

## ATIVIDADE PROTEÁSICA E HEMOLÍTICA DOS AGENTES DE CANDIDEMIA NOSOCOMIAL COMO FATORES DE PATOGENICIDADE

Natalice Margareth Teixeira Varela<sup>1</sup>; Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: natalice15@hotmail.com, <sup>2</sup>Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo/pesquisadora do Depto de Ciências Farmacêuticas – CCS – UFPE. E-mail: daniellemacedo28@gmail.com

**Sumário:** A incidência de leveduras do gênero *Candida* nas infecções hematogênicas (candidemia) tem aumentado. Assim, os objetivos deste trabalho foram verificar a ocorrência de candidemia nosocomial em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos do Recife, avaliando as atividades proteásica e hemolítica das cepas isoladas. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas após solicitação médica para diagnóstico micológico. Os testes de atividade proteásica utilizaram meio soro de albumina bovina, para detecção da zona de atividade, sendo classificada como: ausente (-), muito fraca (+), fraca (++) , forte (+++) e muito forte (++++). A avaliação da capacidade hemolítica dos agentes foi realizada em meio ágar sangue de carneiro 5%. Hemólise foi visualizada pela formação de halo ao redor da colônia. Dentre os agentes destacaram-se: *Candida parapsilosis* (17), *C. albicans* (6) e *C. guilliermondii* (1). Todos exibiram alta atividade proteásica, exceto um isolado de *C. parapsilosis* cujo perfil foi muito forte para a enzima. Todos os isolados apresentaram atividade hemolítica, predominantemente do tipo parcial ( $\alpha$ ); contudo, beta-hemólise ocorreu em dois isolados de *C. parapsilosis*. Concluímos que a caracterização enzimática de *Candida* pode ser um útil marcador prognóstico, uma vez que candidemia em pacientes internados pode conduzir ao óbito.

**Palavras-chave:** candidemia; diagnóstico; enzimas; fatores de virulência.

### INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* têm sido descritas como um dos principais agentes de infecção da corrente sanguínea de difícil diagnóstico e associadas a alta morbidade e mortalidade. Sua incidência nas infecções hematogênicas (candidemia) tem aumentado consideravelmente em hospitais terciários brasileiros (2,49 casos por 1.000 admissões), especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI's) e ou de assistência a pacientes críticos (Hinrichsen et al., 2008). Para colonizar, infetar e escapar do sistema de defesa do organismo, as leveduras do gênero *Candida* possuem um repertório de fatores de virulência, o qual inclui: morfologia celular, fatores de adesão, mutação fenotípica, atividade lipolítica, atividade hemolítica e proteásica entre outros (Atalay et al., 2015). Dentre os atributos associados à virulência do gênero *Candida*, destaca-se a elaboração de enzimas proteolíticas e estudos experimentais têm sugerido que elevada produção de proteases é um importante aspecto para interação de *Candida* com o tecido hospedeiro e patogenicidade, relacionando-se com a degradação de componentes teciduais como colágeno, queratina e mucina, além de componentes imunológicos como anticorpos, complemento e citocinas (Bramono et al., 2006). Muitos microrganismos patogênicos utilizam a hemoglobina como fonte de ferro, fundamental para a sobrevivência e o estabelecimento da infecção. Estes patógenos secretam fatores hemolíticos com o objetivo de obter hemoglobina ou o grupo prostético heme como fontes de ferro, a partir da lise de eritrócitos. Pouco se conhece sobre a

atividade hemolítica das espécies de *Candida*, mas sabe-se que o potencial patogênico dessas leveduras pode estar associado a produção de hemolisinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), fator que contribui para a disseminação (Luo et al., 2001; Negri et al., 2010), particularmente facilitando a invasão hifal na candidíase disseminada. Estudos sobre os fatores de virulência e susceptibilidade antifúngica são importantes para desenvolvimento de novos antifúngicos menos tóxicos e também para o conhecimento da relação entre os fatores de virulência e patogenicidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Obtenção das amostras clínicas** - as coletas foram realizadas em pacientes internados em UTIs de acordo com solicitação médica (mediante a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos - CAAE: 01847812.0.00005208). Três amostras de sangue venoso foram coletadas em dias consecutivos, asépticamente por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA e, posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) para diagnóstico laboratorial micológico.

**Realização do diagnóstico micológico** - após a obtenção das amostras foram preparadas lâminas sem adição de corante ou clarificante e, quando necessário, coradas com Giemsa. Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (Difco) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30°C e 37°C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e identificadas.

**Identificação dos isolados** - os isolados foram identificados de acordo com as características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas (Kurtzman; Fell, 1998; Barnnet et al., 2000; Hoog; Guarro, 2000), sendo posteriormente listadas as espécies mais comumente isoladas.

**Deteção da atividade proteásica dos agentes etiológicos** - foi utilizado o meio indutor contendo soro de albumina bovina (BSA, fração V, Sigma, St Louis, MO) como substrato. As leveduras foram suspensas em 1,0mL de água destilada esterilizada e contadas em câmara de Neubauer obtendo-se concentração de  $10^6$  células/mL. Posteriormente, foram inoculadas em poços no referido meio de cultura e incubadas a temperatura de 37°C, com o objetivo de detectar a formação de um halo transparente. O teste foi realizado em triplicata com leitura ao final de sete dias e cálculo da zona de atividade (ZA) que equivale à relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de precipitação. Os valores da ZA foram agrupados em quatro classes: (-): ausência de atividade hemolítica; (+): atividade proteásica muito fraca; (++) : atividade proteásica fraca; (+++) : atividade proteásica forte; (++++): atividade proteásica muito forte (Kantarcioglu; Yucel, 2002).

**Avaliação da capacidade hemolítica dos agentes etiológicos** - A detecção do fator hemolítico dos isolados de *Candida* obtidos das amostras clínicas de sangue foi realizada segundo Luo et al. (2001). Cada uma das amostras foi inoculada na superfície do meio de cultura contendo ágar Mueller Hinton e 7% de sangue de carneiro desfibrinado, pH ajustado a  $5,6 \pm 0,2$  e incubadas a 37°C por 48 horas. A presença de hemólise foi visualizada pela formação de halo ao redor da colônia (halo transparente no meio=beta hemólise, halo esverdeado=alfa hemólise e ausência de halo=gama hemólise). Como controle positivo foi utilizado *C. albicans* (ATCC 10231) para qual é sabido o potencial hemolítico.

**Estocagem dos isolados clínicos de *Candida*** - Os isolados identificados e caracterizados quanto aos fatores de virulência propostos serão estocados na Coleção de Culturas Micoteca URM (UFPE), sob óleo mineral segundo Sherf (1943). No momento, a Coleção passa por reformas, ficando a realização desta etapa para período breve.

## RESULTADOS

A partir de autorização prévia pelo Comitê de Ética em Pesquisas, foram obtidos 24 isolados de *Candida* provenientes de pacientes internados nas UTIs. As leveduras foram identificadas por diagnóstico micológico clássico, sendo posteriormente foram avaliadas pelo sistema MALDI-TOF MS (espectrometria de massa), para confirmação taxonômica. Dos 24 isolados, 17 foram identificados como *Candida parapsilosis*, 06 como *C. albicans* e apenas um como *C. guilliermondii*. Quanto à atividade hemolítica, o padrão predominante foi a  $\alpha$ -hemólise, principalmente nas colônias incubadas a 37°C (Tabela 1). Todos os nossos isolados clínicos de *Candida* testados apresentaram atividade proteásica forte com exceção do isolado 05/09 de *C. parapsilosis* o qual expressou atividade proteásica muito forte (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade hemolítica a temperatura ambiente e a 37°C e atividade proteásica dos agentes etiológicos de candidemia diagnosticados em pacientes internados em UTIs de hospitais públicos de Recife-PE no período de Agosto de 2014 a Junho de 2015.

Isolados clínicos	Atividade Hemolítica		Atividade proteásica
	Temperatura ambiente	37°C	
ATCC 10231 ( <i>Candida albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
121 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
122 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
02/09 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
251 ( <i>C. parapsilosis</i> )	$\alpha$ – hemólise	$\alpha$ – hemólise	+++
04/09 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
05/09 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	++++
629 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
630 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
5551 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
7398 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\beta$ – hemólise	+++
7736 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
7755 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	++
7798 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
12680 ( <i>C. parapsilosis</i> )	$\alpha$ – hemólise	$\beta$ – hemólise	+++
14659 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
13531( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
9968 ( <i>C. parapsilosis</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
99 ( <i>C. albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
383 ( <i>C. albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++

*7184 (n° URM)			
59 ( <i>C. albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
1302092 ( <i>C. albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
653 ( <i>C. albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
343 ( <i>C. albicans</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	+++
633 ( <i>C. guilliermondii</i> )	-	$\alpha$ – hemólise	++

(-): ausência de atividade hemolítica; (+): atividade proteásica muito fraca; (++) : atividade proteásica fraca; (+++): atividade proteásica forte; (++++): atividade proteásica muito forte. \*isolado estocado na Coleção Micoteca URM/UFPE.

## DISCUSSÃO

A atividade hemolítica representa um mecanismo de captação do ferro e expressa a capacidade da levedura em destruir as hemácias, o que se verificou pela participação ativa das leveduras nesse processo, expressando hemólise parcial e completa, corroborando com os resultados de França et al. (2010). Segundo Zaugg et al. (2001), nutrientes contidos no BSA resultam em níveis elevados de protease, demonstrando a qualidade do substrato utilizado. As atividades proteásicas mais fracas foram apresentadas por 633 (*C. guilliermondii*) e 7755 (*C. parapsilosis*). Segundo Mohan (2008), a virulência dessas espécies de leveduras não pode definida por um único fator isoladamente, mas sim por uma combinação deles. Ademais, *C. guilliermondii* é discutida como sendo parte da microbiota humana, de baixa patogenicidade.

## CONCLUSÕES

No presente estudo as espécies *C. parapsilosis* e *C. albicans* e foram as leveduras mais isoladas de casos de candidemia, com isolamento da espécie emergente *C. guilliermondii*. Todas foram produtoras de hemolisinas e proteases, com destaque para a espécie *C. parapsilosis*, já citada na literatura como sendo a mais envolvida a biofilmes e dispositivos médico-invasivos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Micologia pelo suporte financeiro e instalações.

## REFERÊNCIAS

- ATALAY, M., KOC, A. et al. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. 2015, 10.4103/1119-3077.146979
- BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.
- BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2006, 59: 73-76.
- HINRICHSEN, S.L et al. Phospholipase and protease activity in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002, 5: 160-165.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39: 2971-2974.