SARAH DESIRÉE BARBOSA CAVALCANTI

**Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de
fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Dra. Gilda M. Barbaro Del Negro

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cavalcanti, Sarah Desirée Barbosa

Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo / Sarah Desirée Barbosa Cavalcanti. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1.Fungos 2.Coleção de culturas 3.Preservação biológica/métodos 4.Taxonomia 5.Sequência de DNA 6.Fenótipo

USP/FM/DBD-521/10

*À minha querida Tia Yêda, seu amor pela
família é incontestável, exemplo de força e
dedicação, grande incentivadora.*

*À minha filha Larissa Desirée minha fonte de
segurança e inspiração*

Agradecimentos

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, agradeço pela amizade e orientação, pelo exemplo a ser seguido, seu estímulo, apoio e questionamentos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À querida amiga Mônica Scarpelli Martinelli Vidal pelo carinho, amizade e incentivo, bem como pelo apoio no processo de reforma da micoteca e na execução desta dissertação.

À Natalina Takahashi Melo agradeço pelo apoio e consultoria em todo o processo de reestruturação da nossa coleção de culturas.

Ao meu companheiro Luis Augusto agradeço pela compreensão e incentivo.

As colegas Sônia Cristina Cavalcante e Aliete Pavoni Begnini que trabalharam intensamente, mesmo nos momentos que estive ausente.

À Roseli Santos Freitas pela colaboração e orientação nas identificações dos isolados deste estudo.

Ao Prof. Dr. Gil Benard e Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, agradeço por fazerem parte da equipe do Laboratório de Micologia (LIM-53), permitindo que possamos desempenhar nosso papel no meio da pesquisa científica.

À nova geração do Laboratório Cleison Taira, Glória Sousa, Dulce Figueiredo, Edna Muricy e Antonio Marques, agradeço pelo apoio sincero, amizade e incentivo no andamento do trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Micologia Médica, Cecília Eugênia Charbel, Antônia das Chagas Santos, Judith Maria de Jesus pelo apoio e incentivo demonstrados.

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Um agradecimento especial à minha mãe e irmãos que mesmo distantes incentivam e compartilham os grandes momentos da minha vida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos destinados a execução deste trabalho.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Isolados	12
3.2. Análise morfológica dos fungos dimórficos e filamentosos	12
3.3. Análise morfológica e bioquímica das leveduras	13
3.4. Análise do dimorfismo térmico	15
3.5. Preservação dos isolados de fungos dimórficos e filamentosos em água destilada esterilizada	15
3.6. Preservação dos isolados de fungos dimórficos e filamentosos em nitrogênio líquido	15
3.7. Preservação das leveduras por liofilização	16
3.8. Preservação das leveduras por congelamento -80° C	16
3.9. Estudo da viabilidade dos isolados	17
3.10. Preparação das células para extração de DNA, dos isolados de fungos dimórficos, filamentosos e leveduras	17
3.11. Extração e purificação das amostras de DNA	18
3.12. Determinação da concentração de DNA	18
3.13. Amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD)	19
3.14. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento automatizado	20
3.15. Análise dos fungos agentes de dermatofitoses	22
4. RESULTADOS	23

4.1. Fungos dimórficos: análise das características morfológicas, dimorfismo térmico, viabilidade após preservação em água e em nitrogênio líquido, e identificação molecular	23
4.2. Fungos filamentosos: análise das características morfológicas, viabilidade após preservação em água e em nitrogênio líquido, e identificação molecular	27
4.3. Leveduras: análise dos aspectos morfológicos, bioquímicos, RAPD, viabilidade após preservação por liofilização e congelamento e identificação molecular	29
4.4. Resultados das reações de sequenciamento	34
4.5 Análise dos agentes de dermatofitoses	35
5. DISCUSSÃO	36
5.1 Fungos dimórficos	38
5.2 Fungos filamentosos	42
5.3 Leveduras	44
6.0 CONCLUSÕES	48
7.0 ANEXOS	49
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

Cavalcanti SDB. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010. 61p.

A coleção de fungos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP compreende 1047 isolados de fungos, algas e actinomicetos de interesse médico e veterinário, que até o início deste estudo eram mantidos sob repiques sucessivos a cada três meses. Criada em 1925 pelo Prof. Dr. Floriano Paulo de Almeida e, a partir de 1953, mantida pelo Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, a coleção necessitava de adequação de seu espaço físico e atualização nos métodos de preservação dos isolados. A reforma física foi realizada de acordo com as normas de biossegurança recomendadas pelo manual de procedimentos para manipulação de patógenos. Diversos estudos têm demonstrado que repiques sucessivos propiciam alterações nas características morfológicas, antigênicas, genéticas e de virulência de isolados fúngicos. Deste modo, foram aplicadas metodologias de preservação de longo prazo, como: liofilização, água destilada esterilizada, congelamento a -80°C e em nitrogênio líquido (-196°C). Foram selecionados 386 isolados, entre fungos dimórficos (213), filamentosos (hialinos e melanizados - 106) e leveduras (67), relacionados às infecções fúngicas mais prevalentes em nosso meio. Foram utilizados dois métodos de preservação para cada grupo de fungos: as leveduras foram submetidas à liofilização e congelamento em freezer -80°C ; e os fungos dimórficos e filamentosos preservados em água destilada esterilizada e no vapor de nitrogênio líquido. Esses isolados foram inicialmente avaliados quanto à

caracterização morfológica e, após aplicação dos métodos de preservação, avaliou-se a viabilidade dos mesmos dentro de um período de dois anos, bem como a morfologia. As leveduras apresentaram 100% de viabilidade pelos dois métodos de preservação, mantendo suas características fenotípicas. Do mesmo modo, os dois métodos aplicados aos fungos filamentosos resultaram em elevados índices de viabilidade, com manutenção das características morfológicas. Em relação aos fungos dimórficos, a manutenção em nitrogênio líquido resultou em índices variáveis de viabilidade, dependendo do gênero avaliado. Do total de isolados do estudo, 75 foram submetidos também à identificação molecular por sequenciamento automatizado, após amplificação da região ITS do DNA ribossomal por PCR. A técnica molecular demonstrou, para alguns desses isolados, discordância na identificação das espécies quando comparada aos métodos fenotípicos. Os resultados deste estudo demonstraram que os repiques sucessivos não são recomendados para a preservação de fungos em coleções, por alterarem as características fenotípicas, bem como a capacidade de produzir esporos. As novas metodologias de preservação adotadas mantiveram a morfologia típica dos gêneros e espécies, permitindo ainda a viabilidade da maioria dos isolados estudados. A identificação molecular demonstrou ser importante ferramenta para autenticação dos isolados.

Descritores: fungos , coleção de culturas, preservação biológica/métodos, taxonomia, sequencia de DNA, fenótipo

SUMMARY

Cavalcanti SDB. Application of preservation methods and characterization of fungal isolates from the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo culture collection [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010. 61p.

The fungal culture collection from the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP comprises 1047 isolates of fungi, algae and actinomycetes with medical and veterinary relevance, which up to now have been preserved by subculturing every three months. Created in 1925 by Prof. Floriano Paulo de Almeida and maintained by Prof. Carlos da Silva Lacaz and his assistants since 1953, this fungal collection needed to be reallocated to another area in 2007, as well as updated and revised as to its preservation methods. This new area was reformed according to safety procedures recommended in guidelines for pathogenic microorganisms manipulation. Several studies demonstrated that storage of fungi by subculturing may induce antigenic changes, phenotypic and genetic alterations, in addition to attenuation of virulence. The present study was aimed at utilizing more adequate methods of long-term preservation, such as lyophilization, sterile distilled water, and cryopreservation (freezing at -80°C and storage in liquid nitrogen [-196°C]). Three hundred eight six isolates consisting of dimorphic (213) and filamentous fungi (hyaline and melanized - 106), and yeasts (67) associated with the most prevalent fungal diseases in our setting were randomly selected. Two methods were applied for storage of each fungal group: yeasts were submitted to lyophilization and freezing at -80°C ; dimorphic and filamentous fungi were preserved in sterile distilled water and liquid nitrogen. All isolates were initially evaluated for their morphological features, submitted to the

different methods of storage, and during a period of up to two years, reassessed for viability and morphological features. Yeasts showed 100% viability by the two applied preservation methods, maintaining their phenotypic characteristics. Similarly, the two methods applied to filamentous fungi resulted in high rates of viability, with maintenance of morphology. Regarding the dimorphic fungi, the preservation in liquid nitrogen resulted in variable rates of recovery, depending on the genus assessed. From all studied isolates, 75 were also submitted to molecular identification by sequencing after PCR amplification of the ITS region of the ribosomal DNA. This molecular technique showed, for some isolates, a lack of agreement in species identification when compared with the phenotypic methods. The new long-term storage methods used in the study preserved the typical genus and species morphology of the studied isolates, while resulting in high viability rates. The molecular identification proved to be an important tool for the authentication of isolates.

Descriptors: fungi, culture collections, biological preservation/methods, taxonomy, DNA sequence, phenotypic

1. INTRODUÇÃO

Coleções de culturas microbianas são centros de conservação *ex situ* da biodiversidade e são encarregadas de coletar e disponibilizar organismos relevantes para a pesquisa científica, particularmente estudos taxonômicos e epidemiológicos, bem como aplicações tecnológicas e atividades de ensino. Para tanto, a preservação e a manutenção das culturas devem ser realizadas de forma a garantir a sobrevivência do micro-organismo, bem como a conservação das propriedades morfológicas, fisiológicas, características genéticas e a pureza dos isolados durante períodos prolongados (Abreu e Tutunji, 2005; Canhos et al., 2007).

Técnicas e procedimentos apropriados para a operação e o gerenciamento das coleções de culturas, que estejam de acordo com a legislação, regulamentos e políticas nacionais, devem ser adotados. Atendendo a tais critérios, os micro-organismos dessas coleções poderão ser utilizados como referência no desenvolvimento de pesquisas científicas e tecnológicas (Sette et al., 2007).

No início do século XX, surgiram as primeiras coleções de culturas microbianas internacionais. Inicialmente eram mantidas por repicagens periódicas e constantes, acarretando perda da viabilidade, alterações fisiológicas, de aspecto e coloração, perda da capacidade de esporulação e declínio da patogenicidade. Estes fatores levaram à busca do desenvolvimento de outros métodos, menos dependentes do trabalho

humano, com o objetivo de manter a viabilidade e menor variação das culturas (Figueiredo, 2001).

As metodologias mais adequadas para a preservação dos micro-organismos por períodos prolongados baseiam-se na redução do metabolismo até um nível de dormência artificial; no entanto, a escolha do método deve levar em consideração a estabilidade genética, a manutenção dos caracteres morfológicos, metabólicos, antigênicos, de patogenicidade e virulência, além da viabilidade das culturas (Smith, 2003; Lima et al., 2004).

Os métodos usualmente empregados para a manutenção de micro-organismos são o uso de óleo mineral, água destilada esterilizada, baixas temperaturas (congelamento à -80°C e nitrogênio líquido) e liofilização (Figueiredo, 2001; Canhos, 2003; Nakasone et al., 2004), sendo que as diretrizes dos manuais elaborados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) recomendam que, para leveduras e fungos filamentosos, um dos métodos selecionados para a preservação seja preferencialmente criopreservação ou liofilização, pois garantem a viabilidade por períodos prolongados, além de minimizar os riscos de contaminação, e de alterações fenotípicas e genéticas (Sette et al., 2007; OECD, 2007).

A grande diversidade genética do Reino Fungi torna relevante a conservação de culturas fúngicas (micotecas) desde há muitos anos. Várias coleções de culturas de referência internacional são mantidas em diversos países, entre as quais se destacam o *International Mycological Institute* (IMI) na Inglaterra; a coleção de leveduras, fungos filamentosos e

dimórficos da *American Type Culture Collection* (ATCC) nos EUA; o *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) na Holanda; a *Mycothèque de L'Université Catholique de Luvaïm* (MUCL) na Bélgica, entre outras (Uruburu, 2003).

No Brasil, existem algumas coleções em institutos de pesquisa e em algumas universidades, sendo que provavelmente uma das mais expressivas em fungos de interesse médico, seja a do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com mais de 2.300 espécies de fungos caracterizadas (<http://www.inpa.gov.br>). Além desta, a coleção de culturas de fungos filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no Rio de Janeiro, representa uma das mais antigas coleções do país; criada em 1922, com o objetivo de preservar isolados de interesse médico, esta coleção também representa uma importante fonte de recursos biológicos que contribuem para o desenvolvimento da pesquisa científica (<http://ccff.fiocruz.br>).

Dentre as importantes coleções do país, podemos destacar a Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e Indústria (CBMAI), sediada em Paulínia, no Estado de São Paulo, que reúne em seu acervo, linhagens microbianas de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A coleção foi criada em 2002, e tem como missão atuar como um “Centro de Recursos Biológicos” (CRB) dedicado à preservação, armazenamento e distribuição de micro-organismos, para aplicação nos setores científicos, industriais, de agronegócios, ambiente e saúde (Canhos et al., 2009).

Em 1998, a OCDE criou um grupo de trabalho, com participação de representantes da comunidade científica de diversos países, a fim de se

discutir os desafios e as oportunidades associadas ao estabelecimento de uma rede global de CRBs (Canhos, 2003). Em 2001, foram elaborados manuais de boas práticas para esses centros, com o intuito de melhorar a qualidade no manuseio das coleções. Em 2007, um novo documento foi divulgado, contendo uma série de recomendações, particularmente relacionadas à implementação e revisão dos manuais de boas práticas, além das orientações propriamente ditas sobre aspectos da qualidade, biossegurança e preservação das culturas (OECD, 2007).

A criação de Centros de Recursos Biológicos no Brasil possibilita a interligação de instituições que mantêm coleções microbianas relevantes, além de garantir que o país possa oferecer material biológico confiável e de qualidade. Estes centros devem estar bem estruturados para o depósito de materiais de patente e manutenção da biodiversidade, com o comprometimento de preservar e conservar esta diversidade dentro do território nacional, evitando o envio de material para coleções do exterior (Canhos, 2003; Sette et al., 2007).

Os avanços científicos nas áreas da genômica e da prospecção de biodiversidade estão gerando informações, que devem ser preservadas juntamente com o material biológico. Com este fim, a União Européia instituiu em 1999, a “Rede Européia de Centros de Recursos Biológicos”, que tem como missão facilitar e ampliar a oferta de produtos biológicos de qualidade para a comunidade científica e para a indústria, através do Sistema de Informação de Acesso a Recursos Biológicos (*Common Access to Biological Resources and Information* - Cabri), integrando as principais

coleções *ex situ* de micro-organismos e células. A rede adota os padrões e protocolos recomendados pela *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF – www.gbif.org), que permite o cruzamento dos dados de sequências de DNA, bibliotecas genômicas, *microarrays*, composição de proteínas, entre outros, obtidos das análises dos micro-organismos (Canhos, 2003).

Com a finalidade de catalogar e integrar os dados dos acervos existentes em coleções nacionais, o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) está apoiando o desenvolvimento do Sistema de Informação para Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol), que reúne informações de 17 coleções de cultura do país, em um sistema de informação *on-line* (Canhos, 2003). Além disso, a Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) vem desempenhando um papel importante na discussão sobre a implementação dos CRBs, elaborando documentos e organizando reuniões com o objetivo de avaliar as diretrizes da OCDE - *Best Practices Guidelines for Biological Resource Centres* e OCDE - *Best Practices Guidelines for Biosecurity for BRCs* (Canhos et al., 2009).

A micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (IMTSP/USP) é composta por 1043 isolados de fungos, algas e actinomicetos de interesse médico e veterinário, divididos em 160 gêneros e mais de 300 espécies. Foi implantada em 1925, pelo Professor Floriano Paulo de Almeida, no então Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, e vem sendo mantida desde 1953, pelo Laboratório de Micologia Médica, quando

o Professor Carlos da Silva Lacaz assumiu a cátedra no mesmo Departamento. Desde então, esta coleção vem fornecendo regularmente isolados fúngicos para diversas instituições no Brasil e outros países da América do Sul, e está atualmente cadastrada no SICol (registro nº 21) e no catálogo da Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC – Registro nº 718).

Alguns métodos têm sido utilizados para a manutenção desses isolados, tais como: repiques periódicos em meios sólidos, com ou sem a proteção de óleo mineral, liofilização e água destilada esterilizada. No entanto, o método de repiques sucessivos tem sido empregado para a maior parte da coleção, mas apresenta limitações, entre as quais, a possibilidade de contaminação por fungos anemófilos, bactérias e ácaros, e a desidratação natural dos meios de cultura, podendo acarretar alterações fenotípicas e perda das amostras. Poucos são os isolados da coleção preservados em água destilada esterilizada e/ou liofilizados.

Em estudo realizado anteriormente na micoteca do IMTSP, observou-se que, para os fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, os repiques sucessivos ao longo dos anos causaram alterações fenotípicas, entre as quais a perda da capacidade de reversão da fase miceliana para leveduriforme (dimorfismo térmico), bem como na produção de estruturas de conidiogênese. Entretanto, esses isolados mantidos por repiques foram comparados aos mesmos isolados que estavam mantidos liofilizados desde 1970, pelo perfil genotípico, empregando-se a técnica de RAPD (amplificação aleatória do DNA

polimórfico). Os resultados mostraram diferenças no perfil de bandas, indicando que aqueles isolados mantidos por repiques, possivelmente foram substituídos por outros diferentes ao longo dos anos, apesar das informações contidas nas fichas catalográficas da coleção não terem sido alteradas (Dantas et al., 2006). Ainda neste estudo, análises de alguns isolados de leveduras dos gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., que estavam mantidos liofilizados por aproximadamente 30 anos, demonstraram que o método de liofilização foi capaz de preservar as características micromorfológicas e manter as leveduras viáveis, enquanto os repiques sucessivos causaram alterações fenotípicas. Quando o perfil de bandas foi comparado entre os isolados liofilizados e mantidos sob repiques, foram observadas diferenças significativas, indicando que alterações genotípicas também ocorreram nesses isolados ao longo dos anos (Dantas et al., 2006; Cavalcante et al., 2007).

Estes estudos indicaram, portanto, a necessidade de se estabelecer uma rotina para monitoramento das culturas da coleção, pela aplicação de metodologias de preservação adequadas para cada grupo de fungos, visando à viabilidade por períodos prolongados e a manutenção das características fenotípicas e genotípicas.

Entre as principais recomendações citadas nos manuais de boas práticas para as CRBs estão: a adequação da estrutura física e dos equipamentos utilizados para a preservação das culturas; utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) no manuseio dos micro-organismos; adoção de procedimentos operacionais padrão (POP) no

preparo de reagentes e meios de cultura; fluxograma de recepção e manuseio dos isolados; emprego de métodos de preservação a longo prazo, considerando-se que estes devam garantir viabilidade elevada e recuperação da cultura preservada; monitoramento para prevenir contaminação e garantir a autenticidade da cultura, através de análise fenotípica e genotípica; e validação dos procedimentos para garantir confiabilidade e reprodutibilidade dos métodos. No capítulo relativo especificamente à preservação de fungos, o manual recomenda a utilização de pelo menos dois métodos para cada grupo, sendo um deles obrigatoriamente a liofilização ou a conservação em nitrogênio líquido, uma vez que para a maioria dos micro-organismos, estes são os melhores métodos para a manutenção da estabilidade genética (OECD, 2007).

O método de liofilização tem sido aplicado para leveduras e fungos filamentosos, com bons resultados de recuperação das culturas; diversos autores relatam a eficiência do método, que é capaz de preservar as características fenotípicas e genotípicas dos micro-organismos por períodos prolongados (McGinnis et al., 1974; Qiangqiang et al., 1998; Cavalcante et al., 2007). Entretanto, há relatos demonstrando que mudanças nas características morfológicas após o processo de liofilização, ou mesmo a inviabilidade do fungo durante o processo de congelamento que antecede a liofilização, podem ocorrer (Figueiredo, 2001; Paoli, 2005; Voyron et al., 2009).

A criopreservação em nitrogênio líquido parece ser o método mais eficiente para a manutenção dos micro-organismos; entretanto devem ser

utilizadas substâncias crioprotetoras, como o glicerol ou dimetilsulfóxido, pois a temperatura de manutenção é de aproximadamente -139°C , e o processo de congelamento deve ser lento para evitar a formação de cristais de gelo, que podem afetar as células e diminuir a viabilidade. Todos os fungos podem ser mantidos por este método, mas como o custo de manutenção do nitrogênio ainda é relativamente elevado, geralmente é empregado seletivamente para fungos que não esporulam em meios de cultura ou que não sobrevivem a outros métodos de preservação, como a liofilização (Ryan et al. 2000; Nakasone et al., 2004; Paoli, 2005).

Estudos têm demonstrado que isolados submetidos a repiques periódicos e sucessivos, acarretam o aparecimento de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além do elevado risco de contaminação. Deste modo, diversas coleções de culturas têm utilizado metodologias de preservação de longo prazo, mas não há um método universal para todos os tipos de fungos (Butterfield et al., 1974; McGinnis et al., 1974; Qiangqiang et al., 1998; Cavalcante et al., 2007).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas ferramentas de biologia molecular, com aplicação de técnicas para a identificação de micro-organismos, entre as quais, a reação em cadeia da polimerase (PCR), RAPD e RFLP para a detecção de polimorfismos de DNA, sondas específicas e sequenciamentos, tem contribuído para mudanças importantes na pesquisa de fungos patogênicos. Técnicas de diagnóstico molecular mais eficientes, rápidas e sensíveis para detecção de patógenos como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp., têm sido

desenvolvidas para auxiliar os métodos convencionais, bem como nos estudos epidemiológicos e geração de novos agentes anti-fúngicos (San-Blas e Calderone, 2004).

Ainda, as técnicas de biologia molecular, particularmente amplificações das regiões espaçadoras (ITS) do DNA ribossomal, seguidas de sequenciamentos, têm revolucionado a classificação taxonômica dos fungos (White et al. 1990; Guarro et al., 1999; Fujita et al., 2001). Mais recentemente, a taxonomia polifásica, que integra dados de análises fenotípicas e genotípicas para a identificação dos micro-organismos, tem sido aplicadas nos estudos de filogenia e evolução, definindo novos gêneros e espécies (De Hoog et al., 2004; Marimon et al., 2006).

A seleção dos melhores métodos de preservação para as culturas de fungos é necessária tanto para as amostras que são mantidas na coleção, como para aquelas recém-isoladas. Além disso, as informações obtidas pelas avaliações das características macro e micromorfológicas, bioquímicas e genotípicas, devem estar documentadas e disponíveis para utilização em estudos futuros. Ressalte-se a importância em manter uma coleção de fungos de interesse médico, numa instituição reconhecida como a Universidade de São Paulo, adotando-se métodos de preservação e de caracterização, que proporcionem a oferta de isolados fúngicos autenticados à comunidade científica, conforme a proposta do Consenso de Coleções de Culturas da Sociedade Brasileira de Microbiologia (Sette et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Implementar um processo de reestruturação na coleção de culturas de fungos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/USP, adotando as recomendações dos manuais de boas práticas editados por entidades internacionais especializadas em gerenciamento de coleções biológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1** Caracterizar os isolados mantidos por repiques sucessivos na coleção, através da análise dos aspectos macro e micromorfológicos, e por provas bioquímicas
- 2.2.2** Aplicar e avaliar dois métodos de preservação para cada isolado fúngico, através da análise de viabilidade e manutenção das características morfológicas, dentre os seguintes procedimentos: liofilização, manutenção em água destilada esterilizada, e criopreservação a -80°C e em nitrogênio líquido
- 2.2.3** Empregar a técnica da reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos aleatórios (RAPD) para certificação da pureza dos isolados de leveduras
- 2.2.4** Identificar, pelo método molecular de sequenciamento automatizado, um grupo de fungos selecionados aleatoriamente, para finalizar o processo de identificação

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados

Dos fungos da coleção, foram selecionados aleatoriamente 386 isolados de fungos dimórficos, filamentosos (hialinos e melanizados) e leveduras, dentre os seguintes gêneros: *Absidia* spp. (5), *Alternaria* spp. (3), *Aspergillus* spp. (32), *Blastomyces dermatitidis* (36), *Candida* spp. (20), *Cladosporium* spp. (11), *Coccidioides immitis* (17), *Cryptococcus* spp. (20), *Curvularia* spp. (3), *Fonsecaea pedrosoi* (26), *Geotrichum* spp. (14), *Histoplasma capsulatum* (36), *Mucor* spp. (6), *Paecilomyces* spp. (5), *Paracoccidioides brasiliensis* (76), *Paracoccidioides cerebriformis* (10), *Penicillium marneffeii* (2), *Penicillium* spp. (10), *Rhizopus* spp. (3), *Sporothrix schenckii* (36), *Trichoderma* spp. (2), *Trichosporon* spp. (13).

3.2 Análise morfológica dos fungos dimórficos e filamentosos

Os isolados de fungos dimórficos e filamentosos foram inicialmente semeados em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e em ágar batata dextrose (Lacaz et al., 2002); para a identificação micromorfológica dos isolados de *P. brasiliensis*, *P. cerebriformis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *P. marneffeii* foram realizados exames microscópicos diretamente destas culturas.

Para os isolados de *S. schenckii* e do grupo de fungos filamentosos, a identificação das estruturas microscópicas foi realizada a partir de microcultivos, de acordo com o procedimento a seguir: em placas de Petri

contendo lâminas, utilizadas como apoios de blocos de ágar batata dextrose, foram semeados fragmentos da cultura nas extremidades destes blocos, para induzir a produção de estruturas de conidiogênese. Os blocos foram recobertos com lamínulas e, em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por até 15 dias. Para a observação das estruturas ao microscópio, as lamínulas foram retiradas das placas de Petri e colocadas sobre lâminas, contendo uma gota de corante lactofenol - azul de algodão (Sidrim e Moreira, 1999).

Todos os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica classe II e utilização de equipamentos de proteção individual, para prevenir os riscos de contaminação do pessoal de laboratório (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2007).

3.3 Análise morfológica e bioquímica das leveduras

O grupo de leveduras avaliadas no estudo foi composto por: 11 isolados de *Candida albicans*, quatro de *C. tropicalis* e cinco de *C. krusei*; 19 isolados de *Cryptococcus neoformans* e um de *C. laurentii*; e 13 isolados de *Trichosporon* spp..

As leveduras mantidas na coleção foram inicialmente semeadas, por esgotamento, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, para a obtenção de colônias isoladas. Em seguida, cinco destas colônias foram semeadas separadamente em tubos contendo o mesmo meio de cultura, e em cultivos em lâminas com ágar fubá (Lacaz et

al., 2002), para avaliação dos aspectos macroscópicos e micromorfológicos, respectivamente.

Também foram realizadas provas de assimilação, utilizando-se o método convencional com discos de açúcares (glicose, sacarose, lactose, maltose, melibiose, celobiose, arabinose, inositol, galactose, rafinose e trealose (Cefar, Brasil), empregando-se suspensões de leveduras, com turbidez correspondente ao padrão 5 da escala de McFarland (Sidrim e Moreira, 1999).

Para as provas de fermentação, foram inoculados 200µl da suspensão de leveduras (padrão 5 da escala de McFarland) em tubos contendo os açúcares (glicose, maltose, sacarose, lactose, galactose e trealose) e o meio basal. Os tubos foram mantidos à 30°C, e as leituras foram realizadas após 5, 10 e 15 dias de incubação, observando-se a formação de bolhas no interior do tubo de *Durhan* (Sidrim e Moreira, 1999).

Para a identificação das leveduras, o crescimento em meios de cultura específicos também foi empregado: CHROMagar™ *Candida* (BD, France) para *Candida* spp., meio CGB (canavanina/ glicina/ azul de bromotimol) e urease para *Cryptococcus* spp. (Lacaz et al., 2002). Para as leveduras do gênero *Trichosporon* também foi analisado o crescimento nos meios de ágar extrato de levedura/malte (Lacaz et al., 2002) e ágar Mycosel™ (BD, France), com incubação à 30°C e 37°C (De Hoog et al., 2000).

3.4 Análise do dimorfismo térmico

Os isolados de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *S. schenckii* foram semeados em meios enriquecidos (ágar Fava-Neto, ágar BHI sangue e ágar BHI, respectivamente) e incubados à 37°C, para a reversão da fase filamentosa para leveduriforme (Lacaz et al., 2002). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Preservação dos isolados de fungos dimórficos e filamentosos em água destilada esterilizada

Fragmentos das culturas em ágar batata dextrose foram acondicionados em frascos tipo penicilina, contendo 5 ml de água destilada esterilizada e, após serem vedados com papel tipo *Parafilm*® e identificados adequadamente, foram mantidos à temperatura ambiente (Castellani, 1967).

3.6 Preservação dos isolados de fungos dimórficos e filamentosos em nitrogênio líquido

Com o auxílio de alça de platina, foram retirados vários fragmentos de cada cultura em ágar batata dextrose, e colocados em microtubos de polipropileno contendo 1 ml de solução de glicerol a 10% esterilizada. Os tubos foram identificados, refrigerados por 30 minutos, colocados em freezer -20°C por 20 minutos e, em seguida, depositados em duplicata, no *container* de nitrogênio líquido, na fase de vapor (Nakasone et al., 2004).

3.7 Preservação das leveduras por liofilização

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e, após 48 horas, foram transferidas para frascos tipo penicilina contendo 2 ml de solução para liofilização [10% de leite desnatado (Molico) e 5% de glutamato monossódico (Ajinomoto)]. Inicialmente os frascos foram mantidos à -20°C por 20 minutos, depois à -80°C por uma noite e, em seguida, submetidos à liofilização no equipamento E-C Modulyo (Edwards, USA). O procedimento de liofilização foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os frascos foram vedados com *Parafilm®* e mantidos à temperatura ambiente, em estantes devidamente identificadas (Lacaz et al., 2002).

3.8 Preservação das leveduras por congelamento à - 80°C

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas à 30°C, pelo período de 24-48 horas; em seguida, com auxílio de alça descartável, foram semeadas em tubos criogênicos contendo 500 µl de caldo BHI (Merck, Germany) acrescido de miçangas, incubadas por 24-48 horas à 30°C. Após crescimento, foram adicionados 500 µl de solução de glicerol a 20%, os tubos foram identificados em duplicata; em seguida, foram refrigerados por 20 minutos em geladeira, congelados à -20°C por 20 minutos, seguindo-se o congelamento à -80°C (Nery et al., 2001).

3.9 Estudo da viabilidade dos isolados

Após preservação dos isolados pelos métodos acima descritos, os mesmos foram submetidos aos testes de viabilidade. Com auxílio de ponteira “cortada” (para retirar os fragmentos das culturas que estavam preservadas em água e em nitrogênio líquido), foram semeados 100 µl em ágar batata dextrose (Acumedia, USA) para os fungos dimórficos e filamentosos, e em ágar Sabouraud dextrose (Difco, USA) acrescido de cloranfenicol, para as leveduras.

Para a avaliação da viabilidade, o tempo de permanência dos isolados nas condições de preservação variou de um a 28 meses.

3.10 Preparação das células para extração de DNA, dos isolados de fungos dimórficos, filamentosos e leveduras

Os isolados foram semeados em 10 ml de caldo Sabouraud dextrose ou caldo BHI, contidos em tubos tipo Falcon de 50 ml, e mantidos sob agitação constante (30 rpm) à temperatura ambiente, por 48 horas. As células fúngicas foram coletadas e lavadas em água ultra pura e, em seguida, centrifugadas para obtenção do *pellet*. Aos tubos contendo os *pellets*, foram adicionados 600 µl de solução tampão sorbitol (1 M sorbitol, 100 mM de EDTA, 14 mM de β-mercaptoetanol) e a suspensão homogeneizada em agitador tipo vórtex (Fanem, Brasil). Para os fungos dimórficos e filamentosos, foram adicionados 3 mg de *lysing enzyme* (L-1412, Sigma, USA) e os tubos foram incubados à 37°C por um período de três horas; para as leveduras, foram adicionadas 200 U de *lyticase* (L-4025, Sigma) e a incubação ocorreu à 30°C por 30 minutos. Os tubos foram

então centrifugados a 7500 rpm em centrífuga modelo 5804R (Eppendorf, Germany) à temperatura ambiente, por cinco minutos (Sambrook et al., 1989). O precipitado foi ressuspenso em 180 µl do tampão ATL do *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen, Germany).

3.11 Extração e purificação das amostras de DNA

À solução de ATL contendo as células previamente tratadas, foram adicionados 20 µl da enzima proteinase K na concentração de 20 mg/ml (Sigma, USA), e os tubos foram homogeneizados e incubados à 37°C por uma noite. Em seguida, foram acrescentados à suspensão 4 µl de *RNAseA* a 100 mg/ml (Invitrogen, USA), e após homogeneização, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por dois minutos. As etapas seguintes de extração e purificação foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen). As amostras de DNA foram eluídas em 100 µl de água ultra pura esterilizada, e mantidas à -20°C até o momento do uso.

3.12 Determinação da concentração de DNA

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo, USA), com medidas de absorbância em comprimentos de onda de 260nm e 280nm, para se verificar a possível presença de proteínas e estimar a pureza do material extraído (razão entre as leituras DO260/DO280) (Sambrook et al., 1989).

3.13 Amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD)

A reação de RAPD foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 100 ng do DNA extraído das leveduras, 10 µM do *primer* OPG10 (5'-AGGGCCGTCT-3') ou *primer* PII (5'-CCCGTCAGCA-3'); 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP - Invitrogen), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1X PCR *buffer* (KCl 30 mM, TRIS 10 mM, pH 8,3) e 3,5 mM de MgCl₂. As condições de amplificação para o *primer* OPG10 foram: 40 ciclos de 95°C 1 minuto, 25°C 2 minutos e 72°C 2 minutos, e extensão final de 72°C por 5 minutos. Para as amplificações com o *primer* PII, as condições foram: 45 ciclos de 95°C 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 5 minutos (Cavalcante et al., 2007; Rocha et al., 2008).

3.14 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento automatizado

Para a identificação molecular, foram selecionados aleatoriamente 75 isolados do grupo total, entre fungos dimórficos, filamentosos e leveduras. As amplificações por PCR foram realizadas com pares de *primers* das regiões 28S e ITS do DNA ribossômico de fungos; para o gênero *Coccidioides* foram empregados *primers* específicos descritos por Umeyama et al. (2006).

Primers	Sequências	Referências
U1 e U2	F: 5' GTGAAATTGAAAGGGAA 3' R: 5' GACTCCTTGGTCCGTTT 3'	Sandhu et al., 1995
P1 e P2	F: 5' TCAATAAGCGGAGGAAAAG 3' R: 5' CTCTGGCTTCACCCTATTC 3'	Sandhu et al., 1997
ITS1 e TS4	F: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' R: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	Fujita et al., 2001
CoiF e CoiR	F: 5' TACGGTGTAATCCCGATACA 3' R: 5' GGTCTGAATGATCTGACGCA-3'	Umeyama et al., 2006

F= forward; R= reverse

As reações foram realizadas com 50 ng do DNA genômico dos fungos, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen), 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1X PCR *buffer* (KCl 30 mM, Tris 10 mM pH 8,3); 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µM de cada *primer*, em volume final de reação de 25 µl. As amplificações com os *primers* U1 e U2 foram realizadas com 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos (Sandhu et al., 1995), em termociclador modelo Px2 (Thermo Electron, UK). As amplificações com os *primers* P1 e P2 foram realizadas com um ciclo de denaturação inicial à 94°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 10 minutos (Sandhu et al., 1997). As amplificações com os *primers* ITS1 e ITS4 foram realizadas com um ciclo de denaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 10 minutos (Fujita et al., 2001).

As reações de amplificação do DNA de *Coccidioides* spp. com *primers* específicos foram realizadas com 1X PCR *buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 10 pmol dos *primers* (CoiF e CoiR) e 2,5 U de *Taq* DNA polymerase, em volume final de 25 µl. As condições de amplificação empregadas foram: um ciclo de denaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos, e extensão final de 72°C por 5 minutos (Umeyama et al., 2006).

Todas as reações de PCR foram realizadas empregando-se controles negativos e positivos, para monitoramento da presença de contaminantes e qualidade das amplificações, respectivamente.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão TAE 1X [40 mM TRIS base (Invitrogen), 40 mM ácido acético glacial (Merck) e 2,0 mM EDTA (Life Technologies, USA), pH 8,0] a 80 V por 40 minutos. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio na concentração final de 10 mg/ml e registrados em equipamento de fotodocumentação (Vilber Lourmat, France).

Os amplificados obtidos com os *primers* ITS1/ITS4 ou P1/P2 foram purificados com *Purelink PCR purification kit* (Invitrogen), e submetidos às reações de sequenciamento com o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standard 3.1* (Applied Biosystems, USA), em sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram alinhadas às aquelas depositadas no *GenBank* por coleções internacionais como ATCC (USA), CBS (The Netherlands) e *Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses* – IFM, Japan), utilizando-se o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

3.15 Análise dos fungos agentes de dermatofitoses

A micoteca do IMTSP mantinha, até o momento deste estudo, 96 isolados dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, dentre os quais 17 estavam preservados em óleo mineral, 73 em água destilada e seis por repiques sucessivos. Os isolados mantidos em água e em óleo, foram semeados em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol em triplicata, para a avaliação da viabilidade. Os fungos viáveis foram, em seguida, semeados em meios de culturas específicos para induzir a conidiogênese, entre os quais o ágar gelose-terra, ágar arroz e ágar batata sacarose (Lacaz et al., 2002). Para observação das estruturas microscópicas, foram realizados microcultivos.

4. RESULTADOS

4.1 Fungos dimórficos: análise das características morfológicas, dimorfismo térmico, viabilidade após preservação em água e em nitrogênio líquido, e identificação molecular

Os resultados das análises do grupo de fungos dimórficos estão resumidos na **Tabela 1 (Anexo A)**.

Dos 76 isolados de *P. brasiliensis* mantidos na coleção do IMTSP, quatro não estavam viáveis nos meios de cultura da micoteca; os 72 restantes apresentaram micélio de crescimento lento e estruturas microscópicas da fase filamentosa compatíveis com o gênero, visualizando-se hifas hialinas delgadas e septadas. Foram então selecionados 46 isolados para a avaliação do dimorfismo térmico, observando-se que 32 reverteram à 37°C; dos 40 isolados que não apresentam reversão de fase, 14 foram submetidos às reações de sequenciamento, e as análises revelaram que todos eram *P. brasiliensis*, com índices de similaridade variando de 99 a 100% com as sequências disponíveis no *GenBank*. Os 26 isolados restantes serão submetidos às análises moleculares posteriormente.

Quanto à viabilidade do *P. brasiliensis*, após sete e 14 meses preservados em água, 42 e 43, respectivamente, do total de 46 isolados mantidos nestas condições, estavam viáveis; em nitrogênio líquido, 27 e 13 se desenvolveram nos meios de cultura.

Do total de 36 isolados de *H. capsulatum*, 31 apresentaram, ao exame microscópico, características da fase filamentosa, com hifas hialinas

delgadas e septadas, e macroconídios tuberculados; cinco isolados foram excluídos do estudo, por apresentarem contaminação nas culturas originais. Dos 31 isolados, 23 reverteram para a fase leveduriforme e, após 11 e 22 meses de preservação em água, 21 e 19 estavam viáveis, respectivamente; quando mantidos no nitrogênio líquido, 13 e 18 isolados se desenvolveram nos meios de cultura.

Neste estudo, dos 36 isolados de *B. dermatitidis*, 16 foram substituídos por outros gêneros e espécies de fungos na micoteca ao longo dos anos, apesar de ainda existirem as fichas catalográficas com as denominações originais. Dos 20 restantes, 13 apresentaram hifas hialinas e raros conídios esféricos formados em conidióforos, e as culturas de sete isolados estavam contaminadas por fungos anemófilos. Dentre os 13 isolados identificados, somente três reverteram para a fase leveduriforme. Após 12 e 21 meses preservados em água e em nitrogênio líquido, 10 e 11 estavam viáveis em água, e cinco e três isolados estavam viáveis, respectivamente.

Foram avaliados 36 isolados de *S. schenckii* e todos apresentaram características típicas do gênero e espécie, com hifas hialinas, conidióforos delgados e vesículas com conídios simpodiais; no entanto, somente cinco isolados reverteram quando incubados à 37°C nos meios de cultura usuais. Foram realizados os testes de viabilidade após 12 e 28 meses de preservação em água e nitrogênio líquido: 29 e 19 isolados, respectivamente, apresentaram crescimento quando semeados a partir da água, e 32 e 34, a partir do nitrogênio líquido.

Os dois isolados de *Penicillium marneffe* foram analisados observando-se que as culturas apresentavam coloração avermelhada, pigmentando o meio. A identificação molecular, por sequenciamento, confirmou gênero e espécie, com 100% de similaridade com a sequência de referência disponível no *GenBank* (**Tabela 5, Anexo E**). Após 15 meses preservados em água e em nitrogênio líquido, os dois isolados estavam viáveis por ambos os métodos; no entanto, não apresentaram crescimento após 25 meses de preservação.

Os 17 isolados de *C. immitis* estão mantidos na micoteca do IMTSP desde 1978, em meios de cultura recobertos com óleo mineral, por tratar-se de fungo patogênico nível 3 (NB3), na classificação das normas de biossegurança (CDC, 2007). Desses, somente cinco estavam viáveis após três tentativas de cultivos em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, ágar batata dextrose e caldo soja (Lacaz et al., 2002). Ao exame microscópico, somente dois isolados apresentaram hifas hialinas delgadas e artrosporadas, típicas do gênero *Coccidioides*. A análise das sequências, obtidas após amplificação da região ITS do DNA ribossômico, demonstrou que três dos isolados são *C. immitis* (99% de similaridade com cepas de referência disponível no *GenBank*) e dois foram identificados como *C. posadasii*, também com 99% de similaridade (**Figura 1**).

Figura 1: Sequenciamento do DNA amplificado de *Coccidioides immitis* (Ci485) com primers ITS1 e ITS4

Posteriormente, foram realizadas amplificações das amostras de DNA destes mesmos isolados, com primers específicos (Umeyama et al., 2006), que revelaram, em gel de agarose a 2%, duas bandas de pesos moleculares diferentes: para três isolados foram visualizados amplificados com 720 pares de base correspondentes à *C. immitis*, enquanto os dois restantes revelaram bandas de peso molecular menor, correspondente à *C. posadasii* (**Figura 2**).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando os produtos de amplificação dos isolados de *C. immitis* (Ci 252, Ci 485 e Ci510) e de *C. posadasii* (Ci 520 e Ci 604) com primers CoiF e CoiR (Umeyama et al., 2006) PM: 100 bp ladder (Fermentas, USA)

Após preservação desses isolados em água e em nitrogênio líquido, por três e 19 meses, os cinco estavam viáveis em ambos os métodos.

Os 10 isolados originalmente identificados como *P. cerebriformis*, foram mantidos na micoteca do IMTSP desde 1935, quando esta espécie foi descrita pela primeira vez por Moore (1935). Os fungos foram isolados de materiais clínicos provenientes de pacientes com diagnóstico de blastomicose sul-americana (paracoccidoidomicose), e o autor observou que as culturas apresentavam aspecto cerebriforme à temperatura ambiente.

No presente estudo, os 10 isolados foram inicialmente avaliados quanto à morfologia, apresentando o mesmo aspecto de cultura cerebriforme; ao microscópio, não foram observadas estruturas que possibilitassem alguma identificação. Quando submetidos ao sequenciamento, após amplificação da região ITS (*primers* ITS1/ITS4), todos os isolados apresentaram 99% de similaridade com sequências do *Aspergillus penicillioides* disponíveis no *GenBank*.

4.2 Fungos filamentosos: análise das características morfológicas, viabilidade após preservação em água e em nitrogênio líquido, e identificação molecular

Os resultados das análises do grupo de fungos filamentosos estão resumidos na **Tabela 3 (Anexo C)**.

Dos 31 isolados do gênero *Aspergillus* selecionados para o estudo, quatro apresentaram, após microcultivos, micélio sem as estruturas de conidiogênese, e dois isolados, que estavam originalmente identificados na micoteca como *A. flavus*, apresentaram estruturas microscópicas de *A.*

fumigatus; estes seis isolados foram excluídos das análises posteriores. Os 25 restantes apresentaram as características macroscópicas e micromorfológicas das espécies *A. flavus* (13), *A. fumigatus* (6) e *A. niger* (13), confirmando as identificações originais da coleção. Quando preservados em água destilada esterilizada e em nitrogênio líquido, todos os isolados apresentaram 100% de viabilidade após 12 e 15 meses.

De 11 isolados de *Cladosporium* spp. mantidos na coleção, somente quatro apresentaram estruturas microscópicas típicas do gênero, com conídios em cadeia, e quando preservados em água e em nitrogênio líquido por 16 meses, apresentaram 100% de viabilidade. Os sete isolados restantes foram excluídos das demais análises, por apresentarem ao exame microscópico somente micélio estéril.

Para *F. pedrosoi*, apenas um isolado, entre os 26, foi excluído do estudo, por não apresentar crescimento na cultura original da micoteca; os 25 restantes apresentaram estruturas de conidiogênese características nos microcultivos, conforme descrição na **Tabela 3 (Anexo C)**. O estudo de viabilidade mostrou que, após 17 meses de preservação em água, 19 isolados permaneceram viáveis, e em nitrogênio líquido houve 100% de viabilidade.

De 14 mucoráceos dos gêneros *Absidia* (5), *Rhizopus* (3) e *Mucor* (6), 13 apresentaram estruturas características nos microcultivos, e um isolado identificado na coleção como *Rhizopus* spp., apresentou contaminação já na cultura original da micoteca, sendo excluído. Os 13 isolados foram preservados em água e em nitrogênio líquido e, após 13

meses, 11 estavam viáveis em ambos os métodos, excluídos dois isolados de *Mucor* spp. que não se desenvolveram nos meios de cultura.

Dos 10 isolados de *Penicillium* spp. e seis de *Paecilomyces* spp., todos foram confirmados como pertencentes aos gêneros na identificação micromorfológica; após dois meses de preservação em água e em nitrogênio líquido, oito isolados de *Penicillium* spp. estavam viáveis em água e nove no nitrogênio líquido, enquanto somente dois isolados de *Paecilomyces* spp. apresentaram viabilidade nos dois métodos aplicados.

4.3 Leveduras: análise dos aspectos morfológicos, bioquímicos, RAPD, viabilidade após preservação por liofilização e congelamento, e identificação molecular

Os resultados das análises do grupo de leveduras estão resumidos na **Tabela 4 (Anexo D)**. Ressalte-se que todas as análises de aspecto macroscópico e micromorfológico, cultivos em meio de CHROMagar® e meio CGB, bem como as provas de assimilação e fermentação, foram realizadas com as 100 colônias obtidas isoladamente dos gêneros *Candida*, 100 de *Cryptococcus*, e 35 de *Trichosporon*.

Os 20 isolados de *Candida* (11 *C. albicans*, quatro *C. tropicalis* e cinco *C. krusei*) apresentaram culturas com aspecto macroscópico típico de leveduras, sendo 13 com colônias lisas e úmidas, e sete com colônias secas e rugosas. Para a análise micromorfológica, foram realizados cultivos em lâmina em ágar fubá das 100 colônias isoladas por esgotamento (com o objetivo de se verificar a pureza das culturas mantidas

na coleção) e, para 15 isolados, as características encontradas correspondiam às espécies originalmente identificadas na coleção; os cinco restantes, que apresentaram resultados inconclusivos por esta análise, foram submetidos ao sequenciamento.

Pelas provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, e fermentação, os resultados permitiram confirmar as espécies de *Candida* para os mesmos 15 isolados; os cinco restantes foram então submetidos às reações de sequenciamento (**Tabela 5, Anexo E**).

As 100 colônias foram posteriormente semeadas em meio de CHROMagar® *Candida*, que fornece uma identificação presuntiva das espécies, verificando-se os seguintes resultados: nove isolados apresentaram coloração verde (*C. albicans*), três coloração azulada (*C. tropicalis*), seis coloração rosa (*C. krusei* e outras espécies) e dois coloração marrom, sendo que para sete isolados as colorações das colônias não corresponderam às identificações originais.

As amostras de DNA extraídas das 100 colônias de *Candida* spp. foram submetidas às amplificações por RAPD: as colônias de 17 isolados apresentaram o mesmo perfil de bandas, demonstrando que as culturas estavam puras; para os três isolados restantes, as amostras de DNA não amplificaram com os *primers* empregados no estudo (**Figura 3**).

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando o perfil de bandas obtidas após a reação de PCR–RAPD, com amostras de DNA das cinco colônias de cada isolado de *Candida* spp. PM: peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen)

Os cinco isolados que apresentaram resultados discordantes na micromorfologia e nas provas de assimilação, foram submetidos ao sequenciamento, verificando-se após análise das sequências obtidas, que um isolado de *C. albicans* apresentou 99% de similaridade com a cepa de referência de *C. tropicalis*; um isolado de *C. tropicalis* foi identificado como *C. parapsilosis* (99% de similaridade com a cepa de referência); dois de *C. krusei*, foram identificados como *C. orthopsilosis* (98% de similaridade) e *Pichia membranifaciens* (99% de similaridade). Somente um isolado identificado como *C. krusei* na coleção, foi confirmado como *Issatchenkia occidentalis* com 99% de similaridade, apesar dos resultados de análise fenotípica terem sido inconclusivos (**Tabela 5, Anexo E**).

Os 19 isolados de *C. neoformans* (variedades *neoformans* e *gatti*) e um de *C. laurentii* foram semeados em ágar Sabouraud dextrose com

cloranfenicol, apresentando culturas com aspecto macroscópico típico de leveduras, sem contaminação por fungos anemófilos: 14 culturas tinham aspecto mucóide, cinco eram cremosas e uma coriácea. Foram realizados os exames diretos das culturas com tinta da China (Lacaz et al., 2002), para conferir a presença da cápsula nas colônias isoladas por esgotamento (cinco de cada isolado). Cápsulas com dimensões variáveis ($< 3,23 \text{ mm}$ a $\leq 9,63 \text{ mm}$) foram observadas, sendo que para dois isolados de *C. neoformans* foi possível observar tamanhos diferentes de cápsula em uma mesma colônia.

Os mesmos açúcares e fontes de nitrogênio, utilizados para a identificação de *Candida* spp. pelas provas de assimilação, foram empregados para *Cryptococcus* spp., e permitiram a confirmação de gênero e espécie para 18 dos 20 isolados.

As 95 colônias dos 19 isolados de *C. neoformans* foram semeadas em meio CGB, para a diferenciação dos subtipos e, após 72 horas de crescimento, foram observados os seguintes resultados: para sete isolados, o meio CGB desenvolveu coloração azul, indicando que eram *C. neoformans* variedade *gatti*, e confirmando as identificações originais da coleção. Dois isolados apresentaram colorações diferentes entre as cinco colônias semeadas de cada um, indicando que essas culturas não estavam puras. Estes eram os mesmos isolados que apresentaram resultados discordantes quanto às dimensões das cápsulas. Para os 10 isolados restantes, o meio de CGB apresentou coloração amarelo esverdeada (inibição do crescimento pela presença da glicina), confirmando as

identificações da micoteca, como sendo *C. neoformans* variedade *neoformans*.

As amostras de DNA extraídas destas leveduras (100 colônias) foram submetidas às reações de RAPD, observando-se diferença no perfil de bandas para os mesmos isolados que apresentaram resultados discordantes no CGB e na mensuração das cápsulas (**Figura 4**). Deste modo, considerou-se que essas duas culturas de *C. neoformans* não estavam puras e foram excluídas da coleção.

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando o perfil de bandas obtidas após a reação de PCR–RAPD, com amostras de DNA das cinco colônias de cada isolado de *Cryptococcus* spp. PM: peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen)

Dez isolados de *Cryptococcus* spp. foram submetidos ao sequenciamento, com similaridade de 99% quando as sequências foram alinhadas àquelas disponíveis no *GenBank* e confirmando as identificações das provas bioquímicas e do crescimento em CGB (**Tabela 5, Anexo E**).

Foram semeados em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol os 13 isolados de *Trichosporon* spp., e as culturas de sete deles apresentaram

aspecto rugoso e cor branco-amarelada. Os cultivos dos seis isolados restantes estavam contaminados com bactérias nos tubos originais da micoteca, sendo excluídos do estudo. Nos cultivos em lâmina, os sete isolados apresentaram hifas artrosporadas características do gênero. Os mesmos isolados, semeados em ágar Mycosel e em ágar extrato de malte, se desenvolveram à 30°C, mas não à 37°C, sugerindo que pertencem à espécie *Trichosporon cutaneum* (De Hoog et al., 2000). As provas de assimilação para esses isolados foram realizadas, não sendo possível, no entanto, definir as espécies.

Pela técnica de RAPD, dos sete isolados de *Trichosporon* spp. avaliados (35 colônias), cinco apresentaram perfis de bandas diferentes, indicando que as culturas mantidas na coleção não estavam puras.

Em relação aos testes de viabilidade para as leveduras, os mesmos foram realizados com os 15 isolados de *Candida* spp., 18 de *Cryptococcus* spp. e dois de *Trichosporon* spp.. Após seis meses de preservação pelos métodos de liofilização e congelamento a -80°C, a viabilidade foi de 100% para os três gêneros, com manutenção das características morfológicas.

4.4 Resultados das reações de sequenciamento

Os 75 isolados submetidos às reações de sequenciamento foram selecionados aleatoriamente entre os fungos dimórficos, filamentosos e leveduras (**Tabela 5, Anexo E**), tanto entre aqueles em que a identificação pelos métodos fenotípicos foi definida, como para os isolados que apresentaram resultados inconclusivos por essas análises. Para 58

isolados, as análises fenotípicas e moleculares (sequenciamento) mostraram resultados concordantes, sendo possível a autenticação dos mesmos. Os 17 isolados restantes serão descartados da coleção, por apresentarem resultados discordantes dos registrados nas fichas da micoteca, ou porque os resultados das análises de sequenciamento discordaram das identificações observadas pelas análises fenotípicas.

4.5 Análise dos agentes de dermatofitoses

Dos 96 isolados originalmente mantidos na coleção, 35 não se desenvolveram, mesmo após três tentativas de cultivo nos meios propostos; um isolado foi identificado como *Trichosporon* spp., apesar da informação da coleção manter a identificação original de *Trichophyton rubrum* e, deste modo, foi excluído do estudo. Dos 60 isolados restantes, somente dois produziram estruturas microscópicas que permitiram identificação de espécie, um *Microsporum gypseum* e um *Epidermophyton floccosum*. Os demais isolados apresentaram, quando semeados nos meios de cultura do estudo, somente micélio estéril, de cor branca e aspecto cotonoso; ao exame microscópico, foram observadas somente hifas hialinas pleomórficas, mesmo quando empregados os meios específicos para indução da conidiogênese. Os dois isolados viáveis (*M. gypseum* e *E. floccosum*) foram preservados em água destilada esterilizada e em nitrogênio líquido por um mês, permanecendo viáveis e mantendo as características fenotípicas.

5. DISCUSSÃO

O método tradicional de conservação de fungos por repiques sucessivos é trabalhoso e dispendioso, tornando-se ineficientes, pelo problema da contaminação por fungos ambientais, por bactérias e pela presença de ácaros. Estes fatores acarretam alterações nas características morfológicas e fisiológicas das culturas, podendo culminar com a perda do micro-organismo (Smith e Onions, 1993; López-Martinez et al., 1999; Figueiredo, 2001). Processos de liofilização, criopreservação ou manutenção em água esterilizada são os mais adequados para a preservação, pois se baseiam na redução do metabolismo celular a um nível basal, mantendo as características fenotípicas e genotípicas dos micro-organismos, além de minimizar os riscos de contaminação (Castellani, 1967; Butterfield et al., 1974; McGinnis et al., 1974; Boesewinkel, 1976; Lastra et al., 2001; Baker e Jefries, 2006). No entanto, não existe um método universal que seja eficiente na preservação de todos os gêneros e espécies de fungos, devido às diferenças existentes em suas características fisiológicas e metabólicas (Figueiredo, 2001; Deshmukh, 2003; Paoli, 2005).

A coleção de culturas de fungos do IMTSP vem sendo mantida, durante todos esses anos, por repiques periódicos em meios sólidos e, somente para alguns isolados, os métodos de liofilização, preservação em água destilada esterilizada e óleo mineral foram aplicados. Estudos anteriores sobre a preservação das características fenotípicas e

genotípicas de alguns isolados mantidos na coleção do IMTSP demonstraram a necessidade de se estabelecer uma rotina de monitoramento, com aplicação de metodologias de caracterização morfológica, fisiológica e molecular, bem como de técnicas de preservação, que mantivessem a estabilidade dessas características ao longo do tempo.

Inicialmente, o presente estudo possibilitou a verificação de que havia discordância entre as informações originalmente contidas nas fichas catalográficas da micoteca e as culturas de fungos existentes na coleção, não somente quanto ao gênero e espécie, como também em relação aos dados de procedência (data de isolamento, tipo de lesão e enfermidade, etc.) que, ou não estavam disponíveis, ou estavam incompletos. Esses isolados foram descartados da coleção, uma vez que informações discordantes inviabilizam sua autenticação e a confiabilidade no material a ser fornecido para a comunidade científica.

Com a finalidade de aprimorar o acesso às informações sobre as culturas da coleção, foi iniciado o processo de documentação e registro na forma eletrônica, com a aquisição de um computador para a micoteca e de um programa de banco de dados (*Microsoft Office Access*), para a catalogação de todas as informações existentes sobre as culturas. Este sistema informatizado de gerenciamento do acervo permitirá uma rápida rastreabilidade dessas informações e sua atualização periódica.

5.1 Fungos dimórficos

No presente estudo, observou-se que vários destes isolados, não apresentaram estruturas de conidiogênese ao exame microscópico, impedindo sua caracterização pela análise micromorfológica. Este fato indica que os fungos mantidos sob repiques sucessivos ao longo dos anos, podem perder a capacidade de formação de conídios, apresentando estruturas morfológicas diferentes devido ao pleomorfismo (Silva et al., 1994; Cavalcanti et al., 2005; Neufeld e Oliveira, 2008).

Um aspecto relevante do estudo foi a observação da perda da capacidade de reversão de fase (dimorfismo térmico) de diversos isolados de *P. brasiliensis*, *S. schenckii* e *B. dermatitidis*, provavelmente devido à manutenção das culturas sob repiques sucessivos; este fato já havia sido descrito em estudos anteriores realizados na micoteca, pela avaliação de sete isolados de *P. brasiliensis*, com apenas três revertendo para a fase leveduriforme (Cavalcanti et al., 2005).

No estudo de Lima e Borba (2001), analisando a viabilidade, características morfológicas e capacidade de reversão de fase de isolados de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *S. schenckii*, preservados em óleo mineral, os autores constataram que a manutenção destes fungos *in vitro* por longos períodos, mesmo com redução do metabolismo, induziram mudanças morfológicas, bem como o dimorfismo térmico. Outro estudo, avaliando a reversão *in vitro* e *in vivo*, também demonstrou a perda desta capacidade, após a preservação dos fungos em óleo mineral por até 49

anos, verificando que mesmo após a passagem em animal, este processo não pode ser revertido (Lima et al., 2004).

Em relação à viabilidade dos fungos dimórficos, verificou-se neste estudo que foi relativamente baixa, especialmente para os isolados de *H. capsulatum* em nitrogênio líquido e *S. schenckii* em água. Quando comparados os dois métodos de preservação para este grupo, os índices de recuperação a partir do nitrogênio líquido foram mais baixos do que a partir da água. O meio de cultura empregado para avaliação da viabilidade foi o ágar batata dextrose, por ser comumente utilizado, tanto para a produção de estruturas de conidiogênese, quanto na manutenção de culturas de fungos em coleções. A seleção desse meio de cultura pode ter influenciado nos baixos índices de viabilidade para alguns gêneros, uma vez que após permanecerem por vários meses em condições de metabolismo reduzido, a recuperação dos fungos realizada em meios ricos de nutrientes, como o caldo BHI ou BHI-sangue, possivelmente resultasse em viabilidade mais elevada. Outro fator que pode ter afetado o índice de recuperação desses fungos, foi o fato de ter sido utilizada na preservação em água e em nitrogênio, uma suspensão de hifas e conídios, dificultando a padronização do tamanho do inóculo nos testes de viabilidade (Nakasone et al., 2004).

Estudo de Bezerra et al. (2006) realizado com isolados de *C. immitis*, demonstrou que a manutenção em água destilada possibilitou a viabilidade dos isolados após 12 meses, sem alteração das características fenotípicas. Para a recuperação dos fungos, os autores empregaram somente ágar

batata dextrose, também empregado por McGinnis (1974), que encontrou elevados índices de viabilidade para fungos filamentosos mantidos em água.

Das 17 culturas de *Coccidioides* spp., mantidas em óleo mineral ao longo dos últimos 30 anos na micoteca, somente cinco estavam viáveis. A baixa recuperação dessas culturas pode estar relacionada às condições de preservação, pois a redução da taxa de metabolismo pelo decréscimo do consumo de oxigênio, possivelmente afetou a viabilidade dos fungos. Ainda, a manutenção nestas condições por um período prolongado e a qualidade do óleo empregado, também são fatores que podem ter afetado a recuperação dos micro-organismos (Smith e Onions, 1983; Lima e Borba, 2001).

Por outro lado, os cinco isolados de *Coccidioides* spp., após preservação em água e em nitrogênio líquido por 19 meses, mostraram índice de viabilidade elevado (100%), resultados concordantes com os achados de Bezerra et al. (2006). O número de isolados avaliados foi pequeno, mas os dados indicam que estes métodos de manutenção podem ser aplicados ao gênero, com a vantagem de se evitar a manipulação de fungo patogênico da classe NB3 (CDC, 2007).

O método de criopreservação em nitrogênio líquido é o mais indicado para a manutenção dos micro-organismos por longos períodos, porque aumentam as chances de manter a viabilidade, estabilidade morfológica e genética. Dados de Homolka et al. (2010) confirmam que o método é eficiente para prevenir alterações morfológicas, podendo ser

aplicado para todas as variedades de fungos; os autores sugerem ainda que o congelamento seja gradual, para não causar danos aos organismos durante o processo.

As análises dos sequenciamentos de DNA aplicadas aos fungos dimórficos foram importantes para aqueles isolados cujos resultados das micromorfologia foram inconclusivas, como no caso dos 14 isolados de *P. brasiliensis*, identificados somente pela técnica molecular. Entretanto, o fato de terem perdido a capacidade de reversão de fase, impossibilita a caracterização completa do fungo. Para *Coccidioides* spp., os sequenciamentos, bem como amplificações por PCR com *primers* espécie-específicos, revelaram que, dos cinco isolados analisados, dois são *C. posadasii*, identificação possível somente pela aplicação da técnica molecular, uma vez que morfologicamente não se distingue do *C. immitis* (Umeyama et al., 2006).

Em relação aos 10 isolados identificados na coleção como *P. cerebriformis*, Lacaz et al. (1997) avaliaram alguns destes isolados quanto à produção da glicoproteína de 43 kDa (gp43), antígeno dominante do *P. brasiliensis*, na tentativa de confirmar se os fungos pertenciam ao gênero *Paracoccidioides*. Nenhum dos isolados expressou a gp43 quando cultivados nos meios de cultura, usualmente empregados para a produção do antígeno, resultado que forneceu indícios de que tratava-se de outro gênero. Posteriormente, quatro isolados foram submetidos ao sequenciamento após amplificação do DNA com *primers* da região 28S do DNA ribossomal, e os resultados mostraram que as sequências analisadas

apresentavam 99% de similaridade com o gênero *Aspergillus* (Cavalcanti et al., 2005).

No presente estudo, os 10 isolados foram avaliados inicialmente pela análise morfológica, com resultados inconclusivos. Submetidos às reações de sequenciamento da região ITS, as análises das sequências revelaram 99% de similaridade com *Aspergillus penicillioides*. Entretanto, como a identificação foi somente pela análise molecular, os resultados apenas sugerem que os 10 isolados mantidos na micoteca não pertencem ao gênero *Paracoccidioides*.

5.2 Fungos filamentosos

Para este grupo de fungos, os repiques sucessivos acarretaram alterações morfológicas, de conidiogênese e viabilidade, em poucos isolados, excetuando-se o gênero *Cladosporium* spp.. Entretanto, por este procedimento, os isolados se tornam suscetíveis de contaminação por bactérias e fungos anemófilos, e a desidratação rápida dos meios de cultura, exige repiques constantes e sucessivos (Borman et al., 2006).

Os índices de viabilidade observados para os fungos filamentosos foram elevados, demonstrando que a manutenção, tanto em água destilada como em nitrogênio líquido, parece ser adequada para a preservação desses fungos. Outros autores também demonstraram que a preservação em água destilada foi eficiente na manutenção das características morfológicas e de conidiogênese de fungos filamentosos, além de facilitar a

estocagem, evitar a manipulação dos micro-organismos e otimizar o espaço das coleções (Diogo et al., 2005).

Entretanto, para os fungos filamentosos agentes de dermatofitoses, a preservação em água não foi adequada aos isolados deste estudo, uma vez que havia originalmente na coleção 73 isolados mantidos nesta condição à temperatura ambiente, e a maior parte ou estava inviável, ou não apresentava as características morfológicas para sua identificação (pleomórficos). Estes resultados estão em desacordo com os achados de Neufeld e Oliveira (2008), que encontraram elevada taxa de recuperação e manutenção das características morfológicas de isolados de dermatófitos após por 11 anos mantidos em água esterilizada. Os resultados discordantes podem ser devidos à qualidade da água empregada na preservação, que pode conter traços de elementos tóxicos, inviabilizando os micro-organismos (Qiangqiang et al., 1998).

Por outro lado, um estudo com fungos dermatófitos, demonstrou que estes permaneceram viáveis por até 12 anos, quando os isolados repicados em meios de cultura foram preservados sob refrigeração. Em contrapartida, o estudo relata que muitas espécies de *Trychophyton* spp. e *Microsporum* spp. permaneceram viáveis durante o período de sete a 10 anos, mas apresentaram alterações morfológicas. Ainda segundo o autor do estudo, culturas de fungos dermatófitos podem ser preservadas por liofilização por períodos prolongados, sem perda da viabilidade e alteração da morfologia (Deshmukh, 2003). Contudo, Borman et al. (2006) observaram que dermatófitos preservados em água produzem micélio

estéril, modificando o aspecto e coloração das culturas; relatam ainda, que o melhor método para preservação destes fungos é o emprego de nitrogênio líquido.

5.3 Leveduras

Em geral, as leveduras são organismos de fácil manutenção nas coleções; no entanto, assim como para os fungos filamentosos, os repiques sucessivos podem acarretar uma série de alterações, particularmente a perda das características bioquímicas, impedindo a caracterização completa destes organismos (Cavalcante et al., 2007).

Dos 11 isolados de *C. albicans* avaliados no estudo, 10 foram identificados pelas características micromorfológicas, pelos resultados de assimilação de açúcares e nitrogênio, desenvolvimento de coloração verde das colônias no meio CHROMagar™ e, para quatro deles, pelos sequenciamentos (**Tabela 5, Anexo E**), possibilitando a confirmação da espécie. Estes quatro isolados, submetidos às análises fenotípica, bioquímica, fisiológica e molecular, foram considerados como autênticos, e serão mantidos na coleção.

As mesmas análises para *C. tropicalis* caracterizaram a espécie e permitiram a autenticação de três dos quatro isolados, selecionados para este estudo. Entretanto, dos cinco isolados de *C. krusei*, dois não pertenciam a esta espécie. Pelas análises da micromorfologia e assimilação de açúcares foi possível verificar discordância nos resultados, mas pela coloração das colônias no CHROMagar® não foi possível definir

a que espécies esses isolados pertenciam. Este fato reforça o questionamento de alguns autores sobre a eficácia dos meios cromogênicos na diferenciação de espécies de *Candida*, especialmente as não *C. albicans* (Ghelardi et al., 2007; Sivakumar et al., 2009).

Para estes dois isolados, os resultados dos sequenciamentos confirmaram as análises fenotípicas e bioquímicas discordantes, sendo que um deles pertence à espécie *C. orthopsilosis*, e o outro foi identificado como *Pichia membranifaciens*. Por outro lado, um dos isolados de *C. krusei* cuja identificação pela morfologia e bioquímica foi inconclusiva, quando submetido ao sequenciamento, revelou 99% de similaridade com a cepa de referência de *C. krusei*. Estes três isolados deverão ser descartados da coleção, por não possuírem a caracterização completa que permite sua autenticação.

Em relação aos 20 isolados de *Cryptococcus* spp., as análises das provas de assimilação e crescimento em meio de CGB, foram suficientes para confirmar as identificações originais da coleção. Entretanto, para dois isolados, as culturas não estavam puras e serão descartadas. Dos 18 isolados, foram sequenciados 10, possibilitando a caracterização completa e autenticação, uma vez que todas as análises foram concordantes para gênero e espécie. A coleção mantém atualmente 50 isolados de *Cryptococcus* spp. e aqueles que não foram objeto do presente estudo, serão submetidos às mesmas análises para a autenticação. Vale ressaltar que publicações recentes da literatura especializada já adotam a nova classificação taxonômica para o gênero *Cryptococcus* spp., com as

espécies *C. neoformans* e *C. gatii* (Byrnes et al., 2009). Atualmente já estão descritos na literatura *primers* espécie-específicos, podendo ser empregados para amplificações por PCR, como alternativa aos sequenciamentos (Casali et al., 2003).

A técnica de RAPD aplicada às 100 colônias de *Candida* spp. e de *Cryptococcus* spp., e às 35 colônias de *Trichosporon* spp., foi capaz de detectar diferenças no perfil de bandas resultantes das amplificações e permitir a verificação da pureza das culturas mantidas na coleção (**Figura 4**). Esta técnica tem sido aplicada na avaliação de diferenças genotípicas entre micro-organismos, mas apresenta limitações de sensibilidade e reprodutibilidade; atualmente amplificações por PCR com *primers* espécie-específicos e reações de sequenciamento de DNA tem sido preferencialmente utilizadas com este fim (Williams et al., 1990; Fugita et al., 2001). Entretanto, para a finalidade de comparar perfis genotípicos entre colônias de um mesmo isolado, mostrou-se reprodutível e eficiente.

Quanto às leveduras do gênero *Trichosporon*, as provas morfológicas e bioquímicas não foram suficientes para a caracterização. De acordo com Rodriguez-Tudela et al. (2005) a identificação destes fungos pelos métodos convencionais é muitas vezes inconclusiva, e são necessárias provas moleculares para a definição da espécie. Estes autores relatam ainda que, mesmo o sequenciamento da região ITS muitas vezes não diferencia algumas espécies. Entretanto, o estudo de Sugita et al. (2002) sugere que a análise de sequências de regiões intergênicas (IGS) do DNA ribossomal, utilizando *primers* D1/D2 (Kurtzman e Robnett, 1997),

fornece dados suficientes para a caracterização de isolados de *Trichosporon* spp..

Os métodos de liofilização e congelamento a -80°C aplicados às leveduras foram adequados para a preservação, pois a viabilidade dos isolados mantidos por seis meses ou mais nestas condições foi de 100% para os três gêneros. Os resultados deste estudo estão de acordo com relatos de outros autores, que têm demonstrado a eficiência destes métodos na manutenção de leveduras, tanto em relação à viabilidade como na preservação das características morfológicas, bioquímicas e genotípicas. Portanto, têm sido recomendados pelos manuais de gerenciamento de culturas para a preservação de leveduras (Nakasone et al., 2004; OECD, 2007).

Pelos resultados observados neste estudo, a micoteca do IMTSP deverá dar continuidade às avaliações de seu acervo de culturas. Para a caracterização e autenticação dos isolados, a coleção propõe uma abordagem polifásica, resultante das análises de morfologia, fisiologia, características bioquímicas e genotípicas, garantindo uma identificação fidedigna. Esta conduta está de acordo com recomendações sugeridas pelo Consenso de Coleções de Culturas de Micro-organismos da Sociedade Brasileira de Microbiologia, e pelo manual da OCDE (2007).

Os resultados deste estudo incentivam a continuação desta linha de investigação, pela aplicação de procedimentos padronizados e estimulando a capacitação técnica e operacional, fatores que garantem a qualidade de seu acervo.

6. CONCLUSÕES

- O método de repiques sucessivos, por longos períodos de tempo acarretou alterações nas características morfológicas de diversos isolados do estudo, dificultando sua identificação.
- O método de preservação em água destilada esterilizada, para fungos dimórficos, demonstrou índices de viabilidade mais elevados quando comparados ao nitrogênio líquido.
- De modo contrário, para os fungos filamentosos, a preservação em nitrogênio líquido resultou em índices mais elevados de viabilidade do que a preservação em água destilada.
- Os métodos de liofilização e congelamento à -80°C , aplicados para a preservação de leveduras, foram eficientes por apresentar taxa de viabilidade de 100%.
- A técnica de RAPD aplicada ao DNA dos isolados de leveduras foi eficiente para conferir a pureza dos mesmos.
- Os sequenciamentos possibilitaram a autenticação, quando os resultados destas análises foram concordantes com os dados de identificação fenotípica.

7.0 ANEXOS

Tabela 1: Resultados das análises morfológicas e da viabilidade após preservação em água esterilizada e em nitrogênio líquido, dos fungos dimórficos

Isolados	Número real	Características macroscópicas e micromorfológicas	Reversão de fase à 37°C	Resultados inconclusivos/ Exclusão	Tempo de Preservação (meses)	Viabilidade	
						H ₂ O	N ₂
<i>P. brasiliensis</i>	72	46	32	26	7	42/46	27/46
					14	43/46	13/46
<i>P. cerebriformis</i>	10	*10	-----	-----	7	10/10	10/10
					14	10/10	10/10
<i>H. capsulatum</i>	36	31	23	5 (contaminados)	11	21/31	13/31
					22	19/31	18/31
<i>B. dermatitidis</i>	20	13	3	7 (contaminados)	12	10/13	5/13
					21	11/13	3/13
<i>S. schenckii</i>	36	36	5	-----	12	29/36	32/36
					28	19/36	34/36
<i>P. marneffei</i>	2	*2	-----	-----	15	2/ 2	2/ 2
					25	0/2	0/2
<i>C. immitis</i> **	17	*5	-----	12 (inviáveis)	3	5/ 5	5/5
					19	5/5	5/5

*sequenciamento ** NB3

Tabela 2: Resultados das análises morfológicas e da viabilidade após preservação em água esterilizada e em nitrogênio líquido, dos fungos filamentosos

Isolados	Número real	Características macroscópicas e micromorfológicas	Não identificados	Tempo de preservação (meses)	Viabilidade		Observação/ Exclusão
					H ₂ O	N ₂	
<i>A. flavus</i>	13	13	-----	13	11	11	2 <i>A. fumigatus</i>
<i>A. fumigatus</i>	6	2	4	12	2	2	4 micélio estéril
<i>A. niger</i>	13	13	-----	15	13	13	-----
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	26	25	-----	17	19	25	1 inviável
<i>Cladosporium</i> spp.	11	4	7	16	4	4	7 micélio estéril
<i>Trichoderma</i> spp.	2	1	1	8	1	1	1 micélio estéril
<i>Absidia</i> spp.	5	4	1	13	4	4	1 contaminação
<i>Rhizopus</i> spp.	3	3	-----	13	3	3	-----
<i>Mucor</i> spp.	6	6	-----	13	4	4	-----
<i>Curvularia</i> spp.	3	1	2	13	1	1	2 micélio estéril
<i>Alternaria</i> spp.	1	1	-----	2	0	0	-----
<i>Penicillium</i> spp.	10	10	-----	2	8	9	-----
<i>Paecilomyces</i> spp.	5	5	-----	2	2	2	-----
<i>Geotrichum</i> spp.	14	13	1	13	8	12	1 contaminação

Tabela 3: Características micromorfológicas de *Fonsecaea pedrosoi*

Isolados*	Tipo de conidiogênese	Identificação
Fp86	<i>Cladosporium</i> , <i>Rhinoctadiella</i> e <i>Phialophora</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp126	<i>Cladosporium</i> , <i>Rhinoctadiella</i> e <i>Phialophora</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp153	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp154	<i>Phialophora</i>	<i>Phialophora</i> sp.
Fp286	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp349	<i>Cladosporium</i> , <i>Rhinoctadiella</i> e <i>Phialophora</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp372	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp373	<i>Phialophora</i>	<i>P. americana</i>
Fp376	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp377	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp408	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp425	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp540	<i>Rhinoctadiella</i>	<i>Rhinoctadiella</i> sp.
Fp733	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp746	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp848	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp855	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp859	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp861	<i>Cladosporium</i> e <i>Phialophora</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp868	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp869	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp877	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp884	<i>Cladosporium</i> e <i>Rhinoctadiella</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp885	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>
Fp934	-	-
Fp955	<i>Cladosporium</i>	<i>F. pedrosoi</i>

*Fp = *Fonsecaea pedrosoi*; Fp934 = isolado inexistente na coleção

Tabela 4: Resultados das análises morfológicas e da viabilidade após preservação por liofilização e congelamento -80°C

Isolados	Número real	Características macroscópicas	Características micromorfológicas	Assimilação fontes C e N	CHROMagar™	CGB	RAPD
<i>Candida albicans</i>	11	11/11	10/11	09/11	09/11	-	10/11
<i>Candida tropicalis</i>	4	4/4	3/4	3/4	2/4	-	3/4
<i>Candida krusei</i>	5	5/5	3/5	3/5	4/5	-	5/5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	19	19/19	17/19	17/19	-	17/19	17/19
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	1/1	1/1	1/1	-	1/1	1/1
<i>Trichosporon</i> spp.	13	7/ 13	7/7	-	-	-	2/7

Tabela 5: Resultados das reações de sequenciamento de 75 isolados da coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Isolados	Número	Primers	Identificação (98 a 100% similaridade - GenBank)	Isolados autenticados
<i>P. brasiliensis</i>	14	P1/P2	<i>P. brasiliensis</i>	14
<i>P. cerebriformis</i>	10	P1/P2 e ITS1/ITS4	<i>Aspergillus penicillioides</i> (10)	0
<i>H. capsulatum</i>	3	ITS1/ITS4	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	3
<i>C. immitis</i>	5	ITS1/ITS4	<i>C. immitis</i> (3) <i>C. posadasii</i> (2)	5
<i>P. marneffe</i>	2	ITS1/ITS4	<i>P. marneffe</i>	2
			<i>F. pedrosoi</i> / <i>F. compacta</i> (5)	
			<i>F. pedrosoi</i> (8)	
<i>F. pedrosoi</i>	18	ITS1/ITS4	<i>F. pedrosoi</i> / <i>F. monophora</i> (2)	15
			<i>Phialophora americana</i> (2)	
			<i>Penidiella venezuelensis</i> (1)	
<i>Mucor</i> spp.	1	ITS1/ITS4	<i>Mucor circinelloides</i> (1)	1
<i>Candida albicans</i>	4	ITS1/ITS4	<i>C. albicans</i> (4)	4
			<i>Issatchenkia occidentalis</i> (1)	
<i>Candida krusei</i>	4	ITS1/ITS4	<i>C. parapsilosis</i> (2)	1
			<i>Pichia membranifaciens</i> (1)	
<i>Candida tropicalis</i>	2	ITS1/ITS4	<i>C. tropicalis</i> (1)	1
			<i>C. parapsilosis</i> (1)	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	9	P1/P2	<i>Cryptococcus gatti</i> (3)	9
			<i>Cryptococcus neoformans</i> (6)	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	P1/P2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1
<i>Geotrichum</i> spp.	2	ITS1/ITS4	<i>Galactomyces</i> spp.	2
TOTAL	75			58

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nieda N, Miyaji M and Nishimura K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. [*J Clin Microbiol.*](#) 2003; 41: 873-876.

Abreu MMV, Tutunji VL. Implantação e manutenção da coleção de culturas de micro-organismos do UniCEUB. *Universitas Ciências da Saúde* 2005; 2: 236-51.

Baker M, Jefries P. Use of commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophyte fungi. [*J Clin Microbiol.*](#) 2006; 44: 617-8.

Bezerra CCF, Lima RF, Lazera MS, Wanke KB and Borba CM. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39: 241-4.

Boesewinkel HJ. Storage of fungal culture in water. *Trans Br Mycol Soc.* 1976; 66: 183-5.

Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia.* 2006; 161: 361-8.

Butterfield W, Jong SC, Alexander MT. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. [*Can J Microbiol.*](#) 1974; 20: 1665-73.

Byrnes III EJ, Bildfell R, Frank SA, Mitchell TG, Marr K, Heitman J. Molecular evidence that the Vancouver island *Cryptococcus gattii* outbreak has expanded into the United States pacific northwest. *J Infect Dis.* 2009; 199: 1081-6.

Canhos VP. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. *Cienc Cult*. 2003; 55: 27-9.

Canhos VP, Ferraz de Souza RD, Ávila JPC. Avanços na implementação da Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos. *Microbiologia in foco*. 2009; 9: 46-7.

Canhos VP, Sette LD, Cupolillo E, Tigano MS, Vazoller RF. O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Culturas de Micro-organismos. *Microbiologia in foco*. 2007; 2: 40-8.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. [FEMS Yeast Res](#). 2003; 3: 405-15.

Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile water. Further researches. *J Trop Med Hyg*. 1967; 70: 181-4.

Cavalcante SC, Freitas RS, Vidal MS, Dantas KC, Levi JE, Martins JEC. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 41-7.

Cavalcanti SDB, Levi JE, Dantas KC, Martins JEC. Analysis of the genetic polymorphism of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides cerebriiformis* "Moore" by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and 28S ribosomal DNA sequencing: *Paracoccidioides cerebriiformis* revisited. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2005; 47: 119-23.

Cavalcanti SDB, Dantas KC, Levi JE, Freitas R, Martins JEC. Análise do polimorfismo genômico de amostras de *Paracoccidioides* da Micoteca do IMTSP. In: XIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Santos, SP. 2005.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. Government Printing Office, Washington, 2007.

Dantas KC, Vidal MSM, Cavalcanti SDB, Pereira CN. Avaliação das características fenotípicas e genotípicas de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Candida* spp. mantidos sob liofilização e repiques sucessivos durante 30 anos. In: Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética; 2006; Foz Iguaçu. p. 714.

De Hoog GS, Attili-Angelis D, Vicente VA, Gerrits Van Den Ende HG, Queiroz-Telles F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol.* 2004; 42: 405-16.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.

Deshmukh SK. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses.* 2003; 46: 203-7.

Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol.* 2005; 80: 591-4.

Figueiredo MB. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico.* 2001; 63: 73-82.

Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeasts strains. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3617-22.

Ghelardi E, Pichierri G, Castagna B, Barnini S, Tavanti A, Campa M. Efficacy of chromogenic *Candida* agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 141-7.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 454-500.

Homolka L, Lisa L, Eichlerova I, Valaskova, V, Baldrian P. Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. *Fungal Biol.* 2010; 114: 929-35.

Kurtzman CP, Robnett J. Identification of clinically important ascomycetous yeast based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(5): 1216-23.

Lacaz CSL, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica.* 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Lacaz CSL, Vidal MSM, Pereira CN, Heins-Vaccari EM, Melo NT, Sakai-Valente N, Arriagada GLH. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1997; 39: 141-4.

Lastra CLL, Hajek AE, Humber RA. Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of entomophthoralean fungi. *Can J Bot.* 2001; 79: 861-4.

Lima RF, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iber Micol* 2001; 18: 191-6.

Lima RF, Brito MMS, Schäffer GMV, Lima OC, Borba CM. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. *Can J Microbiol.* 2004; 50: 445-9.

Lopez-Martinez R, Hernández-Hernández F, Bazán-Mora E, Castañon-Olivares LR. Comparative study of two culture conservation methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol*. 1999; 15: 471-4.

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Lazera MS and Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 3251-6.

McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol*. 1974; 28:218-22.

Moore M. A new species of the *Paracoccidioides* Almeida (1930); *P. cerebriformis* Moore, 1935. *Rev Biol Hig*. 1935; 6: 148-54.

Nakasone KK, Peterson AW, Jong S. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. *Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods*. 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004. p. 37-47.

Nery SA, Melhem MSC, Gomes AML. Manutenção da levedura *Cryptococcus* por congelamento. Laes & Haes. 2001; 129: 19498.

Neufeld PM, Oliveira PC. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. *Rev Bras Anal Clin*. 2008; 40: 167-9.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. Best practice guidelines for biological resource centers (BRCs), 2007.

Paoli P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev*. 2005; 29: 897-910.

Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Mycoses*. 1998; 41: 255-7.

Rocha BA, Del Negro GMB, Yamamoto L, Souza MVB, Precioso AR, Okay TS. Identification and differentiation of *Candida* species from pediatric patients by random amplified polymorphic DNA. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41: 1-5.

Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, Gomez-Lopez A, Rodero L, Cuenca-Estrella M. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4026-34.

Ryan MJ, Smith D, Jefries P. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World J Microbiol Biotechnol*. 2000; 16:183-6.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning - a laboratory manual, 2nd ed., 1989.

San-Blas G, Calderone RA. *Pathogenic fungi: structural biology and taxonomy*. Norfolk: Caister Academic Press; 2004.

Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, Lacaz CS. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 1894–6.

Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2913-9.

Sette LD, Cupolillo E, Tigano MS, Vazoller RF, Canhos VP. Recomendações para operação e gerenciamento de coleções de culturas de micro-organismos. *Microbiologia in foco*. 2007; 2: 49-55.

Sidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1999.

Silva AMM, Borba CM, Oliveira PC. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses*. 1994; 37: 165-9.

Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K, Menon T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia*. 2009; 167: 47-9.

Smith D. Culture collection over the world. *Inst Microbiol*. 2003; 6: 95-100.

Smith D, Onions AHS. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans Br Mycol Soc*. 1983; 81: 535-40.

Sugita T, Nakagima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:1826-30.

Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K and Uehara Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (5): 1859-1862.

Uruburu F. History and services of culture collections. *Int Microbiol*. 2003; 6: 101-3.

Voyron S, Roussel S, Munaut F, Varese GC, Ginepro M, Declerck S, Filipello Marchisio V. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycol Res*. 2009;113:1027-38.

WFCC - Guidelines for establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, 2nd edition, 1999.

Williams LGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 6531-5.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfond DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). *PCR protocols*. San Diego: Academic Press. 1990; p. 315-22.