



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

PROSPECÇÃO E VALIDAÇÃO *in silico* DE *primers* DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR *loop* (LAMP) BASEADOS EM MITOGENOMA INTEIRO PARA DETECÇÃO DE *Candida auris*

Mariana Prado Vieira¹; David Aciole Barbosa²; Fabiano Bezerra Menegidio³

1. Estudante de Medicina; e-mail: marianavieira690@gmail.com;
2. Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: aciole.d@gmail.com;
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fabianomenegidio@umc.br;

Área de conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos.

Palavras-Chave: *Candida auris*, fungo patogênico, genoma mitocondrial, *Loop* Mediated Isothermal Amplification.

INTRODUÇÃO

Candida auris é um patógeno multirresistente recentemente descrito que é cada vez mais responsável por surtos associados à saúde em todo o mundo. Foi relatado que seus isolados clínicos apresentam resistência às três principais classes de antifúngicos (azóis, equinocandinas e polienos), além de persistirem em superfícies ambientais por semanas, resultando em sua disseminação entre pacientes em unidades de saúde (Chowdhary *et al.*, 2017; Forsberg *et al.*, 2019; Zamith-Miranda *et al.*, 2021). Portanto, a identificação precisa de *C. auris* torna-se essencial para controlar a prevalência desse patógeno em todo o mundo e prevenir novos surtos. Nos últimos anos, diferentes métodos têm sido utilizados para identificar esse patógeno, porém, muitos têm se mostrado ineficientes por identificarem erroneamente o organismo, como os sistemas automatizados de identificação popularmente utilizados em laboratórios clínicos, ou por serem inadequados por questões financeiras e questões técnicas. Assim, aqui apresentamos conjuntos completos de *primers* baseados em mitogenoma de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) (Wong *et al.*, 2018; Htun *et al.*, 2020; Soroka *et al.*, 2021) para a detecção de *C. auris*. A presente estratégia é inovadora porque utiliza genomas mitocondriais completos do microrganismo alvo, permitindo uma rápida prospecção de *primers* conservados. Além disso, apresentamos conjuntos de *primers* classificados como espécie-específicos e comuns para diferentes isolados disponíveis. Esperamos que esses conjuntos de *primers* possam ser validados e contribuir para a identificação desse fungo extremamente importante.

OBJETIVOS

Realizar a prospecção de *primers* específicos para o método de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) utilizando o mitogenoma do fungo patogênico resistente *Candida auris*.

METODOLOGIA

Inicialmente, construímos um banco de dados de genomas mitocondriais de fungos usando o banco de dados *Nucleotide* do NCBI. Para isso, utilizamos as palavras "genoma completo" como termo de busca e selecionamos os filtros no menu lateral: "Espécie: Fungos", "Tipos de molécula: DNA/RNA genômico" e "Compartimentos genéticos: Mitocôndria". Após selecionar os elementos, baixamos as sequências em formato multi-FASTA. Finalmente, filtramos qualquer sequência < 10kb de comprimento, buscando garantir que apenas genomas mitocondriais completos permaneçam. Com base nas sequências mitocondriais obtidas, construímos o índice da respectiva base de dados utilizando o software Bowtie2 (Langmead *et al.*, 2009). Também usamos o genoma mitocondrial do isolado de *Candida auris* B8441 (NC_053321.1; Misas *et al.*, 2020) como arquivo de referência para outras etapas. Para projetar conjuntos de *primers* LAMP para o genoma de referência completo de *C. auris*, usamos a ferramenta GLAPD (Jia *et al.*, 2019), software capaz de identificar regiões alvo para reações LAMP, a partir de análises em larga escala, comparando os genomas (parciais ou completo) de microrganismos de interesse com um banco de dados. Uma vez identificadas as regiões-alvo, o software projeta um conjunto de 4 a 6 *primers* (com ou sem *loop primers*) específicos para o(s) genoma(s) de interesse, padronizando suas sequências para atender a diferentes critérios, como limites para conteúdo de GC, temperatura de hibridização (T_m), falta de complementaridade cruzada indesejada e relações posicionais específicas entre os *primers*. Essa abordagem, baseada em análises genômicas comparativas, pode produzir muitos conjuntos de *primers*, capazes de amplificar múltiplas regiões alvo, específicas para o(s) genoma(s) de interesse. Para executar a ferramenta e obter os *primers*, fornecemos o índice Bowtie gerado (Langmead *et al.*, 2009) para nosso banco de dados e uma lista de genomas mitocondriais relacionados (*C. auris* cepa L1537/2020, CM036996.1; *C. auris* cepa BJCA001, CP068458.1; *C. auris* cepa CA-AM1, CP061163.1; *C. auris* JCM 15448, AP018713.1; *C. auris* isolado B8441, NC_053321.1 e MT849287.1) que devem ser identificados por nossos *primers* juntos com nossa referência *C. auris*. Durante a execução do GLAPD, usamos os parâmetros "--specific", "--common" e "--loop" para criar *primers* específicos, comuns e de *loop* (Jia *et al.*, 2019). Finalmente, para verificar a especificidade dos conjuntos de *primers* produzidos, todas as sequências de *primers* foram pesquisadas pelo BLAST (Boratyn *et al.*, 2013) contra o banco de dados de nucleotídeos *Candida* e GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após busca no banco de dados de Nucleotídeos do NCBI e aplicação dos filtros, desenvolvemos um banco de dados contendo 2920 genomas mitocondriais completos de fungos, com seis mitogenomas de diferentes isolados de *Candida auris*. O mitogenoma do

isolado B8441 de *Candida auris* (NC_053321.1; Misas *et al.*, 2020) foi utilizado como referência para a prospecção de *primers* LAMP por GLAPD (Jia *et al.*, 2019) juntamente com os mitogenomas dos isolados: *C. auris* cepa L1537/ 2020 (CM036996. 1), *C. auris* cepa BJCA001 (CP068458.1), *C. auris* cepa CA-AM1 (CP061163.1), *C. auris* JCM 15448 (AP018713.1) e *C. auris* isolado B8441 (MT849287. 1) como alvos para *primers* comuns. Todos os outros mitogenomas contidos no banco de dados criado foram usados como pano de fundo para identificar os *primers* específicos da espécie. Após a prospecção através do GLAPD (Jia *et al.*, 2019), identificamos sete conjuntos de *primers* LAMP classificados como comuns e específicos para o isolado B8441 de *Candida auris* e os isolados contidos na lista alvo. Dos sete conjuntos de *primers* LAMP desenvolvidos, seis são comuns entre todos os mitogenomas de *C. auris* contidos no banco de dados, enquanto um conjunto de *primers* não seria comum apenas para a cepa BJCA001 de *C. auris*. Além disso, todos os conjuntos de *primers* desenvolvidos demonstraram especificidade apenas para *Candida auris* quando pesquisados usando BLAST (Boratyn *et al.*, 2013) contra o banco de dados de nucleotídeos *Candida* e GenBank (quadro 1).

Quadro 1 – Conjuntos de dados de *primers* LAMP de *Candida auris*

Conjunto	<i>Primers</i>	Common	BLAST específico
Conjunto 1	F3: TACATTCATTTACTGTTTCCTTCT F2: TAGGTTTAAAAGTTGATGCTACT F1c: TGTCCATAGTAAACACCAGTTCTTT B1c: GTGAATTATGTGGAGTTAACCATGC B2: AGTCAGAAATAGGAACACATTC B3: GGTTAGCTAATCATTCAACGA LF: CACTAACTTGATTTAAACGACCTGG LB: NULL	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP068458.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim
Conjunto 2	F3: CATAGAACACTTAAAATGTTTCGGA F2: ATCGTGTAGGTTTGAATCC F1c: GGCGCTAAAGCTACAATTTAGTTCT B1c: TCGACTGTTTCGATTTCAGTCCCT B2: TACAATTGTTCTACCTTTGAACT B3: ACTCAGATATATTGCTCCACA LF: ACCTCCCCTAAAATTTACGGTTAGT	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP068458.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim
Conjunto 3	F3: ATTGACTACATGATCTAATGGTATG F2: TACTACTTCACAGTATATATGCGA F1c: TTGGAAGTGTTAAAGTTTGCCAATT B1c: CGTGTTTCGATTCACGCTTATCA B2: GCAATCGATACATCCAACC B3: TTGAACCCTAAGAAATCGATTT LF: AACCACAGCGAGAATCGAAC LB: NULL	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP068458.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim
Conjunto 4	F3: AAAAACCTATATTTGGAGAAGTAGG F2: ATGTTATATGCTATGGGATCTATAG F1c: AACTACATACATGTGATGGCTTCAT B1c: TAGAGCATACTTCACTAGTGCTACA B2: CCATATATAGTTGCTAATCATGAGA B3: ACAGCTAATCTTACTTCTCCT LF: NULL LB: ATGGTAATAGCTGTTTCCTACTGGA	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP068458.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim

Conjunto 5	F3: AAAATTATATAAACGGCGGTCT F2: TATCCTGAGGATCCTAAGGTAG F1c: ATTCATTCATGCAGGACACCAAT B1c: AAACGATGCGATAACTGTATCCAT B2: GTACACGGCATCTTCACC B3: GGTCTTTTTGTCAATCTACGG LF: NULL LB: AGTAGACTCAGTGAAATAGCACTCG	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP068458.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim
Conjunto 6	F3: TTACGTATAGTGTAGTGAACAGG F2: CATAATCAATTGATATGGATGTCG F1c: CGGTATTACCCTGTTATCCCTAGC B1c: CGTGAGAGTCGATATCGTCAGC B2: CAACCAGGAGGATGAGTTT B3: CCTACCCTTCTTAATTGCTT LF: NULL LB: GTGTTTGCCACCTCGATGTC	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP068458.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim
Conjunto 7	F3: GAGTATAGTTTTAATGGTAAAACCTCG F2: TGTCTTCAACACACGCTA F1c: GCTTTACCATTAAGCTACAAAGGCT B1c: TTCTTGAAGCGGAATACATGTAAGT B2: GAGTCTTAACCATTAGACGACTAA B3: GTTAGACTGGAATTGAACCAAT LF: GCAAGCAGAATCGAACTACCA LB: NULL	CM036996.1, NC_053321.1, MT849287.1, CP061163.1, AP018713.1	Sim

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossa abordagem *in silico* baseada em genomas mitocondriais completos para a prospecção de novos *primers* para ensaios de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) mostrou-se válida e permitiu a identificação de sete *primers* comuns entre os isolados de *C. auris* contidos em nosso banco de dados. Além disso, esses mesmos *primers* também se mostraram específicos para a espécie alvo, sem identificar nenhum dos fungos filamentosos ou outras espécies de leveduras, incluindo aquelas para as quais *C. auris* é comumente identificado erroneamente, por meio de nossa análise BLAST. Esperamos que os presentes *primers* possam ser validados experimentalmente e que possam auxiliar na identificação deste fungo de extrema importância clínica.

REFERÊNCIAS

- Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezhuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 41(Web Server issue): W29-33, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt282.
- Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog.* 18;13(5): e1006290, 2017. doi: 10.1371/journal.ppat.1006290.
- Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow EL, Jackson B, Chiller T, Vallabhaneni S. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med Mycol.* 1;57(1):1-12, 2019. doi: 10.1093/mmy/myy054.
- Htun ZM, Rotchanapreeda T, Rujirawat T, Lohnoo T, Yingyong W, Kumsang Y, Sae-Chew P,

Payattikul P, Yurayart C, Limsivilai O, Sonthayanon P, Mangmee S, Chongtrakool P, Krajaejun T. *Loop*-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Identification of *Pythium insidiosum*. *Int J Infect Dis*. 101:149-159, 2020. doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.

Jia B, Li X, Liu W, Lu C, Lu X, Ma L, Li YY, Wei C. GLAPD: Whole Genome Based LAMP *Primer* Design for a Set of Target Genomes. *Front Microbiol*. 13; 10:2860, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02860.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 10(3):R25, 2009. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.

Misas E, Chow NA, Gómez OM, Muñoz JF, McEwen JG, Litvintseva AP, Clay OK. Mitochondrial Genome Sequences of the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. *Front Microbiol*. 27; 11:560332, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.560332.

Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. *Loop*-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*. 29;10(8):1931, 2021. doi: 10.3390/cells10081931.

Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. *Loop*-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms. *J Appl Microbiol*. 124(3):626-643, 2018. doi: 10.1111/jam.13647.

Zamith-Miranda D, Heyman HM, Couvillion SP, Cordero RJB, Rodrigues ML, Nimrichter L, Casadevall A, Amatuzzi RF, Alves LR, Nakayasu ES, Nosanchuk JD. Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems*. 31;6(4): e0082221, 2021. doi: 10.1128/mSystems.00822-21.