no banco de dados utilizado;
- ✓ As análises por MALDI-TOF MS, utilizando o equipamento VITEK MS e o banco de dados SARAMIS Premium, foram efetivas para as cepas de *Candida* spp., chegando a atingir, com a utilização de ácido fórmico, 94% de resultados com identificação correta;
- ✓ A utilização de ácido fórmico nas análises de MALDI-TOF MS auxiliou para o incremento de identificações corretas em todos os gêneros estudados;
- ✓ O sequenciamento da região ITS, a região designada atualmente como principal *Barcode* para fungos, apresentou resultados promissores apenas para as cepas de *Candida* spp.;
- ✓ *C. neoformans* e *C. gattii* não foram diferenciadas a partir do sequenciamento da região ITS;
- ✓ Comparando os dois bancos de dados (GenBank e o ISHAM-ITS), para cada gênero um banco diferente se destacou, assim não foi possível identificar o banco de dados mais eficiente;

- ✓ Foram elaborados relatórios de certificação para os três MRC produzidos, todos com os valores de incerteza expandida.



## REFERÊNCIAS

ABDELMASSIH, M. *et al.* Development and validation of stable reference materials for food microbiology using *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores. **J Appl Microbiol.**, v. 110, p. 1524-30, 2011.

ABNT. **ISO GUIA 30**: termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro, 2016.

ABNT. **ISO GUIA 31**: materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos. Rio de Janeiro, 2017.

ABNT. **ISO GUIA 34**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2012a.

ABNT. **ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012b.

ABNT. **ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2017.

ALMEIDA JUNIOR, J.N. *et al.* Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionization – time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, n. 8, p. 784-90, 2014.

ALVES, N.P.; MORAES, D.N. Metrologia química e a utilização de materiais de referência em medições químicas. **Analytica**, v. 54, n. 3, 2003.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BAUME, M. *et al.* The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. **J Appl Microbiol.**, v. 114, p. 1725-33, 2013.

BEGEROW, D. *et al.* Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 87, p. 99-108, 2010.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. 5. ed. São Paulo: FUNPEC, 2006.

BELLEMAIN, E. *et al.* ITS as na environmental DNA barcode for fungi: na *in silico* approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 189, 2010.

BENSON, D.A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. D32-D37, 2014.

BI, J. *et al.* Development of hemoglobin A1c certified reference material by liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.**, v. 403, p. 549-54, 2012.

BIDARTONDO, M.I. Preserving accuracy in GenBank. **Science**, v. 319, p. 1616, 2008.

BISPO, J.M.A. **Certificação de material de referência de minério de ferro utilizando programa interlaboratorial**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2007.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clin Microbiol Infect.**, v. 16, p. 1614-19, 2010.

BORNEMAN, A.R.; PRETORIUS, I.S. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Genetics**, v. 199, p. 281-91, 2015.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. **Decreto nº 6.041, de 08 de fevereiro de 2007**. Institui a política de desenvolvimento a biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Brasília, DF, [2007]. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm)>. Acesso em: 19 jan.2018.

BRASIL. Resolução nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e

semicríticos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 158, p. 44-6, 18 ago. 2010.

BRITO-SANTOS, F. *et al.* *Tinea capitis* by *Microsporum audouinii*: Case reports and review of published global literature 2000-2016. **Mycopathologia**, v. 182, p. 1053-60, 2017.

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. **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 5, p. 1359-66, 2013.

CANHOS, V.P. *et al.* O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Culturas de Microrganismos. **Braz J Microbiol.**, v.1, n. 2, p. 40-8, 2007.

CARDOSO, M.H.W.M. *et al.* Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da estabilidade. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v. 30, n. 2, p. 439-46, 2010a.

CARDOSO, M.H.W.M. *et al.* Preparação de um Material de Referência Certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v. 30, n. 2, p. 429-38, 2010b.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. In: **American Society for Microbiology Press**, Washington, DC., 1998.

CHALUPOVÁ, J. *et al.* Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnol Adv.**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>.

CHUI, Q. S. H.; IAMASHITA, C. O.; BISPO, J. M. A. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Quim Nova**, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, 23 p, 2013.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36. p. 308-407, 2012.

CRUZ, F.V. **Caracterização fenotípica de fungos isolados do controle microbiológico de Bio-Manguinhos /Fiocruz e estruturação de uma micoteca.** 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

DAY, J.G.; STACEY, G.N. Freeze-Drying of Yeast Cultures. *In:* CRYOPRESERVATION and Freeze-Drying Protocols. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2007.

DE BAETS, L.; MEEUS, N.; SHIMMEL, H. Certification of a reference material with *Candida albicans* (NCPF 3179) at a target level of 1000 colony forming units per material sphere IRMM-354. **JRC Scientific Tech Reports**, 2009. Disponível em: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC50066/102-2009\\_as%20published.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC50066/102-2009_as%20published.pdf). Acesso em: 10 mar. 2017.

DE CAROLIS, E. *et al.* Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Med Mycol.**, v. 52, p. 123-30, 2014.

DE HOOG, G.S. *et al.* Taxonomy of medically important fungi in the molecular era. **Lancet Infect Dis.**, v. 13, p.385-86, 2013.

DHIMAN, N. *et al.* Performance and cost analysis of Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. **J Clin Microbiol.**, v.49, n. 4, p. 1614-16, 2011.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FELL, J.W. *et al.* Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 50, p. 1351-71, 2000.

FERRER, C. *et al.* Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **J Clin Microbiol.**, v. 39, p. 2873-79, 2001.

FIRACATIVE, C.; TRILLES, L.; MEYER, W. MALDI-TOF MS Enables the Rapid Identification of the Major Molecular Types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, e37566, 2012.

FONSECA, A.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. *Cryptococcus* Vuillemin, In. KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publishers, p. 1661-1740, 2011.

FORTES, S.T. *et al.* First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, p. 137-40, 2001.

FORTI, T. **Avaliação dos Setores de Fungos de Referência e de Alimentos do INCQS como produtores de material de referência na área biológica**. 2013. 161 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

FORTI, T. *et al.* Evaluation of a fungal collection as certified reference material producer and as a biological resource center. **Braz J Microbiol.**, v. 47, p. 403-09, 2016.

FRAGA, I.C.S. *et al.* Certified reference material of bioethanol for metrological traceability in electrochemical parameters analyses. **Talanta**, v. 99, p. 99-103, 2012.

FRITZE, D.; MARTIN, D.; SMITH, D. **Final report on the GBRCN demonstration project**. Braunschweig: GBRCN Secretariat. Disponível em: [http://www.gbrcn.org/fileadmin/gbrcn/media/downloads/GBRCN\\_Final\\_Report/GBRCN-FinalReport2012.pdf](http://www.gbrcn.org/fileadmin/gbrcn/media/downloads/GBRCN_Final_Report/GBRCN-FinalReport2012.pdf). Acesso em: 18 out. 2016.

GODFRAY, H.C.J. Challenges for taxonomy. **Nature**, v. 417, p. 17-19, 2002.

GORTON, R.L. Evaluation of a short, on-plate formic acid extraction method for matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry-based identification of clinically relevant yeast isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 52, n.4, p. 1253-55, 2014.

HEBERT, P.D.N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci.**, v. 270, p. 313-21, 2003.

HOLANDA, P., *et al.* Conformity Assessment for Biological Resource Centres (BRC): The Brazilian Approach. **Newsletter**, n.52, p. 11-13, 2012. Disponível em: <http://www.wfcc.info/newsletter/>. Acesso em: 16 mar.2017.

IRIART, X. *et al.* Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight system with a new time-effective strategy. **J Clin Microbiol.**, v. 50, n. 6, p. 2107-10, 2012.

IRINYI, L. *et al.* International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)- ITS reference DNA barcoding database – the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungal. **Med Mycol.**, v. 53, p. 313-37, 2015.

IRINYI, L.; MEYER, W. DNA barcoding of human and animal pathogenic fungi: the ISHAM-ITS database. **Microbiol Aust.**, p. 44-8, 2015.

IRINYI, L. *et al.* DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biol.**, v. 120, p. 125-36, 2016.

INAGAKI, S. *et al.* Characterization of Certified Reference Material for the quantification of water in bioethanol. **Anal Sci.**, v. 28, p. 1089-95, 2012.

INMETRO. **NIT-DICLA-061**: requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de Materiais de Referência dos Centros de Recursos Biológicos. [Rio de Janeiro], 2012.

INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). 3. ed. Rio de Janeiro, 2012. 94 p.

IN'T VELD, P.H. *et al.* Potential use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors: a collaborative study. **Food Microbiol.**, v. 12, p. 125-34, 1995.

IN'T VELD, P.H. *et al.* The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **J Appl Bacteriol.**, v. 80, p. 496-504, 1996.

IN'T VELD, P.H. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. **Int J Food Microbiol.**, v. 45, p. 35-41, 1998.

JANSSENS, D. *et al.* The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. **Res Microbiol.**, v. 161, p. 422-29, 2010.

JANNING, B. *et al.* Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius J Anal Chem.**, v. 352, p. 240-45, 1995.

KATSU, M. *et al.* The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 377-88, 2004.

KISS, L. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. **PNAS**, n. 27, v. 109, E1811, 2012.

KIDD, S.E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **PNAS**, v. 101, n. 49, 17258-63, 2004.

KWON-CHUNG, K. J. Morphogenesis of *Filobasidella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 68, p. 821-83, 1976.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; THEODORE, T. S. C. *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov.: Serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **Int J Syst Bacteriol.**, v. 28, p. 616-20, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation, of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol.**, v. 15, p. 535-37, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. *In: Medical Mycology*. Ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992, p. 392-446.

KWON-CHUNG., K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, p. 804-06, 2002.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The case for adopting the "Species complex" nomenclature for the etiologic agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, e00357-16, 2017.

LACHANCE, M. *et al.* *Candida* Berkhout, *In*: KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**: a taxonomic study. 5 ed. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publishers, 2011. p. 987-1278.

LACROIX, C. *et al.* Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. **Mycology**, v. 20, p. 153-58, 2014.

LAMBERTY, A. *et al.* The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius J Anal Chem.**, v. 360, p. 359-61, 1998.

LEAW, S.N. *et al.* Identification of medically important Yeast species by sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer regions. **J Clin Microbiol.**, n. 3, v. 44, p. 693-99, 2006.

LIMA-NETO, R. *et al.* Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Braz J Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 515-22, 2014.

MAIER, E.A. *et al.*, Reference materials and certified reference materials for water and food microbiology. **Fresenius J Anal Chem.**, v. 345, p. 140-43, 1993.

MARKLEIN, G. *et al.* Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 47, p. 2912-17, 2009.

MARTINS, A.; LIMA, N.; SAMPAIO, P. A standard proposal for biological resources centres. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE ON QUALITY ENGINEERING AND MANAGEMENT, 1., 2014. **Proceedings [...]**. [S.l.]: ICQEM, 2014. p. 221-233.

MCTAGGART, L.R. *et al.* Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 8, p. 3050-53, 2011.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 9, p. 1648-54, 1995.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified



polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-99, 1999.

MEYER, W.; MASZEWSKA, K.; SORRELL, T.C. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Med Mycol.**, v. 39, p. 185-93, 2001.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis.**, v. 9, p. 189-95, 2003.

MEYER, W. *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol.**, v. 47, n. 6, p. 561-70, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância epidemiológica da criptococose**. Brasília, DF, 2012.

MONTEIRO, M. A. **Produção de material de referência certificado de oxitetraciclina em leite**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic? **Int J Microbiol.**, v. 2012, 7 p., 2012. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/205921/>. Acesso em: 20 set. 2013.

MOURA, S. S; COSTA, S. R. R. **Estudo de caso sobre o uso de materiais de referência por laboratórios de análises de água, sob a ótica da ABNT NBR ISO IEC 17025**. Disponível em: [http://www.aedb.br/seget/artigos07/1323\\_1323\\_SUZANA%20MOURA%20SEGET%202007.pdf](http://www.aedb.br/seget/artigos07/1323_1323_SUZANA%20MOURA%20SEGET%202007.pdf). Acesso em: 18 jul. 2013.

MYCOBANK DATABASE. **Fungal Database, Nomenclature & Species**. Disponível em: <http://www.mycobank.org/> . Acesso em: 01 mar. 2018.

MUIR, A.; HARRISON, E.; WHEALS, A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. **FEMS Yeast Res.**, v. 11, p. 552-63, 2011.

NAUMOV, G.I. *et al.* Three new species in the *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 50, p. 1931-42, 2000.

NILSSON, R.H. *et al.*, Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. **PLoS One**, v.1, p. e59, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000059>. Acesso em: 20 nov. 2017.

NILSSON, R.H. *et al.*, Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the International Sequence Databases and its implications for molecular species identification. **Evol Bioinform.**, v. 4, p. 193-201, 2008.

OECD. Biological Resources Centers. **Underpinning the future of life sciences and biotechnology**. Paris, 2001.

OECD. **Best practices guidelines for biological resource centers**. Paris, 2007.

OLIVEIRA, M.M.E. *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of *Sporothrix* species complex. **Res Microbiol.**, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.008> . Acesso em: 22 jan. 2015.

OTAKE, T. *et al.* Characterization of certified reference material for quantification of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish. **Anal Bioanal Chem.**, v. 397, p. 2596-77, 2010.

PANDA, A. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **J Microbiol Methods**, v. 109, p. 93-105, 2015.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein**, v. 10, n. 1, p. 118-19, 2012.

PEREIRA, L. *et al.* The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 32, n. 1, p. 11-17, 2014.

PHILIPP, W.J. *et al.* Development of reference materials for microbiological analysis. **Accredit Qual Assur.**, v. 12, p.134-38, 2007.

POSTERARO, B. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **J Clin Microbiol.**, v. 50, n. 7, p. 2472-76, 2012.

POSTERARO, B. *et al.* 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.**, v. 53, n. 8, p. 2439-2450, 2015.

PUPPALA, K.R. *et al.* Dephosphorylating and probiotic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3662) strain for amelioration of nutritional quality of functional foods. **Probiotics Antimicrob. Proteins**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9394-y>. Acesso em: 31 mar. 2018.

RAINIER, S. *et al.* Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. **Appl Environ Microbiol.**, v. 72, p. 3968-74, 2006.

RAJA, H.A. *et al.* Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **J Nat Prod.**, v. 80, p. 756-70, 2017.

ROSAS, C.O. *et al.* Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 15-22, 2010.

SAMPAIO, J.P., GONÇALVES, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, p. 2144-52, 2008.

SANTOS, C. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 71, p. 304-08, 2011.

SARDI, J.C.O. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol.**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SCHOCH, C.L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS**, v. 109, n. 16, p. 6241-46, 2012.

SIMÕES, M.F. *et al.* Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and Applications. *In: MANAGEMENT of Microbial Resources in the Environment.* [S. l.]: Ed. Springer Science, 2013, p. 91-117.

SMITH, D.; MCCLUSKEY, K.; STACKEBRANDT, E. Investment into the future of microbial resources: culture collection funding models and BRC business plans for biological resources centers. **SpringerPlus**, v. 81, n. 3, 2014.

SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. Preservation Techniques. *In: The Preservation and Maintenance of Living Fungi.* [S. l.]: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1983. p. 12-20.

STACKEBRANDT, E. Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. **SpringerPlus**, v. 208, n. 3, 2014.

SULLIVAN, D.J. *et al.* *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiol.**, v. 141, n. 7, p. 1507-21, 1995.

THEILL, L. *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. **Rev Argen. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 43-9, 2016.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

THE UNITED States Pharmacopoeia. 36. ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2013

TIETZ, H.J. *et al.* *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? **Mycoses**, v. 44, p. 437-45, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Crescimento Microbiano. *In: Microbiologia.* 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TURHAN, O. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS for the identification of yeast isolates causing bloodstream infection. **Clin Lab.**, v. 63, n. 4, p. 699-703, 2017.

ULRICH, J.C. **Preparação e caracterização de um material de referência de peixe**. 2011. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2011.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**: a taxonomic study. 5. ed. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 733-746, 2011.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **J Bact.**, v. 172, n. 8, p. 4238-46, 1990.

VOSS, Jussara J. Centros de recursos biológicos: resultados promissores. **Boletim do Instituto de Tecnologia do Paraná**, Paraná, n.218, p.1, jul. 2008.

WESTBLADE, L.F. *et al.* Multicenter study evaluating the Vitek MS System for identification of medically important yeasts. **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 7, p. 2267-72, 2013.

WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS. Culture Collection Information Worldwide. Bélgica, 2018. Disponível em: [http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col\\_by\\_country/b/55/](http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/b/55/) . Acesso em: 26 mar. 2018.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTION. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Bélgica, 1999. Disponível em: <http://www.cabri.org/guidelines/phages/m100ap1.html> Acesso em: 17 out. 2016.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTION. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Bélgica, 2010. Disponível em: <http://www.wfcc.info/>. Acesso em: 10 jan. 2015.

YAMAN, G.; AKYAR, I.; CAN, S. Evaluation of the MALDI-TOF MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 73, n. 1, p. 65-7, 2012.

**APÊNDICE A** - Planejamento da produção de lote piloto de Materiais de Referência  
Certificados  
(*Cryptococcus neoformans* CFRVS MRC 40323 e *Cryptococcus gattii* CFRVS MRC 40324)

## INTRODUÇÃO

A utilização de Material de Referência Certificado (MRC) tem sido fundamental para os laboratórios que desejam obter resultados confiáveis, já que seus valores de propriedade são bem definidos, garantindo assim a rastreabilidade de determinados parâmetros em áreas como química, física ou biologia (ABNT, 2000).

A aquisição de Materiais de Referência (MR) pelos laboratórios brasileiros tem sido muito dificultada devido à inexistência destes materiais na indústria nacional, bem como os altos custos relacionados à importação (MONTEIRO, 2010).

Quando se trata de material biológico, a dificuldade é ainda maior, já que na produção de MR destinados a ensaios microbiológicos, há a instabilidade natural dos microorganismos (PHILIPP *et al.*, 2007).

O apoio ao desenvolvimento de MRC biológico é de fundamental importância para o Brasil, a fim de permitir que atividades de controle de qualidade de produtos ou de análises clínicas, cujas exigências por MRC têm sido cada vez maiores por parte dos órgãos fiscalizadores, se tornem mais ágeis, eficientes e menos onerosos.

A criptococose está entre as infecções fúngicas humanas de maior letalidade, principalmente sob a forma de meningoencefalite, considerada como uma importante infecção oportunista, nos casos de AIDS é a terceira em frequência (CASADEVAL; PERFECT, 1998). Diante disso, torna-se relevante o desenvolvimento de metodologia para a produção de fungos como MRC (*Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*) para utilização em Controle da Qualidade de Análises Clínicas.

Este planejamento descreve a certificação do lote piloto contendo 200 frascos para cada um dos MRC estabelecidos (*Cryptococcus neoformans* CFRVS MRC 40323 e *Cryptococcus gattii* CFRVS MRC 40324), onde a faixa de unidades formadoras de colônia (UFC) na alíquota estabelecida, após a liofilização, seja não mais que 100 UFC.

Como produtor de MRC, o Setor de Fungos segue as orientações da Série ISO Guia 30 em especial os critérios harmonizados baseados na combinação da ABNT ISO Guia 34 e da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 e inclui todos os requisitos necessários para a produção do material, desde a autenticação até os estudos de homogeneidade e estabilidade.

Um dos métodos utilizados para a caracterização do lote, bem como para os ensaios de homogeneidade e estabilidade será a contagem de colônias em ágar Malte-Levedura

(YMA). Além disso, outros métodos fenotípicos serão aplicados para confirmação da identidade dos fungos, como exemplo tem-se o teste em ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) que é um meio específico para diferenciar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.

## **ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO**

Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz  
Instituto Nacional de Controle em Saúde – INCQS  
Departamento de Microbiologia (DM)  
Laboratório de Micro-organismos de Referência (LMR)  
Setor de Fungos (SF)  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21.040-900

## **FINANCIAMENTO**

A produção dos materiais *Cryptococcus neoformans* CFRVS MRC 40323 e *Cryptococcus gattii* CFRVS MRC 40324 será realizada com recursos do INCQS, do Programa de Auxílio a Projetos de Inovações Tecnológicas - ADT1/FAPERJ e bolsa referente ao Projeto de Inovação Tecnológica (INOVATEC)/Fiocruz.

## **OBJETIVOS**

Prover à Rede de Laboratórios de Referência Nacional em Micoses Sistêmicas (LRNMS) dois MRC que serão utilizados como cepas de referência nacional de *C. neoformans* e *C. gattii*; Contribuir para a garantia da qualidade de ensaios relacionados à caracterização de *C. neoformans* e *C. gattii*.

## **PARTICIPANTES**

Os MRC serão desenvolvidos e processados pelo SF, assim como as análises de homogeneidade, estabilidade e caracterização.

## **PROCESSAMENTO**

Para o MR discutido aqui o valor-alvo foi fixado em não mais que 100 UFC por alíquota de 100 µL.

Será procedido cultivo da levedura a partir de um estoque criopreservado. A partir deste cultivo será preparada uma suspensão em agente criopreservador adequado que consiste de uma matriz de proteína, que permite a manutenção da viabilidade das células das leveduras após os procedimentos de preservação.

Serão distribuídas alíquotas de 0,5 mL da suspensão final em frascos estéreis e a sequência de distribuição será monitorada do primeiro até o último frasco envasado. Após esta etapa os frascos serão congelados a -70 °C por 24 h e então serão submetidos à liofilização. Os frascos de vidro serão fechados sob vácuo, com uma tampa de borracha, e armazenados a -20 °C até a análise.

A rotulagem dos frascos será realizada de forma que fique registrado o nome da cepa, o número de acesso, a ordem de envase e a data do ensaio. No total, 200 frascos (rotulados de 01-200), cada um contendo 5 alíquotas de 0,1 mL, serão produzidos.

## **PROCEDIMENTOS**

### *VOLUME MÍNIMO DE AMOSTRA*

Uma alíquota de 0,1 mL.

### *CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS*

O plaqueamento e a contagem de colônias serão realizados em YMA. O MRC será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril. A partir disso, pelo método de *Spread plate*, 5 alíquotas de 100 µL serão distribuídos em 5 placas de YMA. As placas serão incubadas a  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  durante 36 a 48 h. Após a incubação, as colônias em placas individuais serão contadas.

### *ESTUDO DE HOMOGENEIDADE*

Os frascos para o estudo homogeneidade serão avaliados a partir do estoque a -20 °C. Os frascos serão mantidos à temperatura ambiente durante 30 min antes de cada análise. Após esse tempo, o líofilo será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril e homogeneizado vigorosamente, deixando em repouso por mais 30 min à temperatura ambiente. Como serão produzidos 200 frascos, o número total de frascos a serem utilizados no estudo de homogeneidade será de 10 frascos. A homogeneidade do lote será medida através da determinação dos valores de UFC por alíquota do frasco, usando contagem de colônias em YMA.



### *AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE HOMOGENEIDADE*

A avaliação da homogeneidade será realizada através da aplicação do teste estatístico recomendado pelo ABNT ISO Guia 35, análise da variância (ANOVA) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel. A partir dos dados gerados na análise da variância, será calculada a incerteza relativa à homogeneidade, que será inserida ao final do estudo no processo de certificação do material de referência.

### *ESTUDO DE ESTABILIDADE*

Para o estudo da estabilidade em curto prazo serão utilizados 63 frascos de cada lote, divididos em três grupos de 21. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, será utilizado o método do *isochronous design*. A cada dia, três frascos de cada grupo serão acondicionados em embalagem própria para transporte de material biológico. Os frascos serão identificados pelo número de dias de incubação, iniciando-se com a incubação de sete dias. O primeiro grupo será incubado a 4 °C, um a 25 °C e o outro grupo a 35 °C. Sete dias após a primeira incubação, os frascos serão analisados juntos, sob as mesmas condições de análise utilizando o meio de cultura YMA.

O controle da estabilidade em longo prazo será realizado semanalmente no primeiro mês, a partir da data da produção do MR. A partir do segundo mês até o terceiro, a frequência do estudo passará a ser quinzenal e a partir do quarto mês, mensal, até completar um ano. A cada teste serão selecionadas aleatoriamente três unidades do lote preparado. Os frascos serão quantificados através das metodologias descritas no estudo da homogeneidade.

### *AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE*

A avaliação estatística dos resultados será realizada, conforme recomendado pela ABNT ISO Guia 35, através da análise de regressão linear, a fim de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo.

### *CARACTERIZAÇÃO DO LOTE*

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, será realizado procedimento de contagem das colônias dos materiais. Três diferentes analistas participarão dessa etapa, cada um realizará o teste em triplicata. Além disso, para confirmação da identidade dos micro-organismos, serão aplicados métodos fenotípicos e genotípicos.

#### *Caracterização Fenotípica*

A autenticação fenotípica de *C. neoformans* e *C. gattii* será realizada com base nos resultados das observações das características morfológicas coloniais e celulares e de características fisiológicas e bioquímicas, tais como, a síntese de melanina, assimilação de compostos de carbono e nitrogênio e teste de CGB (BARNETT *et al.*, 2000, FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011).

Após a seleção das cepas, serão feitos repiques dos fungos em placas contendo ágar Niger com cloranfenicol, a fim de verificar a pureza das cepas. Este meio de cultura estimula a produção de melanina em cepas de *Cryptococcus* spp. que são caracterizadas pelo desenvolvimento de colônias de cor marrom.

Ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), que é o meio específico para diferenciar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. gattii* é naturalmente resistente à L-canavanina, metabolizando-a em produtos não tóxicos, sendo então capaz de crescer no meio de CGB, onde a glicina é utilizada como única fonte de carbono e nitrogênio, produzindo amônia, elevando o pH e alterando a cor do indicador, azul de bromotimol, para azul-cobalto ou azul-esverdeado forte. Originalmente, o pH do meio é 5,8 e sua cor, amarelo-esverdeado. Entretanto, a grande maioria das cepas de *C. neoformans* são inibidas pela L-canavanina e não crescem e nem utilizam a glicina no meio de CGB, portanto, não alteram o pH, mantendo a cor original do meio (KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

A avaliação fisiológica das cepas será realizada utilizando o Método Automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França) no qual será utilizado o cartão YST para identificação de leveduras (BIOMÉRIEUX, 2009).

#### *Caracterização Molecular*

##### *Sequenciamento da região ITS*

Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') foram utilizados na amplificação do fragmento de rDNA que inclui ITS1, o gene 5.8 S e ITS2, através da reação de cadeia da polimerase.

Cada reação totalizou 50 µL e era composta por 100 ng de DNA (10 ng/mL), tampão 1 x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 U de Taq Polymerase e água para completar o volume da reação. As reações foram realizadas sob as seguintes condições térmicas: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 60 seg, 55 °C por 60 seg, 72 °C por 60 seg, finalizando com 72 °C por 5 min (BRITO-SANTOS *et al.*, 2017).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4 % em tampão tris borato EDTA (TBE) 1 x a 90 volts, adicionado de brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado “1Kb Plus DNA Ladder”.

Os produtos amplificados foram purificados, utilizando Polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20 %. Em um microtubo, foram adicionados 45 µL de PEG e a mesma quantidade do amplicon. O microtubo foi levado à agitação e incubado a 37 °C por 15 min. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 15 min a 7.322 x g em temperatura ambiente. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e 125 µL de etanol a 80 % gelado foram adicionados. O microtubo foi levado à centrifugação por dois min a 5.490 x g. Após isto, o sobrenadante de etanol foi descartado e o microtubo foi colocado com a tampa aberta num termobloco a 60 °C até remover os resíduos de etanol. Posteriormente, 45 µL de água MilliQ foram adicionados ao microtubo, este foi agitado por 10 seg e armazenado a -20 °C (BRITO-SANTOS *et al.*, 2017).

Após a purificação, os amplicons foram sequenciados utilizando a Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz.

#### *Análise de RFLP-URA5*

Essa técnica será utilizada para diferenciação dos oito tipos moleculares do complexo *C. neoformans/C. gattii*. O produto de PCR amplificado do gene *URA5* será digerido com as enzimas HhaI e Sau96I e os perfis de RFLP irão diferenciar os oito tipos moleculares. Será utilizado o protocolo para amplificação do gene *URA5* conforme descrito por Meyer *et al.* (2003), utilizando os iniciadores *URA5* (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G 3') e *SJ101* (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3'). Os produtos da amplificação da PCR serão visualizados em gel de agarose a 1,4 % com TBE 1 x para confirmar a especificidade da amplificação. Um mix será preparado utilizando 3 µL de tampão NEB 10 x, 0,3 µL de BSA, 0,3 µL da enzima HhaI e 0,6 µL da enzima Sau96I. Em um microtubo de 1,5 mL, serão adicionados 25,8 µL do produto de PCR da amplificação do gene *URA5* e 4,2 µL do mix. A mistura será centrifugada, a fim de obter os componentes no

fundo do tubo. Os tubos serão incubados a 37 °C por um período entre 2 a 3 h. Após esse tempo, os produtos de RFLP serão estocados a 4 °C. Para observação da presença de bandas, será realizada uma corrida em gel de agarose com os produtos do RFLP (MEYER *et al.*, 2003).

### *PCR-fingerprinting*

O PCR-fingerprinting utiliza como iniciador específico o minissatélite M13 (obtidos da sequência central do fago M13) para amplificar polimorfismos hipervariáveis e será aplicado em todas as cepas estudadas. O iniciador M13 apresenta a seguinte sequência: 5' GAG GGTGGC GGTCT 3'. As amplificações foram realizadas para um volume final igual a 50 µL contendo 25 ng de DNA genômico, 10mM de tampão de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de acetato de magnésio, 30 ng do iniciador M13, 2,5 U de Taq DNA polimerase platinum e água purificada estéril para completar o volume da reação. A reação de amplificação foi realizada sob as seguintes condições: 35 ciclos com 20 seg de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento a 50 °C, 20 seg de extensão a 72 °C, seguido por um ciclo de extensão final de 6 min a 72 °C. O produto de PCR foi levado a centrifugação no SpeedVac para concentrar a reação e, após isso, aproximadamente 10 µL dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1.4% em 1X tampão Tris-borato-EDTA (TBE) e separados por eletroforese a 70 V por aproximadamente 5 h. A visualização foi feita sob luz UV e todas as bandas visíveis foram incluídas na análise, independentemente de suas intensidades (MEYER; MITCHELL, 1995, MEYER *et al.*, 1999, MEYER; MASZEWSKA; SORRELL, 2001).

### MONITORAMENTO DO LOTE

O monitoramento do lote será realizado quinzenalmente nos dois primeiros meses, a partir da data de produção do MRC. A partir do terceiro mês, o lote passará a ser monitorado mensalmente até completar um ano. Para realizar os testes, três unidades do lote preparado serão selecionadas aleatoriamente. Os frascos serão quantificados através das metodologias descritas no estudo da homogeneidade.

Para avaliar estatisticamente os resultados, a análise de regressão linear será aplicada, com o objetivo de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo, influenciando na estabilidade do material.

## REFERÊNCIAS

ABNT. **ISO GUIA 30**: termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro, 2000.

ABNT. **ISO GUIA 34**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2012a.

ABNT. **ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012b.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000

BRITO-SANTOS, F. *et al.* *Tinea capitis* by *Microsporum audouinii*: Case reports and review of published global literature 2000-2016. **Mycopathologia**, v. 182, p. 1053-60, 2017.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. In: AMERICAN Society for Microbiology Press. Washington, DC, 1998.

FONSECA, A.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. *Cryptococcus* Vuillemin, In: KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**: a taxonomic study. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1661-1740, 2011.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation, of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, p. 535-537, 1982.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 9, p. 1648-1654, 1995.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MEYER, W.; MASZEWSKA, K.; SORRELL, T.C. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 185-193, 2001.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 189-195, 2003.

MONTEIRO, M. A. **Produção de Material de Referência Certificado de Oxitetraciclina em Leite**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo CRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

PHILIPP, W.J. *et al.* Development of reference materials for microbiological analysis. **Accredit. Qual. Assur.**, v. 12, p.134-138, 2007.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **J. Bact.**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

**APÊNDICE B** - Planejamento da produção de lote piloto de Materiais de Referência Certificados (*Candida albicans* CFRVS MRC 40006 e *Saccharomyces cerevisiae* CFRVS MRC 40001)

## INTRODUÇÃO

De acordo com o ABNT ISO Guia 30, “Material de Referência (MR) é um material, suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição. Material de Referência Certificado (MRC) é um material de referência, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica” (ABNT, 2011).

Para os laboratórios atingirem resultados de medições com rastreabilidade metrológica assegurada e qualidade, é necessária a utilização de elementos de referência na calibração e validação dos métodos de medição. A rastreabilidade metrológica é um aspecto fundamental para a comparabilidade de resultados analíticos (MOURA; COSTA, 2010), sendo assim os controles de qualidade dos laboratórios necessitam de MRC. Porém esses materiais estão disponíveis apenas para técnicas analíticas mais rotineiramente empregadas e para um número pequeno de matrizes (CHUI, 2005, ALVES; MORAES, 2003).

O interesse no estabelecimento de materiais de referência tem se mostrado crescente, já que a exigência por esses materiais vem aumentando em áreas bem diversificadas. Na área microbiológica, o desafio na produção de MRCs é a instabilidade natural dos micro-organismos, que dificulta o desenvolvimento, a produção e o uso desses materiais (PHILIPP *et al.*, 2007).

A produção e certificação de um MRC são atividades bem complexas, compreendem etapas trabalhosas e envolvem uma série de estudos que garantem o uso e a finalidade para os quais foram estabelecidos, sendo um longo processo de pesquisa e desenvolvimento, o qual deve atender a rígidas normas impostas por organismos internacionais (CARDOSO, 2010).

*Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* são fungos citados em diversas farmacopeias e compêndios oficiais para controle de qualidade de meios de cultura e potência microbiológica de antibióticos, respectivamente, e, portanto, largamente utilizados nestes ensaios de controle de qualidade (USP, 2013, THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2011, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2005).

Possuir estas cepas como MRCs, disponíveis nacionalmente para estas atividades, aumenta a independência do uso de cepas importadas, já que a exigência está cada vez maior por parte dos organismos competentes.

## **ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO**

Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

Instituto Nacional de Controle em Saúde – INCQS

Departamento de Microbiologia (DM)

Laboratório de Micro-organismos de Referência (LMR)

Setor de Fungos (SF)

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21.040-900

## **FINANCIAMENTO**

A produção dos materiais *Candida albicans* CFRVS MRC 40006 e *Saccharomyces cerevisiae* CFRVS MRC 40001 será realizada com recursos do INCQS.

## **OBJETIVOS**

Produzir *C. albicans* e *S. cerevisiae* como MRC para utilização em laboratórios de controle de qualidade em produtos;

Contribuir para o avanço do processo de produção de MRC na área microbiológica;

Diminuir a dependência brasileira por cepas disponíveis em coleções internacionais, reduzindo, assim, o alto custo que esse processo apresenta.

## **PARTICIPANTES**

Os MRC serão desenvolvidos e processados pelo Setor de Fungos, assim como as análises de homogeneidade, estabilidade e caracterização.

## **PROCESSAMENTO**

Para o MR discutido aqui o valor-alvo foi fixado em não mais que 100 UFC por alíquota de 100 µL.



Será procedido cultivo da levedura a partir de um estoque criopreservado. A partir deste cultivo será preparada uma suspensão em agente criopreservador adequado que consiste de uma matriz de proteína, que permite a manutenção da viabilidade das células das leveduras após os procedimentos de preservação.

Serão distribuídas alíquotas de 0,5 mL da suspensão final em frascos estéreis e a sequência de distribuição será monitorada do primeiro até o último frasco envasado. Após esta etapa os frascos serão congelados a -70 °C por 24 h e então serão submetidos à liofilização. Os frascos de vidro serão fechados sob vácuo, com uma tampa de borracha, e armazenados a -20 °C até a análise.

A rotulagem dos frascos será realizada de forma que fique registrado o nome da cepa, o número de acesso, a ordem de envase e a data do ensaio. No total, 200 frascos (rotulados de 01-200), cada um contendo cinco alíquotas de 0,1 mL, serão produzidos.

## **PROCEDIMENTOS**

### *VOLUME MÍNIMO DE AMOSTRA*

Uma alíquota de 0,1 mL.

### *CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS*

Plaqueamento e contagem de colônias serão realizados em YMA. O MRC será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril. A partir disso, pelo método de *Spread plate*, 5 alíquotas de 100 µL serão distribuídos em 5 placas de YMA. As placas serão incubadas a  $(25 \pm 2)$  °C durante 36 a 48 h. Após a incubação, as colônias em placas individuais serão contadas.

### *ESTUDO DE HOMOGENEIDADE*

Os frascos para o estudo da homogeneidade serão avaliados a partir do estoque a -20 °C. Os frascos serão mantidos à temperatura ambiente durante 30 min antes de cada análise. Após esse tempo, o líofilo será reidratado com 0,6 mL de água purificada estéril e homogeneizado vigorosamente, deixando em repouso por mais 30 min à temperatura ambiente. Como serão produzidos 200 frascos, o número total de frascos a serem utilizados no estudo de homogeneidade será de 10 frascos. A homogeneidade do lote será medida através da determinação dos valores de UFC por alíquota do frasco, usando contagem de colônias em YMA.

### *AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE HOMOGENEIDADE*

A avaliação da homogeneidade será realizada através da aplicação do teste estatístico recomendado pelo ABNT ISO Guia 35, análise da variância (ANOVA) de fator único, utilizando o programa Microsoft Excel. A partir dos dados gerados na análise da variância, será calculada a incerteza relativa à homogeneidade, que será inserida ao final do estudo no processo de certificação do material de referência.

### *ESTUDO DE ESTABILIDADE*

Para o estudo da estabilidade em curto prazo serão utilizados 63 frascos de cada lote, divididos em três grupos de 21. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, será utilizada a metodologia do *isochronous design*. A cada dia, três frascos de cada grupo serão acondicionados em embalagem própria para transporte de material biológico. Os frascos serão identificados pelo número de dias de incubação, iniciando-se com a incubação de sete dias. O primeiro grupo será incubado a 4 °C, um a 25 °C e o outro grupo a 35 °C. Sete dias após a primeira incubação, os frascos serão analisados juntos, sob as mesmas condições de análise utilizando o meio de cultura YMA.

O controle da estabilidade em longo prazo será realizado semanalmente no primeiro mês, a partir da data da produção do MR. A partir do segundo mês até o terceiro, a frequência do estudo passará a ser quinzenal e a partir do quarto mês, mensal, até completar um ano. A cada teste serão selecionadas aleatoriamente três unidades do lote preparado. Os frascos serão quantificados através das metodologias descritas no estudo da homogeneidade.

### *AVALIAÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE*

A avaliação estatística dos resultados será realizada, conforme recomendado pelo ABNT ISO Guia 35, através da análise de regressão linear, a fim de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo.

### *CARACTERIZAÇÃO DO LOTE*

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, será realizado procedimento de contagem das colônias dos materiais. Três diferentes analistas participarão dessa etapa, cada um realizará o teste em triplicata. Além disso, para confirmação da identidade dos micro-organismos, serão aplicados métodos fenotípicos e genotípicos.

#### *Caracterização Fenotípica*

A autenticação fenotípica de *C. albicans* e *S. cerevisiae* será realizada com base nos resultados das observações das características morfológicas coloniais e celulares e de características fisiológicas e bioquímicas (LACHANCE *et al.*, 2011, VAUGHAN-MARTINI; MARTINI, 2011).

Após a seleção das cepas, serão feitos repiques dos fungos em placas contendo YMA, a fim de verificar a pureza das cepas.

A avaliação fisiológica das cepas será realizada utilizando o Método Automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França) no qual será utilizado o cartão YST para identificação de leveduras (BIOMÉRIEUX, 2009).

#### *Caracterização Molecular*

##### *Sequenciamento da região ITS*

Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') foram utilizados na amplificação do fragmento de rDNA que inclui ITS1, o gene 5.8 S e ITS2, através da reação de cadeia da polimerase. Cada reação totalizou 50 µL e era composta por 100 ng de DNA (10 ng/mL), tampão 1 x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 U de Taq Polymerase e água para completar o volume da reação. As reações foram realizadas sob as seguintes condições térmicas: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 60 seg, 55 °C por 60 seg, 72 °C por 60 seg, finalizando com 72 °C por 5 min (BRITO-SANTOS *et al.*, 2017).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4 % em tampão tris borato EDTA (TBE) 1 x a 90 volts, adicionado de brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de tamanho de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado "1Kb Plus DNA Ladder".

Os produtos amplificados foram purificados, utilizando Polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20 %. Em um microtubo, foram adicionados 45 µL de PEG e a mesma quantidade do

amplicon. O microtubo foi levado à agitação e incubado a 37 °C por 15 min. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 15 min a 7.322 x g em temperatura ambiente. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e 125 µL de etanol a 80 % gelado foram adicionados. O microtubo foi levado à centrifugação por dois min a 5.490 x g. Após isto, o sobrenadante de etanol foi descartado e o microtubo foi colocado com a tampa aberta num termobloco a 60 °C até remover os resíduos de etanol. Posteriormente, 45 µL de água MilliQ foram adicionados ao microtubo, este foi agitado por 10 seg e armazenado a -20 °C (BRITO-SANTOS *et al.*, 2017).

Após a purificação, os amplicons foram sequenciados utilizando a Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz.

## MONITORAMENTO DO LOTE

O monitoramento do lote será realizado semanalmente no primeiro mês, a partir da data de produção do MRC. A partir do segundo mês até o quarto, o lote passará a ser monitorado quinzenalmente e a partir do quinto mês, mensalmente, até completar um ano. Para realizar os testes, três unidades do lote preparado serão selecionadas aleatoriamente. Os frascos serão quantificados através das metodologias descritas no estudo da homogeneidade.

Para avaliar estatisticamente os resultados, a análise de regressão linear será aplicada, com o objetivo de observar se a regressão dos valores obtidos no estudo apresenta alguma tendência ao longo do tempo, influenciando na estabilidade do material.

## REFERÊNCIAS

ABNT. **ISO GUIA 30**: termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro, 2000.

ABNT. **ISO GUIA 34**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2012a.

ABNT. **ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012b.

ALVES, N.P.; MORAES, D.N. Metrologia Química e a Utilização de Materiais de Referência em Medições Químicas. **Analytica**, v. 54, n. 3, 2003.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000

BRITO-SANTOS, F. *et al.* *Tinea capitis* by *Microsporium audouinii*: Case reports and review of published global literature 2000-2016. **Mycopathologia**, v. 182, p. 1053-1060, 2017.

CARDOSO, M.H.W.M. *et al.* Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da estabilidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 2, p. 439-446, 2010.

CHUI, Q. S. H.; IAMASHITA, C. O.; BISPO, J. M. A. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.

LACHANCE, M. *et al.* *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**: a taxonomic study. 5. ed. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publishers, 2011, p. 987-1278.

MEYER, W.; MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 9, p. 1648-1654, 1995.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.

MEYER, W.; MASZEWSKA, K.; SORRELL, T.C. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 185-193, 2001.

MONTEIRO, M. A. **Produção de material de referência certificado de oxitetraciclina em leite**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo CRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

MOURA, S. S; COSTA, S. R. R. Estudo de caso sobre o uso de materiais de referência por laboratórios de análises de água, sob a ótica da ABNT NBR ISO IEC 17025. Disponível em: [http://www.aedb.br/seget/artigos07/1323\\_1323\\_SUZANA%20MOURA%20SEGET%202007.pdf](http://www.aedb.br/seget/artigos07/1323_1323_SUZANA%20MOURA%20SEGET%202007.pdf). Acesso em: 18 jul. 2013.

PHILIPP, W.J. *et al.* Development of reference materials for microbiological analysis. **Accredit. Qual. Assur.**, v. 12, p.134-138, 2007.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

THE UNITED States Pharmacopoeia. 36. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2013.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In. KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**: a taxonomic study. 5. ed. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publishers, p. 733-746, 2011.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **J. Bact.**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.











### APÊNDICE C (continuação) – Resultados da avaliação dos aspectos microscópicos e macroscópicos das diferentes espécies fúngicas

<i>Cryptococcus</i> spp.							
Parâmetros		<i>C. neoformans</i> CFRVS 70297	<i>C. gattii</i> CFRVS 70298	<i>C. gattii</i> CFRVS 70299	<i>C. gattii</i> CFRVS 70300	<i>C. neoformans</i> CFRVS 70301	<i>C. gattii</i> CFRVS 70302
Aspectos macroscópicos	Cor	creme	creme	creme	creme	creme	creme
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
	Brilho	presente	presente	presente	presente	presente	presente
	Textura	cremosa	mucóide	mucóide	mucóide	cremosa	mucóide
	Margem	regular	regular	regular	regular	regular	regular
	Elevação	leve depressão no centro	colônia plana	colônia plana	arredondada	leve depressão no centro	colônia plana
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente	presente	presente
	Forma celular	globosa	globosa	globosa	globosa	globosa	globosa
	Agrupamento	simples	simples	simples	simples	simples	simples
	Dimensões	4,08x4,27µm / 3,49x3,89µm / 4,44x4,69µm	3,51x3,59µm / 3,59x3,99µm	2,51x3,06µm / 2,86x3,19µm	3,51x3,55µm / 3,87x4,08µm / 3,44x4,02µm	3,51x3,59µm / 3,59x3,99µm / 3,85x3,98µm	3,51x3,59µm / 3,59x3,99µm / 3,44x3,69µm
Crescimento em caldo	Anel	25°C	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo	positivo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
	Anel	36°C	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

### APÊNDICE C (continuação) – Resultados da avaliação dos aspectos microscópicos e macroscópicos das diferentes espécies fúngicas

<i>Candida</i> spp.							
Parâmetros		<i>C. albicans</i> CFRVS 40006	<i>C. albicans</i> CFRVS 40040	<i>C. albicans</i> CFRVS 40041	<i>C. albicans</i> CFRVS 40070	<i>C. albicans</i> CFRVS 40071	<i>C. albicans</i> CFRVS 40119
Aspectos macroscópicos	Cor	creme	creme	creme	creme	creme	creme
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
	Brilho	presente	presente	presente	presente	presente	presente
	Textura	cremosa	mucóide	mucóide	cremosa	cremosa	cremosa
	Margem	regular	regular	regular	regular	regular	regular
	Elevação	pequena elevação ao centro	plana	plana	elevada	elevada	arredondada
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente	presente	presente
	Forma celular	globosa	globosa	globosa	globosa	globosa	globosa
	Agrupamento	simples, em par e em grupos	alguns em par, maioria em pequenos grupos	simples, alguns em pequenos grupos	em grupos	em grupos	simples, em par e em grupos
	Dimensões	3,97x4,38µm / 3,41x3,83µm / 4,01x4,27µm	3,59x4,15µm / 2,8x3,3µm / 3,57x3,89µm	3,97x4,08µm / 3,93x4,26µm / 4,17x4,39µm	4,27x4,27µm / 4,26x4,52µm / 3,73x3,76µm	3,51x3,59µm / 3,55x3,76µm / 3,27x3,79µm	3,8x4,02µm / 4,27x4,52µm / 3,73x3,73µm
	Observação	presença de pseudohifas	presença de pseudohifas	-	presença de pseudohifas	presença de pseudohifas	-
Crescimento em caldo	Anel	25°C	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
	Anel	36°C	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

**APÊNDICE C (continuação) – Resultados da avaliação dos aspectos microscópicos e macroscópicos das diferentes espécies fúngicas**

		<i>Candida</i> spp.					
Parâmetros		<i>C. albicans</i> CFRVS 40120	<i>C. dubliniensis</i> CFRVS 40172	<i>C. albicans</i> CFRVS 40175	<i>C. albicans</i> CFRVS 40176	<i>C. albicans</i> CFRVS 40177	<i>C. albicans</i> CFRVS 40178
Aspectos macroscópicos	Cor	creme	creme	creme	creme	creme	creme
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
	Brilho	presente	presente	presente	presente	presente	presente
	Textura	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa
	Margem	regular	regular	regular	regular	regular	regular
	Elevação	pequena elevação ao centro	arredondada	pequena elevação ao centro	arredondada	pequena elevação ao centro	pequena elevação ao centro
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente	presente	presente
	Forma celular	globosa	globosa e elipsoidal	globosa	globosa	globosa	globosa
	Agrupamento	simples, em par e em grupos	em par e em grupos	simples, em par e em grupos	simples, em par e em grupos	simples, em par e em grupos	simples, em par e em grupos
	Dimensões	3,48x4,17µm / 3,83x4,27µm / 3,59x4,05µm	4,29x4,94µm / 4,63x5,29µm / 3,37x3,41µm	3,41x3,57µm / 3,97x4,04µm / 3,77x3,77µm	3,17x3,57µm / 2,7x3,57µm / 3,27x3,76µm	3,76x4,39µm / 3,73x4,05µm / 2,93x3,52µm	4,04x4,47µm / 3,01x3,3µm / 3,34x4,27µm
	Observação	presença de pseudohifas	-	-	-	presença de pseudohifas	-
Crescimento em caldo	Anel	25°C	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
	Anel	36°C	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo	positivo



**APÊNDICE C (continuação) – Resultados da avaliação dos aspectos microscópicos e macroscópicos das diferentes espécies fúngicas**

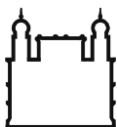
<i>Saccharomyces spp.</i>						
Parâmetros		<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40001	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40002	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40003	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40083	<i>S. uvarum</i> CFRVS 40088
Aspectos macroscópicos	Cor	creme	creme	creme	creme	branca
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
	Brilho	presente	presente	presente	presente	presente
	Textura	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa
	Margem	regular	regular	regular	regular	regular
	Elevação	depressão no centro	leve depressão no centro	leve depressão no centro	depressão no centro	leve depressão no centro
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente	presente
	Forma celular	globosa	globosa e alongada	globosa	globosa e alongada	globosa
	Agrupamento	maioria simples, alguns em par	maioria simples, presença de pequenos grupos	simples, maioria em grupo	maioria simples, presença de pequenos grupos	simples
	Dimensões	4,52x4,82µm / 3,21x4,08µm / 4,6x5,5µm	5,43x6,85µm / 4,52x9,31µm / 4,52x5,52µm	4,02x5,27µm / 3,27x4,52µm / 3,73x5,15µm	5,02x6,28µm / 4,73x5,87µm / 3,49x8,1µm	4,44x4,58µm / 4,58x6,29µm / 5,04x5,77µm
Crescimento em caldo	Anel	25°C	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo
	Anel	36°C	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo

**APÊNDICE C (continuação) – Resultados da avaliação dos aspectos microscópicos e macroscópicos das diferentes espécies fúngicas**

<i>Saccharomyces spp.</i>						
Parâmetros		<i>S. pastorianus</i> CFRVS 40090	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS 40125	<i>S. bayanus</i> CFRVS 40235	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001 (frasco 125)	<i>S. cerevisiae</i> CFRVS MRC 40001 (frasco 170)
Aspectos macroscópicos	Cor	branca	creme	branca	creme	creme
	Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
	Brilho	presente	presente	presente	presente	presente
	Textura	cremosa	cremosa	mucóide	cremosa	cremosa
	Margem	regular	regular	regular	regular	regular
	Elevação	leve depressão no centro	leve depressão no centro	leve depressão no centro	depressão no centro	depressão no centro
Aspectos microscópicos	Brotamento	presente	presente	presente	presente	presente
	Forma celular	globosa e cilíndrica	globosa	globosa	globosa	globosa
	Agrupamento	simples e em grupo	simples, em par e em grupo	simples e em par	maioria simples, alguns em par e grupo	maioria simples e em par
	Dimensões	4,05x5,05µm / 4,29x5,32µm / 4,52x8,41µm	3,65x3,27µm / 4,69x4,84µm / 3,89x4,52µm	3,27x4,27µm / 4,52x5,52µm / 3,76x5,27µm	4,29x5,27µm / 3,93x4,49µm / 3,92x4,11µm	4,39x5,5µm / 4,08x5,02µm / 3,26x3,97µm
Crescimento em caldo	Anel	25°C	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo
	Anel	36°C	negativo	negativo	negativo	negativo
	Película		negativo	negativo	negativo	negativo
	Sedimento		positivo	positivo	positivo	positivo



**APÊNDICE D – Certificados de Análise dos quatro Materiais de Referência  
Certificados estabelecidos no presente trabalho.**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**CERTIFICADO DE ANÁLISE**  
**MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**  
**INCQS**

**Nº do lote:** MRC021540323

**DADOS DO MATERIAL**

Micro-organismo: *Cryptococcus neoformans*  
Nº de catálogo: CFRVS MRC 40323  
Data da produção: Fevereiro/2015  
Validade: Janeiro/2016, quando armazenado adequadamente  
Apresentação do material: frasco contendo material liofilizado  
Condições de armazenamento: Manter em temperatura igual ou inferior a -20 °C

**Dados de Quantificação**

contagem de UFC para alíquota de 100 µL

<u>Valor de propriedade (UFC)</u>	<u>Incerteza</u>
33	13

Curador da Coleção Fiocruz/CFRVS

Vice-Diretor da Gestão da Qualidade do INCQS

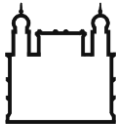
Assinatura:

Assinatura:

Este Certificado de Análise e o MRC que o acompanha atendem aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17034 [1] e as orientações do guia ABNT ISO Guia 31 [2], da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 [3] e da NIT-DICLA-061 [4].

Este Certificado é válido por 1 ano após a compra e apenas para o material nele descrito, não sendo extensivo a quaisquer outros.

Para informações adicionais, favor entrar em contato com o produtor.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



## **Descrição do material**

Cada frasco contém 0,5 mL de material liofilizado preparado a partir da cepa *C. neoformans* depositada na coleção CFRVS/Fiocruz sob número CFRVS 40323.

Para o preparo do material, as células fúngicas foram concentradas e ressuspensas em leite desnatado estéril. A suspensão foi homogeneizada, distribuída em frascos, liofilizada e armazenada em ultrafreezer a -80 °C.

## **Métodos utilizados na Caracterização do MRC**

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, foi realizado procedimento de contagem de UFC de cada uma das cinco alíquotas de 100µL em ágar Extrato de Malte e Levedura (YMA), em que participaram três diferentes analistas do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

Os testes referentes à caracterização qualitativa do MRC ocorreram no Setor de Fungos do Laboratório de Micro-organismos de Referência do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

### **Caracterização fenotípica:**

Foi realizada com base nos resultados das observações das características fisiológicas, tais como a síntese de melanina, utilizando meio ágar Semente de Niger, e teste de CGB [5].

Observação: O método automatizado Vitek2 não deve ser aplicado com a finalidade de diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii*.

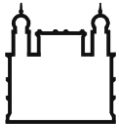
### **Caracterização genotípica:**

Foi realizada por meio da utilização da técnica molecular RFLP-URA5, de acordo com o descrito por Meyer *et al.* [6].

## **Uso pretendido**

Este MRC é indicado para os seguintes propósitos:

- Controle da qualidade dos meios de cultura ágar Semente de Niger e CGB utilizados no diagnóstico da criptococose realizado pela Rede de Laboratórios de Referência Nacional em Micose Sistêmica (LRNMS);
- Garantia da qualidade de ensaios relacionados à caracterização de *C. neoformans*.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



## Instruções para uso

Antes de utilizar o material, retirar o frasco da temperatura de armazenamento e mantê-lo a aproximadamente  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 30 min. Após esse período, hidratar o líofilo com aproximadamente 0,6 mL de água purificada, homogeneizar suavemente e deixar em repouso por 30 min a aproximadamente  $(25 \pm 2)$  °C. Após esse tempo, a suspensão deve ser homogeneizada em agitador de tubos e alíquotas de 0,1 mL devem ser inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura recomendado, ágar Extrato de Malte e Levedura, o inóculo deve ser espalhado por toda superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. A temperatura de incubação e o tempo recomendados são  $(25 \pm 2)$  °C por 36 a 48 h.

## Informações Sobre Segurança

A levedura presente no material é classificada como classe de risco biológico II, apresentando risco individual moderado. Esse material deve ser utilizado apenas para a finalidade descrita. Após o término da validade, o material deve ser descartado adequadamente.

## Rastreabilidade Metrológica

O valor certificado possui rastreabilidade metrológica garantida pelo uso de equipamentos e instrumentos de medição calibrados durante a análise qualitativa e quantitativa.

## Referências

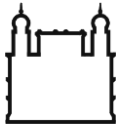
[1] ABNT. **ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2017.

[2] ABNT. **NBR ISO GUIA 31**: materiais de referência - conteúdo de certificados e rótulos. Rio de Janeiro, 2017.

[3] ABNT. **NBR/ISO GUIA NBR/ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

[4] INMETRO. **NIT-DICLA-61**: requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de material de referência dos centros de recursos biológicos. Rio de Janeiro, 2012.

[5] FONSECA, A.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. *Cryptococcus Vuillemin*. In: KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Amsterdam: Ed. Elsevier Science



Ministério da Saúde

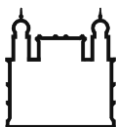
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

Publishers, 2011. p. 1661-1740.



[6] MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**CERTIFICADO DE ANÁLISE**  
**MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**  
**INCQS**

**Nº do lote:** MRC041540324

**DADOS DO MATERIAL**

Micro-organismo: *Cryptococcus gattii*  
Nº de catálogo: CFRVS MRC 40324  
Data da produção: Abril/2015  
Validade: Março/2016, quando armazenado adequadamente  
Apresentação do material: frasco contendo material liofilizado  
Condições de armazenamento: Manter em temperatura igual ou inferior a -20 °C

**Dados de Quantificação**

contagem de UFC para alíquota de 100 µL

<u>Valor de propriedade (UFC)</u>	<u>Incerteza</u>
15	9,2

Curador da Coleção Fiocruz/CFRVS

Vice-Diretor da Gestão da Qualidade  
do INCQS

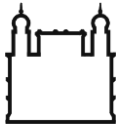
Assinatura:

Assinatura:

Este Certificado de Análise e o MRC que o acompanha atendem aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17034 [1] e as orientações do guia ABNT ISO Guia 31 [2], da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 [3] e da NIT-DICLA-061 [4].

Este Certificado é válido por 1 ano após a compra e apenas para o material nele descrito, não sendo extensivo a quaisquer outros.

Para informações adicionais, favor entrar em contato com o produtor.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



1/4

INCQS 01/2018R01

### **Descrição do material**

Cada frasco contém 0,5 mL de material liofilizado preparado a partir da cepa *C. gattii* depositada na coleção CFRVS/Fiocruz sob número CFRVS 40324.

Para o preparo do material, as células fúngicas foram concentradas e ressuspensas em leite desnatado estéril. A suspensão foi homogeneizada, distribuída em frascos, liofilizada e armazenada ultrafreezer a -80 °C.

### **Métodos utilizados na Caracterização do MRC**

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, foi realizado procedimento de contagem de UFC de cada uma das cinco alíquotas de 100µL em ágar Extrato de Malte e Levedura (YMA), em que participaram três diferentes analistas do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

Os testes referentes à caracterização qualitativa do MRC ocorreram no Setor de Fungos do Laboratório de Micro-organismos de Referência do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

#### **Caracterização fenotípica:**

Foi realizada com base nos resultados das observações das características fisiológicas, tais como a síntese de melanina, utilizando meio ágar Semente de Niger, e teste de CGB [5].

Observação: O método automatizado Vitek2 não deve ser aplicado com a finalidade de diferenciar *C. gattii* de *C. neoformans*.

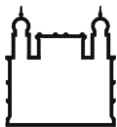
#### **Caracterização genotípica:**

Foi realizada por meio da utilização da técnica molecular RFLP-URA5, de acordo com o descrito por Meyer *et al.* [6].

### **Uso pretendido**

Este MRC é indicado para os seguintes propósitos:

- Controle da qualidade dos meios de cultura ágar Semente de Niger e CGB utilizados no diagnóstico da criptococose realizado pela Rede de Laboratórios de Referência Nacional em Micose Sistêmica (LRNMS);



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



- Garantia da qualidade de ensaios relacionados à caracterização de *C. neoformans*.

INCQS 01/2018R01

2/4

## Instruções para uso

Antes de utilizar o material, retirar o frasco da temperatura de armazenamento e mantê-lo a aproximadamente  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 30 min. Após esse período, hidratar o líofilo com aproximadamente 0,6 mL de água purificada, homogeneizar suavemente e deixar em repouso por 30 min a aproximadamente  $(25 \pm 2)$  °C. Após esse tempo, a suspensão deve ser homogeneizada em agitador de tubos e alíquotas de 0,1 mL devem ser inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura recomendado, Ágar Extrato de Malte e Levedura, o inóculo deve ser espalhado por toda superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. A temperatura de incubação e o tempo recomendados são  $(25 \pm 2)$  °C por 36 a 48 h.

## Informações Sobre Segurança

A levedura presente no material é classificada como classe de risco biológico II, apresentando risco individual moderado. Esse material deve ser utilizado apenas para a finalidade descrita. Após o término da validade, o material deve ser descartado adequadamente.

## Rastreabilidade Metrológica

O valor certificado possui rastreabilidade metrológica garantida pelo uso de equipamentos e instrumentos de medição calibrados durante a análise qualitativa e quantitativa.

## Referências

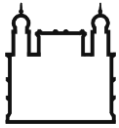
[1] ABNT. **ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referencia. Rio de Janeiro, 2017.

[2] ABNT. **NBR/ISO GUIA 31**: materiais de referência - conteúdo de certificados e rótulos. Rio de Janeiro, 2017.

[3] ABNT. **NBR/ISO GUIA NBR/ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

[4] INMETRO. **NIT-DICLA-61**: requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de material de referência dos centros de recursos biológicos. Rio de Janeiro, 2012.





Ministério da Saúde

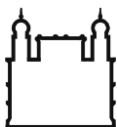
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**

[5] FONSECA, A.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. *Cryptococcus* Vuillemin. In: KURTZMAN C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011. p. 1661-1740.

[6] MEYER, W. *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which INCQS 01/2018R01 epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790-1799, 1999. 3/4



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**CERTIFICADO DE ANÁLISE**  
**MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**  
**INCQS**

INCQS 01/2018R01

4/4

**Nº do lote:** MRC071640006

**DADOS DO MATERIAL**

Micro-organismo: *Candida albicans*  
Nº de catálogo: CFRVS MRC 40006  
Data da produção: Julho/2016  
Validade: Maio/2017, quando armazenado adequadamente  
Apresentação do material: frasco contendo material liofilizado  
Condições de armazenamento: Manter em temperatura igual ou inferior a -20 °C

**Dados de Quantificação**

contagem de UFC para alíquota de 100µL

<u>Valor de propriedade</u> (UFC/ 0,1mL)	<u>Incerteza (UFC/ 0,1mL)</u>
<b>46</b>	<b>25</b>

Curador da Coleção Fiocruz/CFRVS

Vice-Diretor da Gestão da Qualidade  
do INCQS

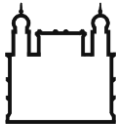
Assinatura:

Assinatura:

Este Certificado de Análise e o MRC que o acompanha atendem aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17034 [1] e as orientações do guia ABNT ISO Guia 31 [2], da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 [3] e da NIT-DICLA-061 [4].

Este Certificado é válido por 1 ano após a compra e apenas para o material nele descrito, não sendo extensivo a quaisquer outros.

Para informações adicionais, favor entrar em contato com o produtor.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



## **Descrição do material**

Cada frasco contém 0,5 mL de material liofilizado preparado a partir da cepa *C. albicans* depositada na coleção CFRVS/Fiocruz sob número CFRVS 40006.

Para o preparo do material, as células fúngicas foram concentradas e ressuspensas em leite desnatado estéril. A suspensão foi homogeneizada, distribuída em frascos, liofilizada e armazenada ultrafreezer a -80 °C.

## **Métodos utilizados na Caracterização do MRC**

Para avaliação do valor de propriedade quantitativo, foi realizado procedimento de contagem de UFC de cada uma das cinco alíquotas de 100µL em ágar Extrato de Malte e Levedura (YMA), em que participaram três diferentes analistas do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

Os testes referentes à caracterização qualitativa do MRC ocorreram no Setor de Fungos do Laboratório de Micro-organismos de Referência do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

### **Caracterização fenotípica:**

Foi realizada com base nos resultados das observações das características morfológicas em meio Chromoagar, que é um meio cromogênico para o isolamento e identificação de *C. albicans*, e por meio do método automatizado VITEK 2, que se baseia na identificação das espécies de leveduras, a partir da ação enzimática do micro-organismo frente a substratos bioquímicos liofilizados presentes em cartão YST, de uso específico do referido equipamento.

### **Caracterização genotípica:**

Foi realizado o Sequenciamento da região ITS, utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') e o protocolo de amplificação descrito por Brito-Santos [5]. Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados utilizando a Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz.

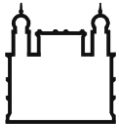
## **Uso pretendido**

Este MRC é indicado para os seguintes propósitos [6-8]:

- Ensaios microbiológicos para produtos estéreis e não estéreis;
- Testes de eficácia antimicrobiana que abrangem o doseamento de Ciclopirox Olamina;

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil  
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

[www.incqs.fiocruz.br](http://www.incqs.fiocruz.br)



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



- Testes de segurança biológica de Ciclopirox olamina solução tópica;
- Avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes de nível intermediário e alto nível.

### **Instruções para uso**

Antes de utilizar o material, retirar o frasco da temperatura de armazenamento e mantê-lo a aproximadamente  $(25 \pm 2)$  °C por cerca de 30 min. Após esse período, hidratar o líofilo com aproximadamente 0,6 mL de água purificada, homogeneizar suavemente e deixar em repouso por 30 min a aproximadamente  $(25 \pm 2)$  °C. Após esse tempo, a suspensão deve ser homogeneizada em agitador de tubos e alíquotas de 0,1 mL devem ser inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura recomendado, ágar Extrato de Malte e Levedura, o inóculo deve ser espalhado por toda superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. A temperatura de incubação e o tempo recomendados são  $(25 \pm 2)$  °C por 36 a 48 h.

### **Informações Sobre Segurança**

A levedura presente no material é classificada como classe de risco biológico II, apresentando risco individual moderado. Esse material deve ser utilizado apenas para a finalidade descrita. Após o término da validade, o material deve ser descartado adequadamente.

### **Rastreabilidade Metrológica**

O valor certificado possui rastreabilidade metrológica garantida pelo uso de equipamentos e instrumentos de medição calibrados durante a análise qualitativa e quantitativa.

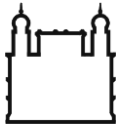
### **Referências**

[1] ABNT. **ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referencia. Rio de Janeiro, 2017.

[2] ABNT. **NBR/ISO GUIA 31**: materiais de referência - conteúdo de certificados e rótulos. Rio de Janeiro, 2017.

[3] ABNT. **NBR/ISO GUIA NBR/ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

[4] INMETRO. **NIT-DICLA-61**: requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de material de referência dos centros de recursos biológicos. Rio de Janeiro, 2012.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**



[5] BRITO-SANTOS, F. *et al.* *Tinea capitis* by *Microsporum audouinii*: case reports and review of published global literature 2000-2016. **Mycopathologia**, v. 182, p. 1053-1060, 2017.

[6] FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

[7] THE UNITED States Pharmacopoeia. 36 ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2013.

[8] BRASIL. Resolução nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 158, p. 44-46, 18 ago. 2010.