

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

Gabriela Rocha Mello de Rezende

**AVALIAÇÃO DA PUREZA, VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO DE DOIS
ACERVOS DEPOSITADOS NA COLEÇÃO DE FUNGOS DE REFERÊNCIA EM
VIGILÂNCIA SANITÁRIA.**

Rio de Janeiro

2020

Gabriela Rocha Mello de Rezende

AVALIAÇÃO DA PUREZA, VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO DE DOIS ACERVOS
DEPOSITADOS NA COLEÇÃO DE FUNGOS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA
SANITÁRIA.

Monografia apresentada ao Programa de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambiente e Serviços do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutor: Dr. Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento

Preceptor: Ma.Talita Coelho de Souza

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Rezende, Gabriela Rocha Mello de

Avaliação da pureza, viabilidade e autenticação de dois acervos depositados na Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária. /Gabriela Rocha Mello de Rezende. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

69 f. : il.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2020.

Tutor: Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento

Preceptor: Talita Coelho de Souza

1. Preservação Biológica. 2. Coleção Biológica. 3. Autenticação. 4. *Cryptococcus*. 5. *Candida*.

Evaluation of purity, viability and authentication of two collections deposited in the Sanitary Surveillance Reference Fungi Collection.

Gabriela Rocha Mello de Rezende

AVALIAÇÃO DA PUREZA, VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO DE DOIS ACERVOS
DEPOSITADOS NA COLEÇÃO DE FUNGOS DE REFERÊNCIA EM VIGILÂNCIA
SANITÁRIA.

Monografia apresentada ao Programa de
Residência Multiprofissional em
Vigilância Sanitária com Ênfase na
Qualidade de Produtos, Ambiente e
Serviços do Instituto Nacional de Controle
de Qualidade em Saúde da Fundação
Oswaldo Cruz como requisito parcial para
obtenção do título de Especialista em
Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Presidente)
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

Dra. Aline da Silva Soares Souto
Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas/ FIOCRUZ

Ma. Cláudia Ribeiro Souto
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

Ma. Mariana Bruno Rodrigues Benitez
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde / FIOCRUZ

Dedico este trabalho a minha avó Suely,
grande apoiadora e incentivadora de
todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de ter passado esses dois últimos anos nessa residência que acrescentou a minha vida de uma forma inimaginável. Em seguida, gostaria de agradecer aos meus pais por todo o apoio e amor incondicional, pela ajuda e por toda a força que me dão independentemente das minhas escolhas. Obrigada a vocês por todo o suporte e por me guiarem sempre nessa vida.

Obrigada a minha avó Suely por ser meu maior exemplo de sabedoria e determinação, por me ajudar quando eu nem tenho ao menos a consciência de que preciso. Obrigada por sempre dizer as palavras certas nas horas certas. Sem você dificilmente eu finalizaria esse ciclo da mesma forma.

Obrigada à toda equipe do Setor de Fungos, Carol, Cláudia, Mariana, Marília e Miguel por me receberem de portas abertas e por fazerem me sentir em casa todos os momentos. Obrigada por toda a ajuda, orientação, pela amizade e por esses dois anos onde eu tenho a plena certeza que eu não poderia ter tido uma sorte maior. Serei eternamente grata a todos vocês.

Aos meus orientadores ao longo da residência, Cátia, Carlos e Talita, obrigada por serem sempre solícitos a todas as minhas dúvidas, por terem me guiado ao longo desses dois anos. Obrigada pelo incentivo e por tudo que vocês puderam me passar. Eu tive muita sorte em ter encontrado vocês.

Também gostaria de agradecer aos meus amigos, todos aqueles que compartilham a vida comigo há mais de dez anos e todos aqueles recém companheiros de residência. Obrigada por serem incentivadores, companheiros, conselheiros, confidentes.

Por fim, gostaria de agradecer aos grandes amigos que a residência consolidou, Aline e Marcus. Obrigada por todos os dias, por todas as conversas, todos os choros e as mil saídas para o Nova América. Obrigada por terem sido minha família diversas vezes durante esse tempo. Sem vocês nada disso teria sido dessa forma. Eu tenho certeza que o maior presente que ganhei desses dois anos foram vocês.

RESUMO

Atualmente, existem 33 Coleções Biológicas institucionalizadas na Fiocruz, sendo uma delas a Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (Fiocruz/CFRVS) localizada no INCQS, que é a primeira Coleção a ser acreditada nos ensaios de viabilidade, pureza e autenticação de leveduras e fungos filamentosos pela Norma ABNT ISO/IEC 17025:2017 no Brasil. A CFRVS é uma Coleção de serviços e desta forma o serviço de depósito é uma maneira de incrementar seu acervo. A CFRVS realiza também serviços de preservação, caracterização e distribuição de cepas. As Coleções Biológicas são responsáveis por manterem um acervo de materiais de forma estável e organizada, podendo fornecer informações sobre a coleta, identificação e a procedência das amostras. Dois importantes acervos foram enviados para depósito na CFRVS, totalizando 202 cepas provenientes de diferentes fontes, sendo necessária a avaliação da viabilidade e pureza, bem como a autenticação das cepas para que o depósito destas possa ser formalizado e incluído na CFRVS. Um dos acervos era constituído de 104 cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* provenientes da Região do Norte do Brasil que estavam preservadas em glicerol 15% a -20°C; o outro acervo era constituído especialmente de cepas históricas preservadas em óleo mineral, totalizando 98 cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. Para todas as cepas foram realizadas etapas de recuperação para verificar a viabilidade e pureza. Para as cepas de *Cryptococcus* spp. a autenticação foi realizada por cultivo em ágar Semente de Níger, e a diferenciação das espécies *C. gattii* e *C. neoformans* pelo crescimento em meio Canavanina Glicina Azul de Bromotimol. Já para as cepas de *Candida* spp. a diferenciação em espécies foi realizada utilizando-se o meio CHROMagar *Candida*. Do total de cepas avaliadas 158 apresentaram crescimento e puderam ser recuperadas, enquanto 44 não apresentaram crescimento. Dentre as cepas viáveis, 73 isolados foram classificados como *Candida* spp. e 85 como *Cryptococcus* spp. As espécies previamente identificadas com o CHROMagar *Candida* foram: *C. albicans* (n=37), *C. tropicalis* (n=20), *C. krusei* (n=11). *C. gattii* (n=52) e *C. neoformans* (n=28) foram autenticadas com o meio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol.

Palavras-chave: Preservação. Coleção Biológica. Autenticação. *Cryptococcus* spp. *Candida* spp.

ABSTRACT

There are currently 33 institutionalized Biological Collections in Fiocruz, one of which is the Sanitary Surveillance Reference Fungi Collection (Fiocruz/CFRVS) located at INCQS, which is the first Collection to be accredited at the essays in viability, purity and authentication of yeast and filamentous fungi by the ABNT ISO/IEC 17025: 2017 in Brazil. CFRVS is a collection of services and that way the deposit service works to increase your collection. CFRVS also conducts strain preservation, characterization and distribution services. Biological Collections are responsible for maintaining a stable and organized collection of materials and can provide information on the collection, identification and origin of samples. Two important collections were sent to CFRVS, in a total of 202 strains from different sources, which required the evaluation of viability and purity, as well as the authentication of strains so that their deposit could be formalized and included in the CFRVS. One of these collections consisted of 104 strains of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from the Northern Region of Brazil that were preserved in glycerol 15% at -20°C; the other collection consisted especially of historical strains preserved in mineral oil, totaling 98 strains of *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. For all strains, recovery steps were performed to verify viability and purity. *Cryptococcus* spp. authentication were performed using Niger Seed Agar cultivation and species *C. gattii* and *C. neoformans* were differentiated by growth in L-canavanine glycine bromothymol blue medium. Species differentiation of *Candida* spp. strains were performed using CHROMagar *Candida*. Of the total, 158 showed growth and could be recovered, whereas 44 did not show any growth. Among the viable strains, 73 isolates were identified as *Candida* spp. and 85 as *Cryptococcus* spp. The following species have been previously identified with CHROMagar *Candida*: *C. albicans* (n=37), *C. tropicalis* (n=20), *C. krusei* (n=11). *C. gattii* (n=52) and *C. neoformans* (n=28) were authenticated with Bromothymol Canavanine-Glycine-Blue medium.

Keywords: Preservation. Biological collection. Authentication. *Cryptococcus* spp. *Candida* spp.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Correlação entre pigmentação das colônias e espécies do gênero <i>Candida</i> em CHROMagar <i>Candida</i>	267
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da etapa de Autenticação das cepas do genero <i>Cryptococcus</i>	26
Figura 2 - Distribuição dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> entre as cepas viáveis	32
Figura 3 - Crescimento cepas de <i>Candida krusei</i> (a) e <i>Candida tropicalis</i> (b) em meio CHROMAGAR <i>Candida</i>	32
Figura 4 - Visualização de tubo germinativo em microscópio óptico com aumento de 400x.	33
Figura 5 - Micrografia do perfil de filamentação característico das espécies <i>Candida tropicalis</i> (a), <i>Candida albicans</i> ou <i>Candida dubliniensis</i> (b), <i>Candida krusei</i> (c) e <i>Candida guilliermondii</i> (d) no teste de microcultivo em lâmina.....	34
Figura 6 - Frequência das espécies de <i>Candida</i> entre 73 cepas caracterizadas no sistema VITEK® 2.....	35
Figura 7 - Resultados da identificação de cepas de <i>Candida</i> spp. com baixa discriminação no sistema VITEK 2.....	36

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASN	Ágar Semente de Níger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCFF	Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CARVS	Coleção de Arqueas de Referência em Vigilância Sanitária
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CFRVS	Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária
CGB	Canavanina Glicina Azul de Bromotimol
CMA	Agar de Farinha de Milho
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung Vong Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
ISSO	<i>International Organization of Standardization</i>
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LCCDM	Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LCCDMA	Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
POP	Procedimento Operacional Padrão
PU	Procedimento de Uso
SNVS	Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
VISA	Vigilância Sanitária
YMA	Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte
YMB	Caldo Extrato de Levedura-Extrato de Malte

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Histórico da Vigilância Sanitária no Brasil	13
1.2	Organização do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária	14
1.3	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	15
1.4	Histórico das Coleções Biológicas no Brasil	16
1.5	Coleção de Fungos de Referência da Vigilância Sanitária (Fiocruz/ CFRVS)	17
1.6	Depósito de Cepas	18
1.7	Infecções Fúngicas	18
1.7.1	<i>Candida</i> spp.	19
1.7.2	<i>Cryptococcus</i> spp.	20
1.8	Justificativa	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	METODOLOGIA	24
3.1	Microrganismos	24
3.2	Viabilidade e Pureza	24
3.3	Autenticação	25
3.3.1	<i>Cryptococcus</i> spp.	25
3.3.2	<i>Candida</i> spp.	26
3.3.2.1	Prova do Tubo Germinativo	27
3.3.2.2	Microcultivo em Lâmina	27
3.3.2.3	VITEK® 2	27
3.4	Preservação	28
3.4.1	Ultracongelamento a -80°C	28
3.4.2	Liofilização	29
3.4.2.1	Viabilidade e Pureza Pré-Liofilização	30
4	RESULTADOS	31
4.1	<i>Cryptococcus</i> spp.	31
4.2	<i>Candida</i> spp.	32
4.3	Preservação	36

5	DISCUSSÃO	37
5.1	Autenticação	37
5.2	Preservação	40
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICE A – INFORMAÇÕES DA ORIGEM E ISOLAMENTO DE 104 CEPAS DE CRYPTOCOCCUS SPP. CEDIDAS PELO FIOCRUZ/INI	500
	APÊNDICE B – INFORMAÇÕES DA ORIGEM E ISOLAMENTO DE 32 CEPAS DE CANDIDA SPP.	59
	APÊNDICE C – PERFIL DE FILAMENTAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CLAMIDÓSPORO EM 73 CEPAS DE CANDIDA SPP. CARACTERIZADAS PELA TÉCNICA DE MICROCULTIVO EM LÂMINA.	611
	APÊNDICE D – RESULTADOS DA AUTENTICAÇÃO DAS CEPAS DO GÊNERO CANDIDA	64
	APÊNDICE E – CEPAS LIOFILIZADAS PARA INTEGRAR O ACERVO A CFRVS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Vigilância Sanitária no Brasil

A implementação da Vigilância Sanitária no Brasil remete aos primeiros anos de colonização no país com a vinda da família real portuguesa em 1808. A partir daí a saúde pública foi instaurada de modo a conter possíveis epidemias e facilitando a aceitação do comércio brasileiro em âmbito internacional (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Em 1820 foi criada a Inspetoria de Saúde Pública do Porto do Rio de Janeiro, órgão que passou a regulamentar diversos aspectos da vida cotidiana dos residentes na cidade. Dentre eles, o isolamento de doentes, os cemitérios, casas de saúde, matadouros, medicamentos, entre outros (TEIXEIRA; GEMAL, 2016).

O poder de polícia foi instituído em 1842, em um cenário de mudanças no país que passava a ser uma república federativa. Tal poder foi responsável pela fiscalização e aplicação de penalidades, por controlar a propagação crescente de doenças transmissíveis no Brasil (BRASIL, 2011).

Com o avanço das pesquisas científicas europeias e a diminuição da credibilidade empírica, foi então criado em 1883 o Laboratório de Higiene da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Além de garantir a prática dos alunos da instituição, o laboratório também contava com análise de alimentos, medicamentos e bebidas (TEIXEIRA; GEMAL, 2016).

No entanto, apesar das ações paliativas, diversos surtos de doenças, como febre amarela, peste bubônica e varíola passaram a ocorrer nos anos seguintes, até que em 1904 se instalou no Rio de Janeiro a Revolta da Vacina, por parte da população que se encontrava extremamente desgostosa com o governo. Concomitantemente, no decorrer da década, como efeito da Primeira Guerra Mundial, a indústria brasileira ganhou impulso, e assim, em 1920, foi publicado o Decreto nº 3987 que estabelecia que os produtos antissépticos, farmacêuticos, soros, vacinas e alimentos estariam submetidos à fiscalização sanitária (TEIXEIRA; GEMAL, 2016; PORTO, 2003).

Apenas em 1953, por intermédio do Decreto nº 1920, houve a criação do Ministério da Saúde, e no ano seguinte a criação do Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM). Esse laboratório tinha como objetivo analisar

produtos de interesse para a saúde, favorecer o desenvolvimento da indústria farmacêutica no país, entre outros. Em 1961 a análise de alimentos foi incorporada ao LCCDM, acarretando a modificação de seu nome para Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos. A reestruturação da área ocorreu após a Segunda Guerra Mundial com as diversas descobertas científicas que vinham sendo realizadas. A participação da população foi englobada em 1976 com o surgimento da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária e a reestruturação conjunta do Ministério da Saúde. Essa nova estruturação traduziu-se em ações mais rígidas no controle de qualidade dos produtos de interesse à saúde (BRASIL, 1954; BRASIL, 1973; ALMEIDA FILHO, 2003).

Em 4 de setembro de 1981, o anteriormente chamado LCCDMA foi transferido para a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e inaugurado como Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). O INCQS dessa forma ficaria subordinado administrativamente à Fiocruz sendo, posteriormente, vinculado tecnicamente à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (PIOVESAN, 2002).

A criação da ANVISA, em 1999, se fez com o objetivo de coordenar um sistema que até então se encontrava desconexo devido a diversas problemáticas ocorridas na saúde pública no decorrer da década. A ANVISA foi criada por meio da Medida Provisória nº 1791, e da Lei nº 9782 que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) interligando ambos ao Ministério da Saúde. Ainda na década de 90, houve a criação do Sistema Único de Saúde (SUS) pela Lei nº 8080/90, e a renomeação da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária para Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS). Dessa forma houve a desburocratização dos processos com a finalidade de obtenção de respostas ágeis e eficientes (ALMEIDA FILHO, 2003; LUCCHESI, 2006).

1.2 Organização do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

A ação da vigilância sanitária pode ser considerada primordialmente como de prevenção, já que consiste na proteção da sociedade. Sua ação engloba do tratamento à recuperação, relacionados aos riscos para com a saúde (COSTA, 1999).

A estruturação do SNVS se dá nas três esferas governamentais: federal, estadual e municipal. No âmbito federal encontra-se a ANVISA vinculada ao Ministério da Saúde, e o INCQS vinculado à Fiocruz. Na esfera estadual estão as Secretarias Estaduais de Saúde e seus Laboratórios Centrais (Lacen), enquanto as Vigilâncias Sanitárias (VISA) municipais correspondem ao componente municipal. É importante ressaltar que, não existe uma relação de subordinação entre as esferas, o que ocorre é o compartilhamento de ideias e competências. Essa descentralização gera uma autonomia por parte dos próprios órgãos governamentais, que podem atuar de acordo com as suas especificidades e divergências. Apesar de essa descentralização ter um lado positivo, nem todos os municípios possuem um sistema de vigilância sanitária estruturado, o que acaba podendo ser de fato prejudicial (BRASIL, 2011).

Além da ação de fiscalização, o SNVS conta com a participação dos laboratórios que são responsáveis por ações de controle de qualidade dos produtos para a saúde. Nos estados e municípios encontram-se os laboratórios que formam uma rede de sustentação à vigilância sanitária e no plano federal, o INCQS detém esse papel. Todos esses laboratórios atuam em análises fiscais de produtos, além de contribuírem para a produção tecnológica e de base científica (BRASIL, 2011).

1.3 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

O INCQS é uma unidade da Fiocruz, atuante na análise do controle de qualidade de produtos para a saúde, ambientes e serviços amplamente interligados com a Vigilância Sanitária. Seguindo a Norma da ABNT NBR ISO 17025:2017, o INCQS conta com alguns de seus ensaios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia (Cgcre/Inmetro) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (TEIXEIRA; GEMAL, 2016; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

O Instituto é dividido em quatro departamentos técnicos-científicos separados pela sua área de interesse: Departamento de Microbiologia, Departamento de Química, Departamento de Imunologia e Departamento de Farmacologia e Toxicologia. Dentro de cada departamento estão localizados os laboratórios, que são ainda divididos em setores. Cada setor é responsável por uma determinada atividade

que normalmente envolve análise fiscal de produto ou produção tecnológica (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019b).

Além da divisão por departamentos e laboratórios, o instituto ainda conta com dez núcleos técnicos: núcleo técnico de saneantes, núcleo técnico de medicamentos, núcleo técnico de sangue e hemoderivados, núcleo técnico de artigos de diálise, núcleo técnico de produtos biológicos, núcleo técnico de cosméticos, núcleo técnico de alimentos, núcleo técnico de saúde ambiental, núcleo técnico de artigos de saúde, núcleo técnico de conjuntos, reagentes e insumos diagnósticos. Cada um é responsável por orientar a distribuição das amostras fiscais para seus respectivos departamentos e posteriormente laboratórios, de acordo com as análises que deverão ser realizadas para cada produto. O coordenador do núcleo técnico terá a responsabilidade de acompanhamento dos processos referentes as análises das amostras. Essas amostras serão analisadas de acordo com a sua regulamentação técnica, denúncias de agravo à saúde, programas ou convênios. (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018a).

Dentro do Departamento de Microbiologia situa-se o Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR) que é dividido em dois setores, o de Fungos e o de Bactérias e Arqueas. O LMR abriga ainda três Coleções Biológicas: a Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (Fiocruz/CFRVS) localizada no Setor de Fungos; a Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (Fiocruz/CBRVS) e a Coleção de Arqueas, ambas sob a responsabilidade do Setor de Bactérias e Arqueas.

1.4 Histórico das Coleções Biológicas no Brasil

As Coleções Biológicas são consideradas a base da pesquisa científica, por serem centros de conservação de organismos de interesses tanto para o meio acadêmico, quanto para a utilização dos mesmos em ensaios tecnológicos como, por exemplo, ensaios de controle de qualidade. A conservação dos organismos nas coleções é feita de forma a garantir a estabilidade por longos períodos, mantendo as características genéticas e morfológicas dos organismos (ABREU, 2004; DUARTE, 2003).

A Fiocruz atualmente possui 33 Coleções Biológicas institucionalizadas que são divididas em cinco categorias: microbiológicas, zoológicas, histopatológicas,

arqueopaleontológicas e botânicas. Cada uma delas possui metodologia própria de preservação, que é relativa à etiologia do material. O controle desses acervos permite uma futura utilização do material para fins experimentais, didáticos, análises de controle de qualidade de produtos, ensino, serviço, pesquisa, inovação, divulgação científica. (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2019; ROMEIRO, 1996).

A manutenção de organismos microbiológicos se dá por meio de uma preservação diferenciada. Bactérias, fungos, arqueas e protozoários devem ser mantidos vivos em condições que não permitam mutação ou variabilidade que possam refletir na patogenicidade, virulência e características básicas da cultura original. Além da função de conservação, essas coleções ainda possuem a atividade de identificação, que se dá através de métodos fenotípicos e moleculares (ABREU, 2004; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2018).

Considerando o contexto mundial, as coleções de cultura são estruturas ainda bastante recentes no Brasil. Anteriormente a sua criação, os pesquisadores nacionais adquiriam cepas de instituições estrangeiras como a *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Deutsche Sammlung Vong Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ). Além de o trâmite ser complicado, ainda existia a possibilidade de modificação na cultura, já que o tempo de envio era extremamente longo (ABREU, 2004; FIGUEIREDO, 2001).

A iniciativa da criação de coleções no Brasil partiu dos próprios pesquisadores na medida em que os trabalhos científicos começaram a ser desenvolvidos fortemente, principalmente no Estado de São Paulo, e existia a dificuldade no trâmite internacional na obtenção de cepas. Hoje no país existem coleções de referência que estão localizadas principalmente na região sudeste, sendo uma dessas a CFRVS (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2005).

1.5 Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (Fiocruz/ CFRVS)

A CFRVS é uma das 33 Coleções Biológicas institucionalizadas da Fiocruz. Além disso, é a primeira Coleção do país a ser acreditada pela Cgcre/Inmetro nos ensaios de viabilidade, pureza e autenticação de leveduras e fungos filamentosos, segundo a Norma ABNT ISO/IEC 17025:2017. O INCQS adota essa Norma em gestão de controle da qualidade, que compreende a competência de laboratórios de

ensaios e calibração (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019).

Além da sua função primordial, a Coleção também é responsável por caracterização e distribuição de cepas, treinamentos, consultoria, além do serviço de depósito por meio do qual incrementa seu acervo. A CFRVS conta com um acervo de 154 cepas depositadas que são utilizadas amplamente em ensaios microbiológicos, podendo também ser utilizadas na pesquisa científica (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019).

1.6 Depósito de cepas

O incremento de um acervo em uma Coleção, depende exclusivamente do depósito de cepas. Os depósitos podem ser realizados de três formas diferentes: depósito aberto onde o material biológico é de acesso livre ao público; depósito restrito, quando as cepas podem ser fornecidas com autorização do depositante; depósito fechado quando é realizado de maneira confidencial. O tipo de depósito é determinado pelo próprio pesquisador depositante (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo. Em 2005 estimou-se que o país abrigava entre 170 mil e 210 mil espécies biológicas, o que corresponde a 10% da biota mundial. Dessa forma, é notável a importância das Coleções Biológicas para documentação, registro e identificação taxonômica. Além disso, a manutenção dessas coleções garante uma vigilância epidemiológica, principalmente, acerca de organismos patogênicos ao homem (LEWINSOHN, 2002; ARANDA, 2014).

1.7 Infecções fúngicas

Atualmente são conhecidas milhões de espécies fúngicas que estão presentes em todos os tipos de ambientes, embora apenas cerca de centenas de espécies possam causar doenças. Os fungos são polifiléticos, quimio-heterotróficos e decompositores de matéria orgânica. Seu ciclo de vida é dividido entre anamórficos, aqueles que possuem um ciclo de vida assexuado, e teleomorfos, aqueles de ciclo de vida sexuado. Morfologicamente, esses organismos são

divididos em pluricelulares e unicelulares, sendo que os fungos dimórficos apresentam as duas estruturas, dependendo da temperatura em que são cultivados (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

As infecções que acometem humanos podem ser de diferentes etiologias, entre elas aquelas causadas por fungos. Alguns fungos estão classificados entre os maiores causadores de infecções oportunistas, e apesar disso, ainda existe uma grande dificuldade no diagnóstico dessas doenças, já que a sintomatologia pode muitas vezes ser confundida com diversas infecções bacterianas que são de fato mais difundidas na comunidade médica. Além disso, o custo no tratamento de infecções fúngicas pode chegar a R\$ 400 mil por paciente. Apenas recentemente, a OMS incluiu as micoses entre as doenças negligenciadas. Destacam-se entre os patógenos oportunistas organismos dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* (BORBA, 2018; HSUEH, 2005).

Estima-se que um bilhão de pessoas no mundo sejam afetadas por infecções fúngicas. Essas infecções podem se apresentar de diversas formas como, asma e alergias, infecções na pele e nas unhas, infecções pulmonares, cardíacas, sanguíneas e meningites (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). *Candida* e *Cryptococcus* são os gêneros leveduriformes mais encontrados na clínica, enquanto *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., *Penicillium* sp. e Zygomycetos são os filamentosos mais encontrados na natureza (BONGOMIN et al., 2017).

1.7.1 *Candida* spp.

Responsáveis pela maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por fungos, *Candida* spp. são leveduras presentes na microbiota humana de até 80% dos indivíduos saudáveis, que em condições de imunossupressão do hospedeiro podem provocar patogenia. Estão presentes em diversos sítios como na mucosa oral, gastrointestinal e vaginal (LACAZ et al., 2002; SHAO, 2007).

As leveduras desse gênero são microrganismos unicelulares e pleomórficos, de ciclo sexual incompleto, podendo formar pseudo hifas e/ou hifas verdadeiras. Incluem mais de 150 espécies e a coloração de suas colônias pode variar de branca a acinzentada. Além disso, a morfologia de cada colônia pode variar entre bordas regulares ou irregulares, superfície lisa, rugosa ou sulcada, e ainda entre brilhosas e

opacas. As principais espécies patogênicas podem ser diferenciadas através da sua coloração em meios cromogênicos tais como CHROMagar®*Candida* (BD Difco), *Candida*® ID2 (BioMérieux), Hicrome®*Candida* (HiMedia), já que cada espécie reagirá de forma diferente ao substrato cromogênico e produzirá uma coloração distinta. Possuem uma grande capacidade adaptativa e podem ser encontradas em ambientes aeróbios e anaeróbios (LACAZ et al., 2002; REISS; MORRISON, 1993).

Atualmente 17 espécies são conhecidas como agentes de infecções em humanos, sendo que 90% das infecções invasivas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SILVA, 2016).

O primeiro relato acerca de uma infecção por leveduras desse gênero foi descrito pelo médico alemão Bernhard von Langenbeck em 1839. Nesse episódio, o microrganismo foi isolado da cavidade oral de um paciente, mas apenas em 1923 o fungo foi caracterizado como *C. albicans* pela micologista Christine Marie Berkhout. Essa espécie é considerada a mais importante levedura patogênica oportunista (BARNETT et al., 1992; GIOLO et al., 2010).

Além do interesse clínico, a *Candida albicans* também é utilizada em diversos ensaios para avaliação da qualidade sanitária como de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos (BOU-CHACRA et al., 2003; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.7.2 *Cryptococcus* spp.

Os microrganismos do gênero *Cryptococcus* começaram a ser descritos pela primeira vez há aproximadamente 120 anos por Otto Busse e Abraham Buschke, que isolaram o fungo a partir de uma paciente de 31 anos que se queixava de dores na perna. Posteriormente, no ano de 1901 após diversos estudos, o gênero foi de fato nomeado como *Cryptococcus* (KNOKE; SCHWESINGER, 1994; HEITMAN et al., 2011).

Esse gênero de leveduras é composto de 70 espécies sendo que entre elas existem duas variedades mais patogênicas, *Cryptococcus gattii* (Sorotipos B e C) e *Cryptococcus neoformans* (Sorotipos A e D). *C. gattii* pode ser encontrado em plantas e madeira de regiões tropicais e subtropicais, enquanto *C. neoformans* está presente em habitats urbanos e rurais, porém, é associado principalmente as fezes

de pombo, sem efetivamente causar a doença nessas aves. No entanto, essas duas espécies podem coexistir na natureza (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2012a; FILIÚ et al., 2002; KWON-CHUNG, 1982).

As leveduras desse gênero são haploides, globosas e encapsuladas, medindo de 3 a 8 μm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo. Sintetizam melanina e são termotolerantes, podendo crescer em temperaturas de até 40 °C. As colônias podem apresentar-se lisas ou mucoides, com aspecto brilhante ou pastoso, com variação de cor entre branca e creme. Em meio adequado, a produção de melanina dará origem a colônias de coloração marrom (REOLON et al., 2004).

A criptococose é uma micose sistêmica adquirida por via inalatória, podendo atingir o pulmão e conseqüentemente o sistema nervoso central (SNC). É uma infecção que pode acometer tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes, dependendo da espécie em questão. Com uma sintomatologia que inclui cefaleia intensa, febre, irritabilidade e, em alguns casos, mudança de comportamento, lentidão e até confusão mental, a criptococose pode ser comparada a um quadro de meningite. Estima-se que ocorram cerca de 957.000 casos de meningite por *Cryptococcus* spp. todo ano e apesar disso, a criptococose não é uma doença de notificação compulsória no Brasil (YAMAMURA et al., 2013; CONTIN et al., 2011; COGLIATI, 2013).

1.8 Justificativa

A realização de um depósito de cepa em uma Coleção, demanda a realização de ensaios de controle de qualidade, entre esses os testes de viabilidade, pureza e autenticação. As cepas devidamente avaliadas podem ser distribuídas, contribuindo para diversos estudos que visam aspectos taxonômicos, sanitários, epidemiológicos e ambientais.

Dois grandes acervos foram atribuídos a CFRVS e, com isso, a avaliação das cepas que compõe estes acervos se faz necessária.

O presente trabalho teve como finalidade realizar os testes de pureza, viabilidade, autenticação, e a preservação de 202 cepas provenientes de diferentes fontes, tanto clínicas quanto ambientais.

Com a conclusão desta avaliação, esses dois acervos poderão ser depositados na CFRVS, inseridos no banco de dados e disponibilizados no catálogo, aumentando, assim, a visibilidade da CFRVS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade de dois acervos contendo 202 cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. para futuro depósito na CFRVS.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade das cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.;
- Avaliar a pureza destas cepas;
- Autenticar as cepas viáveis e puras;
- Preservar as cepas pelos métodos de criopreservação a -80 °C e liofilização.

3 METODOLOGIA

3.1 Microrganismos

Foram estudadas 202 cepas de *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *Candida* sp. de origens ambientais e clínicas.

O primeiro acervo foi doado pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (Fiocruz/CCFF) e possuía 98 cepas. Esse acervo era composto de 20 cepas previamente identificadas como *Cryptococcus* spp. e de 78 cepas identificadas como *Candida* spp. Todas as cepas deste acervo encontravam-se preservadas em óleo mineral e mantidas à temperatura ambiente, tendo sido isoladas de diferentes fontes ambientais ou clínicas em uma linha temporal de 1929 até 1989.

O segundo acervo avaliado neste estudo era composto de 104 cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*. Estes microrganismos foram cedidos à CFRVS pela pesquisadora responsável pelas coletas e estavam preservados em glicerol a 15% na temperatura de -20 °C no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (Fiocruz/INI). Diferentemente do primeiro acervo, essas cepas eram mais recentes e foram isoladas em Roraima entre os anos 1997 e 2001, tendo também, diferentes origens clínicas ou ambientais.

3.2 Viabilidade e pureza

As cepas preservadas a -20 °C foram descongeladas a 36 °C e alíquotas de aproximadamente de 200 µL foram transferidas para tubos contendo caldo extrato de levedura-extrato de malte (YMB) (BD Difco, Le Pont de Claix, França). Para as cepas preservadas em óleo mineral, fragmentos da cultura foram retirados com auxílio de alça em “L” e transferidos para tubos contendo YMB. Em ambos os casos, os tubos inoculados foram incubados à temperatura de 25 °C por 2 a 3 dias. No caso de ausência de crescimento os tubos foram mantidos incubados por até dez dias para confirmar a ausência de viabilidade. Após o período de incubação, cada microrganismo que apresentou crescimento em YMB foi considerado viável e inoculado em placa de Petri contendo ágar de extrato de levedura-extrato de malte (YMA) (BD Difco, Le Pont de Claix, França) por esgotamento para a obtenção de

colônias isoladas, de forma a observar as características coloniais, sendo consideradas puras aquelas culturas que apresentaram as mesmas características coloniais esperadas para os gêneros estudados (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018c).

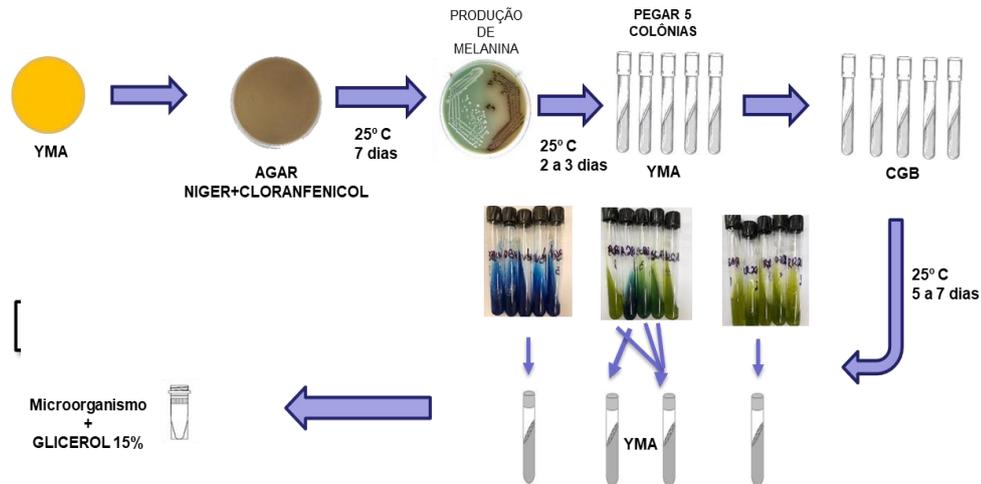
3.3 Autenticação

3.3.1 *Cryptococcus* spp.

A partir do crescimento em YMA, descrito no item 3.2, as cepas previamente identificadas como *Cryptococcus* spp. foram inoculadas em placa de Petri contendo Ágar Semente de Níger (ASN) (KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2012c) com cloranfenicol (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) para observação da produção de melanina característica do gênero. As placas foram incubadas à temperatura de aproximadamente 25 °C por 7 dias (Figura 1).

Para diferenciação entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans* foi utilizado o meio Canavanina Glicina Azul de Bromotimol (CGB) (KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2012b). Com a utilização de uma alça bacteriológica, cinco colônias do crescimento em ASN com cloranfenicol foram transferidas para cinco tubos contendo CGB e esses tubos foram incubados à temperatura de aproximadamente 25 °C por 7 dias. Em meio CGB as duas espécies respondem de forma diferente: *C. gattii* é um microrganismo resistente à canavanina, portanto utiliza a glicina como fonte de carbono e a coloração do meio é modificada de verde para azul; *C. neoformans* é incapaz de crescer devido à sua sensibilidade à canavanina, e a coloração do meio é mantida em verde (Figura 1).

Figura 1 - Esquema da etapa de Autenticação das cepas do gênero *Cryptococcus*.



Fonte: (Do autor, 2019).

3.3.2 *Candida* spp.

A partir do crescimento em YMA, descrito no item 3.2, as cepas previamente identificadas como *Candida* spp. foram inoculadas no meio CHROMagar®*Candida* (BD Difco, Le Pont de Claix, França) e incubadas a 25 °C por 5 dias. Posteriormente, a pigmentação das colônias foi inspecionada para diferenciação das espécies (Quadro 1).

Além do cultivo em ágar cromogênico, outros métodos para a identificação fenotípica foram realizados para a caracterização micromorfológica e macromorfológica de *Candida* spp., sendo eles: prova do tubo germinativo, microcultivo em lâmina e identificação bioquímica no sistema VITEK® 2.

Quadro 1 - Correlação entre pigmentação das colônias e espécies do gênero *Candida* em CHROMagar®*Candida*.

Espécie	Coloração das colônias
<i>Candida albicans</i>	Verde
<i>Candida tropicalis</i>	Azul
<i>Candida krusei</i>	Rosa
<i>Candida</i> sp.	Branco

Fonte: Adaptado de Instruções de utilização do CHROMagar®*Candida* (BD Difco), 2020.

3.3.2.1 Prova do Tubo Germinativo

Para a diferenciação da espécie *C. albicans* dentre as demais, foi realizada a prova do tubo germinativo. Essa prova consistiu na utilização de 5,0 mL de soro de carneiro ou de soro humano em um tubo 13x100 mm estéril. Uma pequena quantidade de um crescimento de 48 horas foi inoculada por meio de uma alça de cromo-níquel no soro e esses tubos foram incubados a 37 °C por 2 horas. Após esse período, duas lâminas foram preparadas para observação da produção do tubo germinativo: uma após 1 hora de incubação e outra após 2 horas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2012d).

3.3.2.2 Microcultivo em Lâmina

O microcultivo em lâmina foi realizado para a visualização microscópica de pseudohifas e/ou hifas verdadeiras com formação de blastoconídeos das cepas e auxiliar na diferenciação das espécies do gênero *Candida*. A partir de cultivo de 48 horas em YMA, realizou-se um inóculo de três estrias paralelas em placa de Petri contendo ágar de milho (CMA) (BD Difco, Le Pont de Claix, França) e 1% de Tween 80 (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) com a utilização de agulha de cromo-níquel. Essas estrias foram encobertas por uma lamínula estéril e em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 25 °C por 96 horas. Posteriormente, as leituras foram realizadas diretamente no microscópio em 48 horas, 72 horas e 96 horas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2012d).

3.3.2.3 VITEK® 2

A identificação bioquímica das cepas foi realizada no sistema VITEK® 2 (BioMérieux, Lyon, França) com a utilização do cartão de identificação de leveduras VITEK® 2 YST, segundo o PU 3230-025 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018). A partir de um cultivo de 48 horas a 25 °C em meio YMA, uma colônia de cada cepa foi inoculada em tubo contendo YMA inclinado. Os tubos inoculados foram então incubados por 48 horas em estufa a 25 °C. Após a incubação, uma pequena quantidade de massa do crescimento foi retirada com auxílio de alça de cromo-níquel e utilizada no preparo de suspensão em 3,0 mL de

solução salina estéril a 0,45%. A suspensão foi preparada de acordo com a escala 2,0 de McFarland com auxílio do aparelho DensiCHEK Plus (bioMérieux, Durham, Estados Unidos).

Os tubos de plástico contendo a suspensão foram colocados em um cassete juntamente com os cartões VITEK® 2 YST. O conjunto foi introduzido no aparelho VITEK® 2 onde a suspensão foi distribuída entre os poços do cartão. Após essa etapa, o conjunto foi direcionado ao segundo compartimento do aparelho para a realização da etapa de selagem e incubação a temperatura de 35,5 °C por um período de 18 horas. Após a leitura do cartão, o aparelho gerou relatório com os resultados de cada cepa testada (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018).

3.4 Preservação

3.4.1 Ultracongelamento a -80 °C

Realizou-se a preservação em -80°C com a utilização de glicerol a 15%, criopreservador indicado para essa temperatura de acordo com o POP 65.3230.035 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2013). Para isso, após crescimento em CHROMAGAR *Candida*, as cepas do gênero *Candida* foram inoculadas em tubo contendo YMA e incubadas à uma temperatura de aproximadamente 25 °C por 2 a 3 dias. Posteriormente, um volume de 2,0 mL de glicerol (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2013) a 15% foi adicionado ao tubo, e a suspensão de crioprotetor e levedura foi distribuída igualmente em dois criotubos estéreis.

Para as cepas do gênero *Cryptococcus*, após o teste bioquímico realizado em meio CGB, foi possível separar cada cepa de acordo com a sua espécie. Portanto, preparou-se um repique de cada um dos cinco cultivos em CGB para tubos contendo YMA. Quando os cinco tubos de CGB de uma única cepa obtiveram a mesma coloração, os cinco foram repicados para um único tubo de YMA. Mas, quando ao menos um dos cinco obteve uma coloração diferente, no meio CGB, este foi inoculado em tubo de YMA separadamente. Os tubos de YMA foram incubados a 25 °C por 2 a 3 dias e após esse período de crescimento, um volume de 2,0 mL de

glicerol a 15% foi adicionado a cada tubo e dois criotubos foram preenchidos com 1,0 mL da suspensão.

A criopreservação em -80 °C consistiu na alternância inicial de temperatura dos criotubos. Depois de etiquetados e devidamente preenchidos com a suspensão microbiana, os criotubos foram mantidos na temperatura de 4°C por 20 minutos. Posteriormente, foram submetidos à temperatura de -20 °C por 10 minutos. Após essas duas etapas, as amostras foram finalmente depositadas e estocadas em ultrafreezer à -80 °C.

3.4.2 Liofilização

A liofilização das cepas foi realizada em matriz de leite desnatado (*skim milk* a 20%) (BD Difco, Le Pont de Claix, França). De acordo com o POP 65.3230.014, 5,0 mL do criopreservador foram adicionados a cada cepa cultivada em meio YMA. A suspensão foi então transferida para um tubo vazio estéril. A suspensão foi distribuída em 11 ampolas de vidro estéreis que posteriormente foram congeladas para prosseguir com a etapa de liofilização. Uma alíquota do leite desnatado foi inoculada em caldo YMB e incubada a 25 °C durante 7 dias para verificação da esterilidade do lote (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018b).

As ampolas foram estocadas em ultra freezer a -80 °C por 24 horas. Após esse período foram colocadas em liofilizador previamente ligado e regulado, seguindo as orientações do PU 3230.015 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019a). O equipamento foi mantido ligado realizando o processo de sublimação da água da suspensão por 24 horas. Após esse período as ampolas foram colocadas na árvore própria para este procedimento e seladas com a utilização de um maçarico de chama dupla. Logo em seguida, foram submetidas ao teste de detecção de vácuo. Neste teste, as ampolas devidamente seladas foram dispostas em uma estante e posteriormente a presença de vácuo foi observada com a utilização da pistola de vácuo. As ampolas que apresentaram vácuo adquiriram uma coloração arroxeadada durante o contato com a pistola, e as ampolas que não apresentaram vácuo permaneceram transparentes.

3.4.2.1 Viabilidade e Pureza Pré-Liofilização

Os testes de viabilidade e pureza pré-liofilização foram realizados de acordo com o POP 65.3230.033. Para a determinação da pureza, uma gota da suspensão do item 3.4.2 foi transferida para placa de Petri contendo o meio de cultivo indicado para o fungo em análise, e uma alça de níquel-cromo foi utilizada para estriar a suspensão na forma de esgotamento. As placas foram incubadas em estufa a 25 °C durante 48 horas e após esse período a pureza das culturas foi avaliada (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018d).

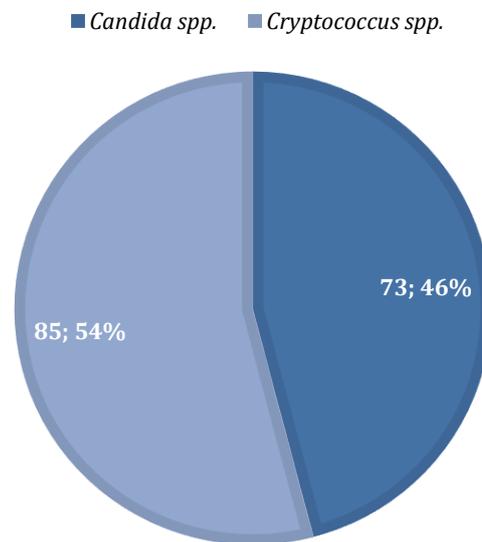
Para avaliação da viabilidade das cepas foram realizadas diluições a partir da suspensão a ser liofilizada. Transferiu-se 0,1 mL da suspensão para tubo contendo 9,9 mL de água purificada estéril (tubo A). Em seguida, 0,1 mL da solução do tubo A foi transferida para tubo contendo 9,9 mL de água purificada estéril (tubo B). Posteriormente, realizou-se a transferência de 1,0 mL da solução do tubo B para tubo contendo 9,0 mL de água (tubo C), e então 1,0 mL da solução do tubo C foi transferida para outro tubo contendo 9,0 mL de água (tubo D). Um volume de 0,1 mL da solução do tubo C foi inoculada em placa de Petri contendo o meio de cultivo indicado pelo método de semeadura por espalhamento utilizando alça de Drigalski estéril. Inoculou-se 0,1 mL da maior diluição (tubo D) em placa contendo YMA, em triplicata, pelo método de semeadura por espalhamento utilizando alça de Drigalski estéril. As quatro placas de Petri foram incubadas a 25 °C durante 48 horas. Para verificação da esterilidade do lote de água purificada estéril utilizado no ensaio, 0,1 mL da água foi adicionada em caldo YMB e incubada a 25 °C por 7 dias (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2018d).

4 RESULTADOS

Dentre as 202 cepas estudadas, 158 (78%) puderam ser recuperadas pelo ensaio de viabilidade e se apresentaram puras, e 44 cepas (22%) não apresentaram crescimento.

A distribuição dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* entre as cepas viáveis é ilustrada na Figura 2.

Figura 2 - Distribuição dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* entre as cepas viáveis.



Fonte: (Do autor, 2019).

4.1 *Cryptococcus spp.*

As cepas do gênero *Cryptococcus* eram provenientes de diferentes nichos ecológicos, sendo 15 isoladas de amostras clínicas e 77 do meio ambiente. Não foi possível determinar a origem de 32 cepas. As informações de origem e isolamento de 104 cepas de *Cryptococcus spp.* cedidas pelo Fiocruz/INI são resumidas no Apêndice A. Desse total, 85 cepas apresentaram viabilidade em YMA e produção de melanina em ASN com cloranfenicol, e foram submetidas ao cultivo em CGB para diferenciação das espécies *C. gattii* e *C. neoformans*.

Pelas características de crescimento no meio CGB, 52 (61%) cepas foram identificadas como *C. gattii* após observação da alteração na coloração do meio de verde para azul cobalto devido à alcalinização. Em contrapartida, 28 (33%) cepas

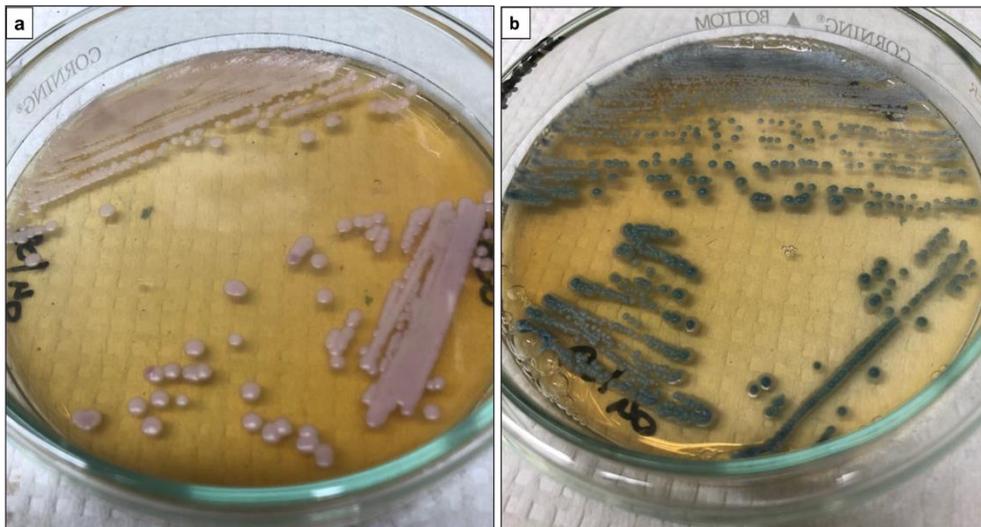
não apresentaram crescimento, não havendo alteração na coloração do meio e, portanto, foram identificadas como *C. neoformans*. Outras cinco (6%) cepas apresentaram culturas mistas, com colônias características das duas espécies.

4.2 *Candida* spp.

Das 78 cepas previamente identificadas como *Candida* spp. utilizadas neste estudo, 8 eram provenientes de amostras clínicas. Porém não foi possível determinar a fonte 70 cepas. Assim como a origem, dados de procedência e a data de isolamento só estavam disponíveis para algumas cepas conforme descrito no Apêndice B.

Após cultivo em CHROMagar®*Candida*, 20 (27%) cepas apresentaram pigmentação azul, 11 (15%) pigmentação rosa, 37 (51%) pigmentação verde e 5 (7%) pigmentação branca, sendo classificadas presuntivamente como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans* e *Candida* sp., respectivamente. O crescimento de cepas com pigmentação característica das espécies *C. tropicalis* e *C. krusei* é demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Crescimento cepas de *Candida krusei* (a) e *Candida tropicalis* (b) em meio CHROMAGAR *Candida*.

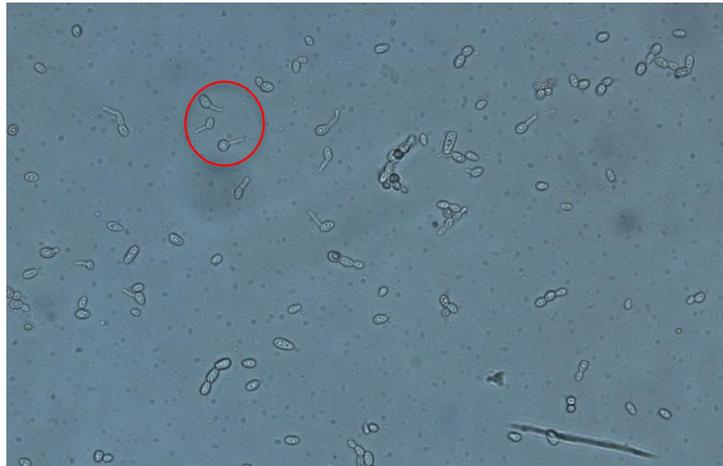


Fonte: (Do autor, 2019).

As cepas do gênero *Candida* foram submetidas à prova do tubo germinativo para a observação da formação da estrutura de tubo germinativo presente nas espécies *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Das 73 cepas submetidas ao

teste, em 56 (77%) não foi observada a presença de tubo germinativo, enquanto 17 (23%) apresentaram a estrutura em até 2 horas de teste. A observação microscópica de tubo germinativo é demonstrada na Figura 4.

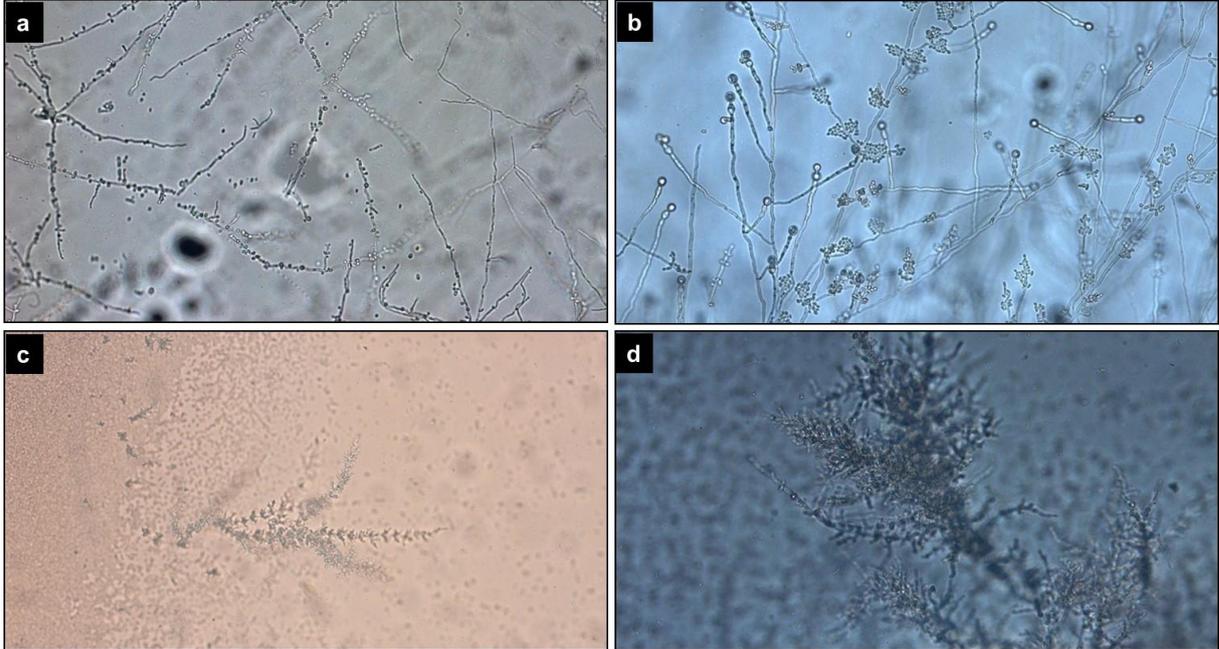
Figura 4 - Visualização de tubo germinativo em microscópio óptico com aumento de 400x.



Fonte: (Do autor, 2019).

Pela técnica de microcultivo em lâmina foram verificados dois parâmetros, a filimentação de cada cepa, e a produção ou não de clamidósporos sendo essa última uma característica das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*. As cepas testadas apresentaram filimentação característica de *C. albicans* (n=34; 46,6%), *C. tropicalis* (n=15; 20,6%), *C. parapsilosis* (n=1; 1,4%), *C. guilliermondii* (n=2; 2,7%) ou *C. krusei* (n=2; 2,7%). Na figura 5 são exemplificadas micrografias dos perfis característicos das espécies *C. tropicalis*, *C. albicans/dubliniensis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. 22 (30%) cepas apresentaram clamidósporo. Não foi possível determinar o perfil de filimentação de 19 cepas (26,0%), e 49 cepas (67%) não foram caracterizadas quanto à presença de clamidósporo. O resultado da leitura do teste de microcultivo em lâmina das 73 cepas testadas é descrito no Apêndice C (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2012d).

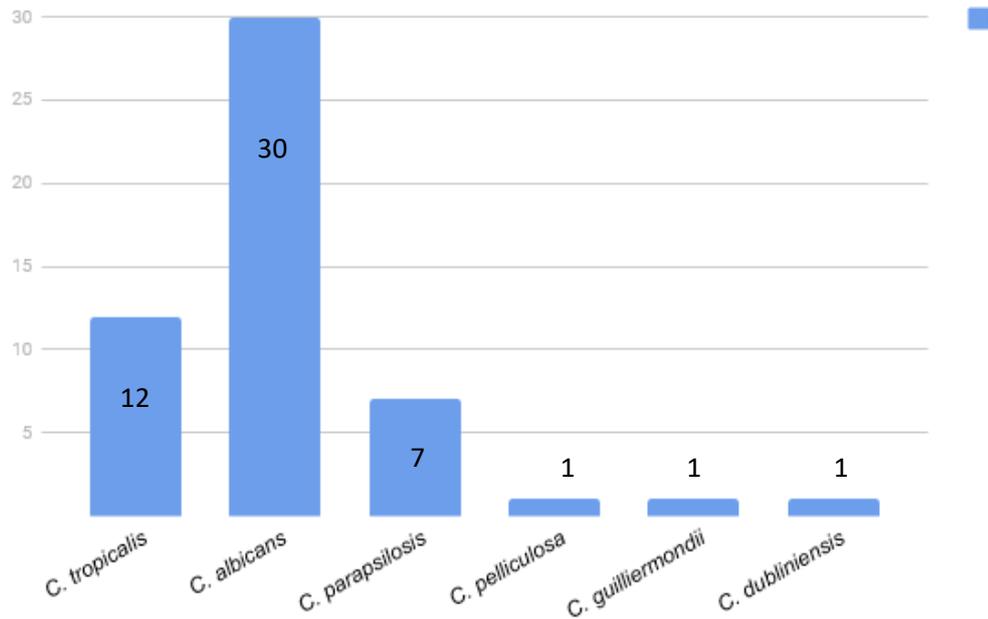
Figura 5 - Micrografia do perfil de filamentação característico das espécies *Candida tropicalis* (a), *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* (b), *Candida krusei* (c) e *Candida guilliermondii* (d) no teste de microcultivo em lâmina.



Fonte: (Do autor, 2019).

Pelo sistema VITEK[®] 2 as cepas apresentaram resultado compatível com as espécies *C. albicans* (n=30), *C. tropicalis* (n=12), *C. parapsilosis* (n=7), *C. pelliculosa* (n=1), *C. guilliermondii* (n=1) e *C. dubliniensis* (n=1) (Figura 6).

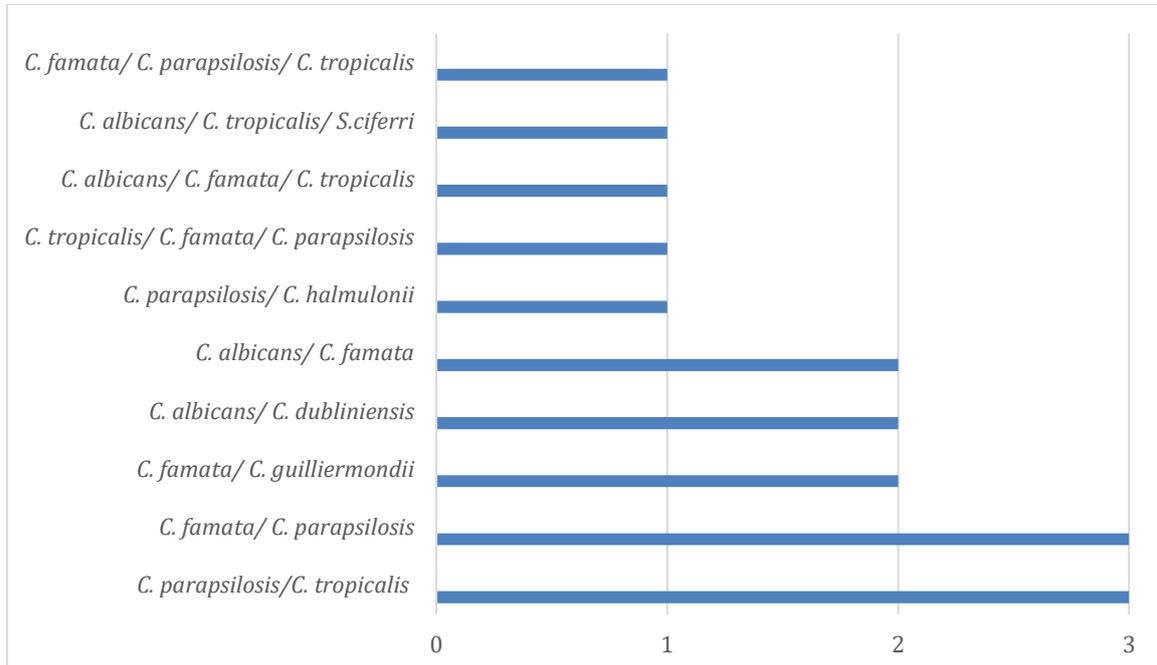
Figura 6 - Frequência das espécies de *Candida* entre 73 cepas caracterizadas no sistema VITEK® 2.



Eixo y: número de cepas identificadas, eixo x: Espécies identificadas pelo sistema VITEK® 2.
 Fonte: (Do autor, 2019).

Algumas cepas apresentaram baixa discriminação na identificação pelo VITEK® 2 e foram compatíveis com mais de uma espécie do gênero *Candida*. Quatro cepas apresentaram compatibilidade entre três espécies e 13 cepas apresentaram compatibilidade entre duas espécies. O sistema VITEK® 2 não foi capaz de identificar 4 cepas (Figura 7).

Figura 7 - Resultados da identificação de cepas de *Candida* spp. com baixa discriminação no sistema VITEK 2.



Eixo y: Espécies identificadas pelo sistema VITEK® 2, eixo x: número de cepas identificadas (n=17).
Fonte: (Do autor, 2019).

Todas as cepas do gênero *Candida* recuperadas e seus respectivos resultados de acordo com suas diferentes metodologias de identificação se encontram no APÊNDICE D.

4.3 Preservação

Todas as 158 cepas recuperadas foram preservadas em -80 °C utilizando o glicerol a 15% como criopreservador. Oito cepas do gênero *Candida* foram também preservadas pelo método de liofilização e dessas, sete cepas poderão ser inseridas no acervo da CFRVS, devido a sua identificação precisa nas diferentes metodologias realizadas. Os números dessas cepas e suas informações se encontram no APÊNDICE E.

5 DISCUSSÃO

5.1 Autenticação

O norte e nordeste do Brasil são regiões endêmicas para *C. gattii*, um microrganismo que acomete imunocompetentes. Em contrapartida, *C. neoformans* é um microrganismo oportunista que acomete imunocomprometidos. Apesar dessa diferença, ambos são encontrados nos mesmos nichos ecológicos como ocos de árvores, poeira, madeira em decomposição e solo. Portanto, uma caracterização efetiva é necessária para a observação da epidemiologia da doença, principalmente nessas regiões quando houver o isolamento do microrganismo sem ter a ciência da espécie (COGLIATI, 2013).

Existem alguns meios seletivos indicados para o crescimento de *C. gattii* e *C. neoformans*. No presente trabalho, foi feito o uso de ASN, onde os fungos dessas espécies produziram colônias marrom escuras fenol oxidase positivas, o que se dá pela produção de melanina. A enzima fenol-oxidase presente na célula age com os substratos presentes no meio de cultivo gerando quinonas, essas sofrem uma auto polimerização formando a melanina. Essa proteína fica então retida na parede celular do fungo se tornando responsável pela expressão do pigmento. A melanina é um fator de virulência em diversos fungos patogênicos. Segundo um estudo feito por Salas et al., 1996, em animais infectados por criptococose, as cepas não melânicas apresentavam uma virulência menor em relação às cepas melânicas. A melanização diminui a taxa de fagocitose e morte de *C. neoformans* pelos macrófagos. Esses estudos sugerem que essa proteína interfere com a resposta imune do hospedeiro em relação a infecção fúngica além de diminuir a eficácia de drogas antifúngicas (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; IKEDA et al, 2002; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; IKEDA et al, 2003).

No presente trabalho, daquelas cepas do gênero *Cryptococcus* que apresentaram crescimento no ASN com produção de melanina puderam ser identificadas prontamente entre as duas espécies patogênicas, *C. gattii* e *C. neoformans* através da utilização do meio de cultivo CGB. Esse meio de cultivo permite a diferenciação entre as duas espécies patogênicas causadoras da criptococose. O crescimento de 52 cepas nesse meio, alterou o pH devido a sua alcalinização e assim pôde se observar a modificação na coloração de amarelo para

azul cobalto no meio, identificadas como *C. gattii*. Isso ocorre porque as cepas dessa espécie são resistentes a canavanina e, portanto, crescerão utilizando a glicina do meio como fonte de carbono. Nas 28 cepas de *C. neoformans* o mecanismo ocorre de forma diferenciada, isso porque a canavanina presente no meio é uma droga tóxica a essa espécie, logo o microrganismo não apresentará crescimento e não haverá alteração da coloração do meio através do indicador de pH azul de bromotimol (RANDHAWA et al, 2006).

Apesar da boa identificação através do meio de cultivo CGB, essas duas espécies podem coexistir na natureza sendo encontradas nos mesmos nichos. A utilização de outra metodologia como a PCR Multiplex, utilizando genes espécie-específicos poderia ser uma alternativa de identificação mais rápida e precisa na substituição do ensaio manual de identificação bioquímica (NAKAMURA et al, 1998).

Diferentemente das cepas do gênero *Cryptococcus*, no presente trabalho, as cepas do gênero *Candida* passaram por diferentes formas de identificação. Na clínica existem variadas metodologias como a utilização do CHROMagar®*Candida* (BD Difco) que é um meio seletivo para a diferenciação entre três espécies do gênero. Esse meio é composto por substâncias cromogênicas que libertam compostos de cores diferentes dependendo da degradação de enzimas específicas. Ou seja, cada espécie com sua enzima específica, reagirá de uma forma diferente com as substâncias cromogênicas, liberando uma coloração diferente no meio. Porém, a identificação de apenas três espécies e a incerteza em relação à coloração requer a utilização de outra metodologia para a real afirmação. (ODDS; BERNAERTS, 1994).

A técnica de microcultivo em lâmina ou Dalmau plate foi a segunda metodologia a ser realizada no presente trabalho. Essa técnica consiste na observação da filamentação fúngica através da redução da tensão superficial do meio, assim podemos observar hifas, pseudo-hifas e os blastoconídios fúngicos. Neste meio, cada espécie apresentará estruturas morfológicas diferentes que possibilitarão a identificação. *C. albicans* e *C. dubliniensis* são duas espécies caracterizadas principalmente pela presença de clamidósporos, que são estruturas de resistência, e uma filamentação com a presença de blastoconídeos em cachos, podendo ser encontradas hifas verdadeiras. *C. albicans* e *C. dubliniensis* podem ainda ser diferenciadas das outras espécies do gênero através da produção do tubo germinativo. Neste estudo, em 30 cepas previamente indicativas de *C. albicans* e

C. dubliniensis, não foi possível observar a estrutura de tubo germinativo, apenas 17 cepas apresentaram a formação do tubo, portanto, outros testes se fazem necessários para a identificação, já que as duas espécies não são distinguidas entre si morfológicamente. A biologia molecular através de um PCR multiplex utilizando um primer universal para o gênero e um primer específico para *Candida dubliniensis* como DUBF e DUBR seria uma saída ideal para garantir a distinção entre ambas espécies (LACAZ et al, 2002; SULLIVAN et al.1998; MARTINS-NISHIKAWA et al, 2002).

Outra espécie a ser encontrada neste trabalho foi a *C. parapsilosis*, esta não forma hifas verdadeiras como *C. albicans* e *C. dubliniensis* apesar de formar pseudohifas e, além disso, produz uma filamentação própria específica. Assim ocorre com outras espécies tais como: *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* que formam pseudohifas com características únicas, permitindo assim a diferenciação. É importante ressaltar que nem todas as cepas de uma mesma espécie respondem da mesma forma aos estímulos e, portanto, poderão ter um crescimento retardado ou acelerado, o que podemos perceber neste estudo (KIM et al, 2006).

Segundo Hoog et al. (2000), na filamentação das espécies de *C. guilliermondii* pela técnica de Dalmau plate podem ser encontradas as chamadas *budding cells*, estas são células filhas que não se dissociaram completamente da célula mãe. E em alguns casos o micélio também pode ser observado sendo irradiado dessas células, isso também pode ser observado neste estudo.

A filamentação característica de *C. krusei* foi a mesma descrita por Hoog et al. (2000). Além das células *budding*, um pseudomicélio é encontrado com células dispostas de forma paralela no eixo principal. Essa filamentação é semelhante a *C. tropicalis* que além dessas características, ainda apresenta pequenos grupos de conídios arranjados em pequenos grupos ao longo do eixo da hifa.

Hoje diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para agilizar o processo de identificação de leveduras, já que normalmente consiste em uma metodologia demorada, podendo prejudicar diversos diagnósticos principalmente na prática clínica. A candidíase é uma das principais infecções fúngicas diagnosticadas no ambiente hospitalar, e por isso o sistema de identificação automatizado VITEK® 2 vem sendo cada vez mais difundida. Esse teste consiste na assimilação de carboidratos pelo fungo a ser estudado, formando assim uma porcentagem acerca da identificação da espécie. Apesar de ser uma metodologia rápida e automatizada,

o sistema não apresenta 100% de certeza, podendo apresentar baixa discriminação com resultados abaixo de 85%, que é o aceitável pelo aparelho ou ainda uma identificação errônea. Para isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, em Meletiadis et al. (2011), o VITEK® 2 apresentou 91% de certeza, sendo 8% cepas com baixa discriminação e 1% não puderam ser identificadas. Um resultado comparável ao encontrado neste trabalho, onde: 71,3% das cepas apresentaram resultados positivos podendo ser identificadas; 21,9% apresentaram baixa discriminação; 6,8% não foram identificadas. Freydiere, Guinet e Boiron, (2001) e Meletiadis et al., (2011) afirmam que a junção entre as técnicas de Dalmau plate, utilização do CHROMagar®*Candida* (BD Difco) e o sistema VITEK® 2 podem garantir um resultado mais confiável e preciso para avaliar as possíveis inconsistências entre as diferentes metodologias de identificação, conforme o que foi encontrado neste trabalho e demonstrado no APÊNDICE D.

A utilização da biologia molecular seria uma alternativa para driblar as inconsistências entre as identificações (AUBERTINE et al., 2006).

5.2 Preservação

Existem diversas metodologias referentes à preservação de materiais biológicos, porém, a escolha acerca de qual utilizar dependerá das características específicas da célula e das condições laboratoriais. Das cepas testadas neste trabalho 51,4% estavam sendo preservadas em óleo mineral a temperatura ambiente, enquanto que 48,5% vinham sendo preservadas com glicerol a 15% na temperatura de -20 °C. Dentre as cepas preservadas em óleo mineral, existiam cepas previamente identificadas do gênero *Candida* e do gênero *Cryptococcus*, sendo que, apenas 1 cepa do gênero *Cryptococcus*, das 20 cepas preservadas nessas condições, pôde ser recuperada, autenticada e preservada. O que demonstra a fragilidade dessa metodologia de preservação referente às cepas do gênero *Cryptococcus* (CHAVES NETO et al., 2019).

Os métodos de manutenção têm a função de preservar a viabilidade das células e em promover uma estabilidade genética, evitando alternância em suas características decorrentes de mutações. Costa e Ferreira (1991) afirmam que os métodos de preservação podem ser classificados de três formas: métodos de curto prazo através do repique contínuo; métodos de médio prazo utilizando a preservação

em óleo mineral, preservação em água esterilizada e congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; métodos de longo prazo através da liofilização e da criopreservação. Para este trabalho duas metodologias foram utilizadas: liofilização e criopreservação. Cada uma dessas metodologias apresenta vantagens e desvantagens em relação ao uso laboratorial (ABREU, 2004).

Canhos et al. (2004) e Costa et al. (2009) afirmam que a manutenção em óleo mineral oferece uma longevidade maior quando comparada à repicagem periódica, podendo conservar fungos e bactérias por até sete anos. Porém, comparando com outros métodos, apresenta desvantagens como possíveis contaminações e instabilidade. Os resultados neste estudo demonstram essa realidade já que das 20 cepas de *Cryptococcus* spp. que vinham sendo preservadas em óleo mineral, apenas uma pôde ser recuperada, enquanto de 78 cepas do gênero *Candida*, 73 foram recuperadas. Esses números denotam a ineficiência da metodologia para um determinado gênero e a eficiência para o outro, reforçando o que foi dito por Abreu (2004), onde o método de manutenção deve variar com as características do microrganismo a ser estudado.

Já a liofilização é uma das técnicas mais utilizadas pelas Coleções Biológicas, pois garante a viabilidade dos agentes por 17 a 20 anos. Porém, apesar da sua eficiência, é uma técnica relativamente custosa (COSTA; FERREIRA, 1991).

De acordo com Paoli (2005) a liofilização pode ser dividida em três etapas: o congelamento; a desidratação primária; a desidratação secundária. Esse processo ocorre através de condições de vácuo e, por isso, nos lotes que foram produzidos neste trabalho, ao final da técnica um teste de vácuo foi realizado em cada ampola produzida. O acondicionamento e a estocagem ideal do material liofilizado influenciam diretamente na vida útil dos mesmos e por isso devem ser devidamente mantidos em ambientes com baixa umidade, baixa temperatura, evitando luz, contaminantes e oxigênio (DAY; MCLELLAN, 1995).

Para a realização dessa técnica é importante a utilização de um crioprotetor, pois dessa forma evitará a injúria celular durante o processo. Neste trabalho, a substância utilizada foi o leite desnatado a 20% por ser o crioprotetor utilizado pela CFRVS em seus ensaios. O leite desnatado ou *skim milk* atuará como crioprotetor extracelular, porque promove o aumento da osmolaridade do meio extracelular de forma a evitar a formação de cristais de gelo com a saída de água do meio intracelular para o extracelular. Esse protetor atua protegendo e estabilizando a

parede celular. É importante ressaltar que a escolha do crioprotetor também dependerá das características do microrganismo em análise (HUBÁLEK, 2003).

Assim como a liofilização, a criopreservação também é uma metodologia de preservação de longo prazo e que durante seu processamento também causa injúria celular. Portanto, para a realização dessa metodologia também é necessário o uso de crioprotetores. Para evitar os danos celulares, utilizamos o glicerol a 15% como protetor já que é uma substância que atua intracelularmente, nesse caso, o glicerol criará uma tensão dentro da célula permitindo que uma maior quantidade de água permaneça no estado líquido sob baixas temperaturas e não ocorram danos na membrana da célula (WATSON, 2000).

O congelamento pode ocorrer com a utilização de baixas temperaturas como em freezers (-20 °C), ultrabaixas temperaturas em freezers (-40 °C a -105 °C) e em nitrogênio líquido (-150 °C a -196 °C). A escolha de estocagem dependerá das condições financeiras de cada laboratório, levado em consideração as possíveis falhas dos equipamentos (SU et al., 1996).

Apesar de diversas metodologias usadas para a manutenção de microrganismos, segundo Dumont et al. (2004), a criopreservação ainda é um método que se mantém eficiente mesmo com os processos de congelamento-descongelamento, que são etapas de estresse celular. Isso pode ser demonstrado neste trabalho onde as 158 cepas foram preservadas em dois criotubos com glicerol a 15% e para a realização dos testes de identificação das 73 cepas do gênero *Candida*, um criotubo de cada foi descongelado, esses microrganismos foram semeados novamente em YMA e todas as 73 cepas apresentaram crescimento, demonstrando a eficiência da metodologia com os fungos do gênero *Candida*.

6 CONCLUSÃO

- A eficiência dos métodos de preservação varia de acordo com o gênero dos microrganismos.
- Cepas de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* podem coexistir a partir de um único isolado.
- É ideal que se disponha de mais de uma metodologia para garantir a confiabilidade dos resultados de identificação/autenticação das leveduras estudadas (taxonomia polifásica).
- Não existe um método 100% eficaz que garanta a preservação de todos os microrganismos.
- Sugere-se que mais de uma metodologia seja implantada, para garantir a manutenção dos microrganismos.
- Este trabalho contribui para o incremento de informações importantes e para a organização das cepas, que foram inseridas no acervo da CFRVS.

REFERÊNCIAS

ABREU, M.M.V. **Implantação e manutenção da Coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB**. Brasília: UniCEUB, 2004. p. 236-251.

ALMEIDA FILHO, N.A. O conceito de saúde e a vigilância sanitária: notas para a compreensão de um conjunto organizado de práticas de saúde. *In*: SEMINÁRIO TEMÁTICO PERMANENTE DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1., 2003. Brasília. 2003.

ARANDA, A.T. Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública. SIMPÓSIO SOBRE A BIODIVERSIDADE DA MATA ATLÂNTICA, 3., 2014, Santa Teresa, ES. **Anais**. [...]. Santa Teresa, ES: SAMBIO; MBML, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

AUBERTINE, C. L. *et al.* Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 1, p. 227-228, 2006.

BARNETT, J. A., PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

BONGOMIN, F. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of fungi**, Switzerland, v. 3, p. 57, 2017.

BORBA, H.H.L.; STEIMBACH, L.M.; RIVEROS, B.S. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**, 2018.

BOU-CHACRA, N.A.; OHARA, M.T. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 185-194, 2003.

BRASIL. Lei nº 2187, de 16 de fevereiro de 1954. Cria o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 16 fev. 1954.

BRASIL. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **Vigilância em saúde**. Brasília: CONASS, 2011. v. 06, 113 p. (Coleção Para Entender a Gestão do SUS, pt. 2).

BRASIL. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e

Correlatos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**: Poder Executivo, Brasília, 17 dez 1973.

CASADEVALL A.; ROSAS A.L.; NOSANCHUK A.D. Melanin and virulence in Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion Microbiology**, v. 3, p, 354 -358, 2000.

CANHOS, V-P.; UMINO, C.Y.; MANFIO, G.P. **Resumo**: coleções de culturas de microrganismos. São Paulo: FAPESP; CRIA, 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Fungal diseases** 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/index.html>. Acesso em: 11 nov. 2019.

CHAVES NETO, J. R. *et al.* Avaliação de diferentes métodos de preservação do fungo *Phoma dimorpha*. **Colloquium Agrariae**, v. 15, n. 4, p. 1-10. 2019.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, p.1-23, 2013.

CONTIN, J.T. *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, p. 19-24, 2011.

COSTA, E.; ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. p. 301.

COSTA, E. A. Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde. São Paulo, **Hucitec, Sociedade Brasileira de Medicamentos**, p. 460, 1999.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C. *et al.* Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

DAY, J.G.; MCLELLAN, M.R. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: **Humana Press**, 1995.

DUARTE, V. **Preservação de culturas bacterianas**. Porto Alegre, RS: UFRGS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/agro/fitossan/fit35/ppreserva.htm>. Acesso em: 27 abr. 2003.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 268-272, 2004.

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

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de Preservação de Fungos Patogênicos. Palestra apresentada no III Congresso Brasileiro de Micologia. **Sociedade Brasileira de Micologia**, v. 63, p. 59-68. 2001.

FILIÚ, W.F.O. *et al.* Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.591-595, 2002.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas**: a integração do Species Analyst e SinBiota. São Paulo: FAPESP, 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Pesquisa e Ensino – Coleções Biológicas**. Disponível em: portal.fiocruz.br/colecoesbiologicas. Acesso em: 19 ago. 2019.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Política de Preservação dos Acervos Científicos e Culturais da Fiocruz**. Rio de Janeiro: Fiocruz/COC, p. 72, 2018.

FREYDIERE, A.M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Medical Mycology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 9-33, 2001.

HOOG, G. S. *et al.* Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). 2000.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKIZ, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

HEITMAN, J. *et al.* **Cryptococcus from human pathogen to model yeast**. 2. ed. Washington: Elsevier, 2011. 620 p.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.

HSUEH, P.R. *et al.* Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan. **Antimicrobial Agents Chemother**; p.512–517, 2005.

IKEDA, R. *et al.* Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to anti-fungals, **Microbiology Immunology**, v 47, p. 271-277, 2003.

IKEDA, R. *et al.* Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1214-1218, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária. **Serviços**. Rio de

Janeiro: INCQS, 2019. Disponível em: <http://cfrvs.fiocruz.br/index?services>. Acesso em: 08 jan. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.035**: produção e preservação de fungos por ultracongelamento a -70°C e nitrogênio líquido. Revisão 1. Rio de Janeiro: INCQS, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **PU 3230.025**: VITEK 2 para o uso do cartão de leveduras. Revisão 4. Rio de Janeiro: INCQS, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.1010.008**: fluxo de processos referentes aos núcleos técnicos programáticos do INCQS. Revisão 3. Rio de Janeiro: INCQS, 2018a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.014**: preservação e produção de fungos pelo método de liofilização da CFRVS. Revisão 7. Rio de Janeiro: INCQS, 2018b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.030**: caracterização Morfológica e fisiológica de leveduras. Revisão 2. Rio de Janeiro: INCQS, 2018c.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3230.033**: teste de viabilidade e pureza da produção de fungos de referência. Revisão 4. Rio de Janeiro: INCQS, 2018d.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **PU 3230.015**: liofilizador. Revisão. Rio de Janeiro: INCQS, 2019a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **ESTRUTURA**. Rio de Janeiro: INCQS, 2019b. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=74&Itemid=70. Acesso em: 08 jan. 2020.

KIM, S.K.; EL BISSATI, K.; BEN MAMOUN, C. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. **Microbiology Society**, 2006.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. *Medical mycology in the nineteenth century*. **Mycoses**, v.37, p. 229-233, 1994.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts**: a taxonomic study. 5. ed. New York: ACM Press, p.1661-1662. 2012a.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts**: a taxonomic study. 5. ed. New York: ACM Press, p.107, 2012b.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. New York: ACM Press, p.52. 2012c.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. New York: ACM Press, 2012d.

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). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535–537, 1982.

LACAZ, C.S. *et al.* **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Editora Contexto, 2002.

LUCCHESI, G. A Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. In: SETA, M. H. (org.). **Gestão e vigilância sanitária: modos atuais do pensar e fazer**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.33-47, 2006.

MARTINS-NISHIKAWA, M. *et al.* Prevalence of *Candida dubliniensis* in the BCCM/IHEM. **Biomedical Fungi/Yeasts Culture Collection**, 2002.

MELETIADIS, J. *et al.* Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 7, p. 2722–2727, 2011.

NAKAMURA, Y. *et al.* Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine-bromothymol blue medium. **Mycoses**, v. 31, p. 35-40, 1998.

ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, p.1923–1929, 1994.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, 2005.

PIOVESAN, Márcia Franke. **A Construção política da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**. 2002. 108 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

PORTO, M.Y. Uma revolta popular contra a vacinação. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 53-54, 2003.

RANDHAWA, H. S. *et al.* Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. **Medical Mycology**, Abingdon, v. 44, n. 7, p. 623-630, 2006.

REISS, E.; MORRISON, C.J. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, p. 311-23, 1993.

REOLON, A.; PEREZ, R.L.L.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p. 293-8, 2004.

ROMEIRO. **Preservação de Culturas de Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. p. 11.

SALAS, S.D. *et al.* Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Experimental Medicine**, v.184, p. 377-386, 1996.

SHAO, L.C., SHENG, C.Q.; ZHANG, W.N. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. **Yao Xue Xue Bao**, v.42, p.1129–1136, 2007.

SILVA, R.F. **Prevalência de *Candida* spp. na Cavidade Bucal de Pacientes Submetidos a Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoiéticas**. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

SULLIVAN S.; COLEMAN D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, p,36, 1998.

SU, S.C. *et al.* Temperature variations in upright mechanical freezers. **Cancer Epidemiologic Biomarkers**, Philadelphia, v. 5, n. 2, p.139-140, 1996.

TEIXEIRA, C.; GEMAL, A. **INCQS: uma história de qualidade 1981 – 2016**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2016.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action, **Infection and Immunity**. v.63, p.3131-3136, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, London, v.60/61, p.481-492, 2000.

YAMAMURA, A.A.M. *et al.* Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, p.793-804, 2013.

**APÊNDICE A – INFORMAÇÕES DA ORIGEM E ISOLAMENTO DE 104 CEPAS
DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. CEDIDAS PELO FIOCRUZ/INI**

Número	Origem	Espécime	Procedência	Data da Coleta	Data do Isolamento
RR2601	Ambiental	Fezes de pombo	Boa Vista	16/01/1997	06/03/1997
RR2602	-	-	-	-	-
RR2603	-	-	-	-	-
RR2604	-	-	-	-	-
RR2605	-	-	-	-	-
RR2606	-	-	-	-	-
RR2607	-	-	-	-	-
RR2608	-	-	-	-	-
RR2609	-	-	-	-	-
RR2611	-	-	-	-	-
RR2612	-	-	-	-	-
RR2613	-	-	-	-	-
RR2614	-	-	-	-	-
RR2701	Paciente HIV-	LCR	Boa Vista	03/04/1997	03/04/1997
RR2702	Paciente HIV-	LCR	Boa Vista	03/04/1997	03/04/1997
RR2703	Paciente HIV-	LCR	Boa Vista	03/04/1997	03/04/1997
RR2704	Paciente HIV-	LCR	Boa Vista	03/04/1997	03/04/1997
MY1	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999
MY2	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999

MY3	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999
MY4	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999
MY5	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999
MY6	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999
MY7	Ambiental	Poeira doméstica	Boa Vista	14/02/1998	09/03/1999
14Bv1	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenathera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	16/03/1999
14Bv2	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenathera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	16/03/1999
14Bv3	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenathera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	16/03/1999
14Bv4	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenathera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	16/03/1999
40Bv1	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv2	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv3	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv4	Ambiental	Oco de árvore	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999

		<i>Erythrina velutina</i>			
40Bv5	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv6	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv7	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv8	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv9	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv10	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	22/03/1999
40Bv15	-	-	-	-	-
228RR	Paciente HIV -	LCR	Boa Vista	10/05/1999	21/05/1999
119Bv1	Ambiental	Oco de árvore <i>Syzygium jambolanum</i>	Boa Vista	22/10/1998	25/05/1999
119Bv2	Ambiental	Oco de árvore <i>Syzygium jambolanum</i>	Boa Vista	22/10/1998	25/05/1999
119Bv3	Ambiental	Oco de árvore <i>Syzygium jambolanum</i>	Boa Vista	22/10/1998	25/05/1999

381RR	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	29/08/2000	29/08/2000
14Bv5	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv6	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv7	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv8	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv9	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv10	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv11	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv12	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv13	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv14	Ambiental	Oco de árvore	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000

		<i>Adenanthera pavonina</i>			
14Bv15	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv16	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv17	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv18	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv19	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
14Bv20	Ambiental	Oco de árvore <i>Adenanthera pavonina</i>	Boa Vista	25/10/1998	09/09/2000
40Bv16	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv24	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv33	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv34	Ambiental	Oco de árvore	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000

		<i>Erythrina velutina</i>			
40Bv35	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv36	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv37	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv38	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv39	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv40	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv43	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv44	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv45	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv46	Ambiental	Oco de árvore	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000

		<i>Erythrina velutina</i>			
40Bv47	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv48	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv49	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv50	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv51	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv52	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv53	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv54	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv55	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv56	Ambiental	Oco de árvore	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000

		<i>Erythrina velutina</i>			
40Bv57	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv58	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv62	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv63	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv64	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv65	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv66	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
40Bv86	Ambiental	Oco de árvore <i>Erythrina velutina</i>	Boa Vista	26/10/1998	09/09/2000
199Bv4	Ambiental	Oco de árvore <i>Syzygium jambolanum</i>	Boa Vista	22/10/1998	09/09/2000
199Bv5	Ambiental	Oco de árvore	Boa Vista	22/10/1998	09/09/2000

		<i>Syzygium jambolanum</i>			
199Bv6	Ambiental	Oco de árvore <i>Syzygium jambolanum</i>	Boa Vista	22/10/1998	09/09/2000
GBRR1	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	11/12/2000	16/01/2001
GBRR2	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	11/12/2000	16/01/2001
GBRR3	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	11/12/2000	16/01/2001
GBRR4	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	11/12/2000	16/01/2001
GB2RR1	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	01/02/2001	01/02/2001
GB2RR2	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	01/02/2001	01/02/2001
GB2RR3	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	01/02/2001	01/02/2001
GB2RR4	Paciente HIV+	LCR	Boa Vista	01/02/2001	01/02/2001
FSFRR	Paciente HIV-	LCR	Mucajaí	17/04/2001	15/05/2001

Legenda: -, informação indisponível; HIV-, não portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV); HIV+, portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV); LCR, líquido cefalorraquidiano.

**APÊNDICE B – INFORMAÇÕES DA ORIGEM E ISOLAMENTO DE 32 CEPAS DE
CANDIDA SPP.**

Número	Origem	Espécime	Procedência	Data do Isolamento
2024	-	-	Montevideo	Dezembro/1945
1890	Clínico	Língua	-	Abril/1945
1287	-	-	Buenos Aires	1929
2091	Clínico	Escarro	-	1946
2563	-	-	Montevideo	Maió/1948
2180	-	-	Buenos Aires	Março/1947
2397	-	-	Buenos Aires	Março/1947
2164	-	-	Buenos Aires	Março/1947
2603	-	-	Estados Unidos	Junho/1948
2567	-	-	-	Maió/1948
2165	-	-	Buenos Aires	Março/1947
2227	-	-	Buenos Aires	Abril/1947
2740	Clínico	Escarro	-	Junho/1949
2632	Clínico	Escarro	-	Agosto/1948
2997	-	-	-	Outubro/1951
2907	-	-	-	Setembro/1950
3387	Clínico	Escarro	Brasil	Julho/1957
3338	-	-	Portugal	Outubro/1957

3386	Clínico	Escarro	-	Novembro/1957
3109	-	-	Paraguai	Setembro/1953
2874	Clínico	Pele	Brasil	Setembro/1950
2875	Clínico	Pele	Brasil	Setembro/1950
4525	-	-	-	Setembro/2007
4558	-	-	Brasil	Dezembro/2008
4556	-	-	Brasil	Dezembro/2008
3780	-	-	França	Julho/1985
3691	-	-	França	Junho/1982
3693	-	-	Londres	Julho/1982
3604	-	-	Brasil	Julho/1965
3694	-	-	Londres	Julho/1982
3692	-	-	França	Junho/1986
3781	-	-	França	-

-, informação indisponível

APÊNDICE C – PERFIL DE FILAMENTAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CLAMIDÓSPORO EM 73 CEPAS DE *CANDIDA* SPP. CARACTERIZADAS PELATÉCNICA DE MICROCULTIVO EM LÂMINA.

Cepa	Filamentação	Clamidósporo
579	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
778	Característica de <i>Candida parapsilosis</i>	Ausente
1057	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
1535	Não foi possível determinar	Presente
1470	Sem crescimento	Sem crescimento
1890	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2024	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2091	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2227	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2397	Não foi possível determinar	Ausente
2567	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2603	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2608	Não foi possível determinar	Ausente
2692	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2740	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2874	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2875	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2907	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2997	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2937	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
3109	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
3386	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
3387	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
3692	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
4525	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
4558	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3780	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2332	Não foi possível determinar	Presente
2563	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente

3691	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2181	Não foi possível determinar	Ausente
2164	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2632	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
3338	Não foi possível determinar	Ausente
3781	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
3694	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
1494	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
3514	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
295	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
4556	Não foi possível determinar	Ausente
3604	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2165	Não foi possível determinar	Presente
2180	Não foi possível determinar	Ausente
3693	Característica de <i>Candida albicans</i>	Presente
2065	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
3401	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3012	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3589	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3585	Característica de <i>Candida guilliermondii</i>	Ausente
3610	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3249	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3592	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
3524	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
4557	Característica de <i>Candida guilliermondii</i>	Ausente
4559	Não foi possível determinar	Ausente
2804	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
4560	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
2936	Não foi possível determinar	Ausente
2396	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2570	Não foi possível determinar	Ausente
2892	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente
2781	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente

2889	Não foi possível determinar	Ausente
2566	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2343	Característica de <i>Candida albicans</i>	Ausente
2688	Não foi possível determinar	Ausente
2510	Não foi possível determinar	Ausente
2033	Não foi possível determinar	Ausente
2392	Não foi possível determinar	Presente
2169	Não foi possível determinar	Ausente
2614	Característica de <i>Candida krusei</i>	Ausente
2691	Característica de <i>Candida krusei</i>	Ausente
1520	Característica de <i>Candida tropicalis</i>	Ausente

**APÊNDICE D – RESULTADOS DA AUTENTICAÇÃO DAS CEPAS DO GÊNERO
CANDIDA**

Número	Espécie	Dalmeida plate	TG.	LIOF.	Pigmentação CHROMagar	DNA	VITEK2
579	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. parapsilosis/ C.tropicalis</i>
778	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C. parapsilosis</i>
1057	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. albicans</i>
1535	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. parapsilosis</i>
1470	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. albicans/ C.famata</i>
1890	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	-	<i>C. albicans/ C.dublinskiensis</i>
2024	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2091	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C.albicans/ C.famata</i>
2227	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	P	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2397	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2567	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2603	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2608	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C.tropicalis/ C.famata/ C.parapsilosis</i>
2692	<i>C. parakrusei</i>	Ausência de clamidosporo	P	OK	Verde	-	<i>C. albicans</i>
2740	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2874	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2875	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2907	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans/ C.tropicalis/ Stephanoascus ciferri</i>
2997	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
2937	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans/ C. famata /C. tropicalis</i>
3109	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
3386	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. tropicalis /C. parapsilosis</i>
3387	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>

3692	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
4525	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
4558	<i>C. albicans</i>	Ausência de clamidosporo	P	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
3780	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
2332	<i>C.krusei</i> <i>/C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Rosa/verde	-	Slashline
2563	<i>C. albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	OK	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
3691	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	OK	Verde	-	<i>C. albicans</i>
2181	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Roxo	-	<i>C. parapsilosis/</i> <i>C.tropicalis</i>
2164	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
2632	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	OK	Verde	-	<i>C. albicans</i>
3338	<i>C.albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
3781	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
3694	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	OK	<i>C. albicans</i>
1494	<i>C.albicans</i>	Ausência de clamidosporo	P	-	Verde	-	<i>C.albicans/</i> <i>C.dublinsiensis</i>
3514	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
295	<i>C.albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	OK	Verde	-	<i>C. albicans</i>
4556	<i>C.albicans</i>	Ausência de clamidosporo	P	OK	Verde	-	<i>C. albicans</i>
3604	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	-	<i>C. albicans</i>
2165	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	A	OK	Rosa	-	<i>C. haemulonii/</i> <i>C.parapsilosis</i>
2180	<i>C.albicans</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C. pelliculosa</i>
3693	<i>C.albicans</i>	Presença de Clamidosporo	P	-	Verde	-	Não identificou
2065	<i>C.albicans</i>	Ausência de clamidosporo	P	OK	Verde	-	<i>C. dubliniensis</i>
3401	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Verde	-	<i>C. tropicalis</i>
3012	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C.tropicalis</i>
3589	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C.tropicalis</i>
3585	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C.parapsilosis</i>
3610	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
3249	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
3592	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>

3524	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
4557	<i>C. guilliermondii</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Branca	-	<i>C. guilliermondii</i>
4559	<i>C. krusei</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Branca	-	<i>C. famata/ C. guilliermondii</i>
2804	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
4560	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
2936	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Branca	-	<i>C. parapsilosis</i>
2396	<i>C. krusei</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	OK	<i>C. albicans</i>
2570	<i>C. krusei</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C. parapsilosis</i>
2892	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
2781	<i>Candida sp</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Branca	-	<i>C.famata/ C.parapsilosis/ C.tropicalis</i>
2889	<i>C. guilliermondii</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Branca	-	<i>C.parapsilosis</i>
2566	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. albicans</i>
2343	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. tropicalis</i>
2688	<i>C. krusei</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C.parapsilosis</i>
2510	<i>Monilia bonorderi</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C.famata/ C.parapsilosis</i>
2033	<i>C. tropicalis</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C.famata/ C.parapsilosis</i>
2392	<i>Candida sp</i>	Presença de Clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C. parapsilosis</i>
2169	<i>C. guilliermondii</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C.famata /C.guilliermondii</i>
2614	<i>C. parakrusei</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C.famata/ C.parapsilosis</i>
2691	<i>C. parakrusei</i>	Ausência de clamidosporo	A	-	Rosa	-	<i>C. parapsilosis</i>
1520	?	Ausência de clamidosporo	A	-	Azul	-	<i>C.tropicalis</i>

-, informação indisponível; TG, tubo germinativo; A, ausência; P, presença; LIOF., liofilização.

**APÊNDICE E – CEPAS LIOFILIZADAS PARA INTEGRAR O ACERVO DA
CFRVS**

Número	Autenticação final	Ampolas produzidas
2692	<i>Candida albicans</i>	11
2563	<i>Candida albicans</i>	11
3691	<i>Candida albicans</i>	11
295	<i>Candida albicans</i>	11
4556	<i>Candida albicans</i>	11
2065	<i>Candida albicans</i>	11
2632	<i>Candida albicans</i>	11