

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNO-  
ENZIMÁTICO (ELISA) PARA DIAGNÓSTICO  
LABORATORIAL DE CANDIDEMIAS**

Dissertação de Mestrado

CRISTINE SOUZA GOEBEL

Porto Alegre, 2007.

**CRISTINE SOUZA GOEBEL**

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNO-  
ENZIMÁTICO (ELISA) PARA DIAGNÓSTICO  
LABORATORIAL DE CANDIDEMIAS**

**Dissertação submetida como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre no Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular, Centro de Biotecnologia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

**Orientadora  
Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein**

**Porto Alegre  
2007**

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto recebeu apoio financeiro da FAPERGS, através do Edital PROCOREDES II.**

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marilene Henning Vainstein, pela acolhida, apoio e orientação.

À comissão de acompanhamento, Professores Dr. Augusto Schrank e Dr. Henrique Ferreira, pelas sugestões no decorrer do trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

À Professora Dra. Patrícia Valente, pelo fornecimento de algumas espécies de *Candida* da coleção da Microbiologia- UFRGS.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, João Antônio, Dr. Afonso Barth e Valério Aquino, pela colaboração neste trabalho, pois sem eles, o mesmo não seria realizado.

À FAPERGS, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial Sílvia, Luciano, Milton e Paulo.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios 222, 217, 210 e 206, pelas ajudas e ensinamentos.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios 220 e 218 Alexandre, Fernanda Cunha, Walter, Lucélia, Simone, Irina, Josiane, Letícia, Juliana, Lusia, Roberta, Felipe, Gustavo, Eder, Juliana, Juliano, Emanuel, Fernanda, Tanara, Luisa, Karina, pela paciência, amizade e ensinamentos, e em especial à Lívia pela acolhida, amizade, explicações desde minha entrada no Centro de Biotecnologia, à Márcia pelos ensinamentos e apoio no decorrer do trabalho, à Cláudia pela coleta sangüínea dos alunos e funcionários do Centro de Biotecnologia, pois sem isso não haveria soros para desenvolver o trabalho, à Bianca e Tatiana pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

A todos meus amigos e amigas pela paciência, amizade e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais pelo amor e apoio sempre.

À Deus.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivo específico .....	4
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
3.1 Histórico e características gerais.....	5
3.2 Principais espécies e características.....	7
3.3 Vias de infecção por <i>Candida</i> sp.....	9
3.4 Fatores de risco para infecções hematogênicas por <i>Candida</i> spp.....	11
3.5 Diagnóstico .....	12
3.6 Resposta imune contra <i>Candida</i> sp.....	17
3.7 Epidemiologia–Aspectos gerais.....	19
3.8 Epidemiologia mundial.....	20
3.9 Epidemiologia no Brasil e na América Latina.....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 Linhagens de <i>Candida</i> spp. utilizadas na produção do extrato protéico total .....	27
4.2 Anticorpos Primários- Soros de pacientes com candidemia.....	28
4.3 Extração de DNA.....	29
4.4 PCR espécie-específica.....	29
4.5 Cultivo das linhagens tipo <i>Candida</i> sp. para a produção do extrato protéico total ..	31
4.6 Preparo dos extratos protéicos totais .....	31
4.7 Determinação da concentração de proteínas.....	32
4.8 ELISA (Ensaio Imuno-Enzimático).....	32
4.9 Preparo das amostras para eletroforese.....	33

4.10 Eletroforese em gel desnaturante .....	34
4.11 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose.....	34
4.12 <i>Western blotting</i> .....	35
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
5.1 Produção de antígenos protéicos totais .....	36
5.2 Análise dos antígenos protéicos totais .....	37
5.3 Anticorpos primários .....	38
5.4 Confirmação das espécies de <i>Candida</i> por PCR espécie-específica .....	41
5.5 Padronização ensaio imuno-enzimático (ELISA).....	44
5.6 Teste de ELISA para os soros de pacientes com candidemia e pacientes hígidos ...	48
5.7 <i>Western blotting</i> .....	52
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1-</b> Lesão ocular ocasionada por <i>Candida</i> .....	2
<b>FIGURA 2-</b> Microscopia de algumas das principais espécies de <i>Candida</i> relacionadas com infecção clínica.....	6
<b>FIGURA 3-</b> Coloração de Gram de <i>Candida albicans</i> mostrando brotamentos e pseudo-hifas.....	6
<b>FIGURA 4-</b> Colônia característica de <i>Candida</i> .....	7
<b>FIGURA 5-</b> Principais componentes do micélio e da levedura de <i>Candida albicans</i> utilizados no diagnóstico sorológico de candidemia.....	14
<b>FIGURA 6-</b> Análise em SDS-PAGE dos antígenos totais extraídos das principais espécies de <i>Candida</i> em infecção de corrente sanguínea.....	37
<b>FIGURA 7-</b> PCR espécie-específica para identificação de <i>Candida</i> spp.....	41
<b>FIGURA 8-</b> Esquema da organização genômica do rDNA 18S, ITS1, rRNA 5.8S, ITS2 e rRNA 26S.....	42
<b>FIGURA 9-</b> Padronização da concentração de antígeno e diluição de anticorpo primário para o teste de ELISA.....	46
<b>FIGURA 10-</b> Gráfico representativo de ELISA das principais espécies de <i>Candida</i> em infecção de corrente sanguínea.....	49
<b>FIGURA 11-</b> Análise por <i>western blotting</i> dos antígenos totais referentes às principais espécies de <i>Candida</i> em infecção de corrente sanguínea.....	53

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1-</b> Deficiências na defesa do hospedeiro que predis põem os pacientes às infecções fúngicas específicas .....	18
<b>TABELA 2-</b> Linhagens das principais espécies de <i>Candida</i> envolvidas em infecção de corrente sangüínea, utilizadas para a produção dos extratos protéico totais no presente trabalho .....	27
<b>TABELA 3-</b> Características dos cultivos das linhagens de <i>Candida</i> spp. na produção dos antígenos totais .....	36
<b>TABELA 4-</b> Dados referentes aos pacientes com infecção de corrente sangüínea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, dos quais foram coletados soros .....	39
<b>TABELA 5-</b> Soros de indivíduos hígidos obtidos no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul .....	40
<b>TABELA 6-</b> Resultados da PCR espécie-específica .....	43
<b>TABELA 7-</b> Resultados dos testes de ELISA e da PCR espécie-específica para os soros de pacientes com candidemia obtidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre .....	51



**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

AFLP - Polimorfismo do tamanho do fragmento amplificado

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ATCC – *American Type Culture Collection*

Blotto – *Bovine lacto transfer technique optimizer*

BSA – Albumina sérica bovina

CBS - *Centraalbureau Voor Schimmelcultures*

CCRC - *Culture Collection and Research Center*

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade óptica

ECMM – *European Confederation of Medical Mycology*

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EUA – Estados Unidos da América

°C – Graus Celsius

g/L - Gramas por litro

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

ICS - Infecção de corrente sanguínea

IFO- *Institute for Fermentation Culture Collection*

ITS – Espaçador transcrito interno

JCM- *Japan Collection of Microorganisms*

kDa - Quilodalton

MIC – Concentração inibitória mínima

®- Marca Registrada

mA- Miliampère

M - Molar

µg - Micrograma

mL Mililitro

mM - Milimolar

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{g/mL}$  – Microgramas por mililitro

NAC - Espécies de *Candida não-albicans*

NRRL- *Agricultural Research Service Culture Collection*

nm - Nanômetro

n° - Número

OPD – Ortofenilenodiamina

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pb – Par de base

pH - Potencial hidrogeniônico

p/v – Peso por volume

RAPD- DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

RNA – Ácido ribonucléico

RNase- Ribonuclease

rRNA – Ácido ribonucléico ribossômico

rpm – Rotações por minuto

SDS- Dodecilsulfato de sódio

Th – T *helper*

TCA - Ácido tricloroacético

TEMED- N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina

UFC- Unidades formadoras de colônia

UTI- Unidade de tratamento intensivo

UV - Ultravioleta

V - Volts

v/v - Volume por volume

## RESUMO

O gênero *Candida* acomete cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções na corrente sanguínea. Espécies de *Candida* não-*albicans* respondem atualmente por pelo menos 50% das infecções invasivas por *Candida* spp, apresentando peculiaridades em termos clínicos e suscetibilidade a drogas antifúngicas. A mortalidade geral de fúngias por *Candida* spp é da ordem de 40-60%, tornando esta complicação infecciosa um grande desafio aos clínicos. O objetivo deste estudo foi a padronização de um ensaio imuno-enzimático (ELISA) para o diagnóstico de infecções hematogênicas devido a *Candida* spp. Vinte e cinco soros de pacientes com candidemia obtidos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e trinta e dois soros de indivíduos hígidos obtidos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram analisados. Foram utilizados os extratos protéicos totais de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei* como antígenos. Nossos resultados demonstraram reatividade cruzada entre as espécies bem como alguns resultados falso-negativos. Estes resultados falso-negativos podem ser devido a resposta imune do paciente estar atrasada, diminuída ou ausente. Isto pode ser melhorado com amostras seriadas do mesmo paciente. Os resultados falso-positivos podem ser minimizados selecionando-se antígenos específicos apropriados, moléculas purificadas ou antígenos recombinantes.

**Palavras-chave:** *Candida* spp, diagnóstico de candidemia, ELISA.

## ABSTRACT

*Candida* spp is associated to almost 80% of all nosocomial fungal infections and is considered a major cause of blood stream infections. This yeast is the fourth most common cause of blood stream infections in the United States, where this agent is responsible for 8% of all invasive infections documented in this site and the crude mortality rate is between 40 and 60%. At the present, non-*albicans* species are related to at least 50% of all invasive infections due to *Candida* spp and they present differences in terms of clinical outcome as well as susceptibility to antifungal drugs. Nevertheless, the hematogenous infections due to *Candida* spp diagnosis remain an important challenge for all clinicians. The objective of this study was the standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to diagnose hematogenous infections due to *Candida* spp. Twenty five sera of patients with candidaemia from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a general tertiary care hospital in Southern Brazil and thirty two sera from healthy people from Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul were analyzed. As antigens for ELISA, protein extracts from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* and *Candida krusei* were used. Our results had demonstrated cross-reactivity between species as well as some false-negatives. These false-negatives may be due to a delayed, reduced or absent antibody response, which might be improved increasing the number of samples tested. The false-positives can be improved by selecting more appropriate specific antigens, as purified molecules or recombinant antigens.

**Key words:** *Candida* spp; candidaemia diagnose; ELISA.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento de pacientes imunocomprometidos, os fungos têm emergido como a maior causa de doenças humanas, causando infecções quando as defesas do hospedeiro estiverem debilitadas (SHOHAM & LEVITZ, 2005). Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas, mas apenas um pequeno número, aproximadamente 10%, é conhecido como patógenos de seres humanos (EGGIMANN *et al.*, 2003; WARNOCK, 2007).

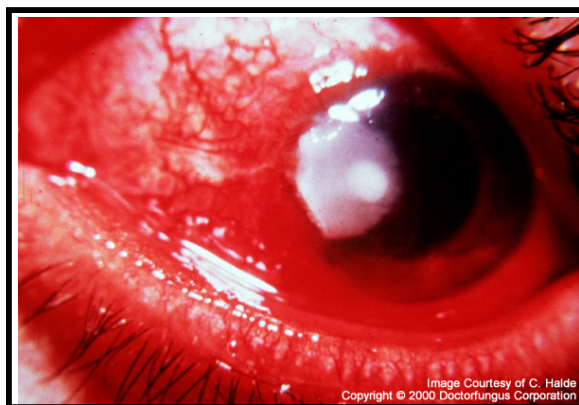
As espécies do gênero *Candida*, principalmente e particularmente *Candida albicans*, fazem parte da microbiota humana da pele, da cavidade bucal, do trato gastrointestinal, do trato genitourinário e do trato respiratório (EGGIMANN *et al.*, 2003; LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004; (SHOHAM & LEVITZ, 2005; GALVÁN & MARISCAL, 2006; DIMOPOULOS *et al.*, 2007). Dados relatados por COLOMBO & GUIMARÃES (2003), indicam que espécies de *Candida* são encontradas no trato gastrointestinal de 20 a 80% da população adulta saudável e as mulheres apresentam de 20 a 30% colonização vaginal.

A transição da forma comensal desta levedura para a forma patogênica acontece caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo, doenças degenerativas, neoplásicas, hematológicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, transplantes, imunodepressão induzida por atos médicos, uso de antibióticos de amplo espectro, uso de quimioterapia ou corticóides. O comprometimento das barreiras anatômicas, como, por exemplo, por procedimentos cirúrgicos, principalmente cirurgia abdominal, nutrição parenteral, uso de cateter venoso central e queimaduras também podem ocasionar esta transição (GALVÁN & MARISCAL, 2006).

As infecções por *Candida* variam desde as formas mais superficiais, como infecções cutâneas e mucocutâneas, até as formas mais invasivas, como endoftalmite, endocardite e infecções hematogênicas (EGGIMANN *et al.*, 2003; LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004; FILLER & SHEPPARD, 2006).

Entre as infecções invasivas, vale salientar a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea (ICS), complicação esta conhecida como candidemia ou candidose hematogênica que pode ou não se disseminar para um ou vários órgãos e tecidos.

Os sintomas clínicos da ICS por *Candida* são muitas vezes inespecíficos e o quadro clínico de febre, calafrios, mialgia, lesões cutâneas e endoftalmite é semelhante ao de sepse bacteriana (UZUN *et al.*, 2001). No entanto, o padrão clínico mais freqüente é a febre não responsiva à antibiótico-terapia de amplo espectro. As lesões oculares (Figura 1) podem aparecer sob forma de lesões algodonosas na retina e podem ocorrer em 10 a 30% dos casos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).



**Figura 1.** Lesão ocular ocasionada por *Candida*. Fonte: Banco de imagens, DoctorFungus. *Candida*. Disponível em: <http://www.doctorfungus.org/imageban> (Acesso em 01/10/2007).

Nas últimas décadas, a incidência em torno de 80% das infecções por *Candida* no ambiente hospitalar, a relação desta levedura em casos de ICS e as altas taxas de mortalidade começaram a chamar atenção da área médica (AQUINO *et al.*, 2005), além do maior tempo de internação destes pacientes e do alto custo médico (CHENG *et al.*, 2005; SENDID *et al.*, 2006; TORTORANO *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 2007). Em alguns hospitais americanos, é estimado o custo de 40.000 dólares/ano por paciente devido ao amplo uso de drogas antifúngicas e pela prolongação da estadia no hospital superando 30 dias (YERA *et al.*, 2001; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; SENDID *et al.*, 2006).

*C. albicans* é a espécie mais prevalente de ICS, no entanto, nos últimos 5-15 anos, o número de espécies de *Candida* não-*albicans* (NAC) tem aumentado consideravelmente (BASSETI *et al.*, 2006), chegando a ser reportados casos onde espécies NAC atingiram metade, ou até mesmo, a maioria dos casos de ICS, sendo a causa principal deste fato o uso difundido de antibióticos do grupo azol (COLOMBO *et al.*, 1999; KRCMERY &

BARNES, 2002; AQUINO *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; RUIZ *et al.*, 2005; BASSETI *et al.*, 2006; BEDINI *et al.*, 2006).

Algumas espécies NAC como, por exemplo, *Candida krusei* e *Candida glabrata*, apresentam resistência às principais drogas antifúngicas do grupo azol (WARNOCK, 2007).

Dessa forma, o estudo de ICS devido a *Candida* spp. é de extrema relevância por apresentar uma alta incidência, altas taxas de mortalidade, longos períodos de internação hospitalar e altos custos médicos. Além disso, o diagnóstico de ICS em nível de espécie é muito importante devido às peculiaridades apresentadas de cada espécie em relação ao ponto de vista terapêutico e epidemiológico para uma melhor abordagem terapêutica e para monitoramento das infecções hospitalares, respectivamente. No entanto, os métodos convencionais de identificação destas leveduras não são completos ou apresentam falhas como, por exemplo, falta de sensibilidade ou especificidade, ou às vezes requerem procedimentos invasivos que não podem ser executados devido às condições clínicas de alguns pacientes, além da falta de características clínicas definidas desta doença, o que tornam o diagnóstico um grande desafio, demonstrando, então, a necessidade de serem pesquisados outros métodos para diagnóstico da candidemia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi a padronização de um teste imuno-enzimático (ELISA) para diagnóstico e/ou acompanhamento sorológico dos pacientes acometidos por infecção de corrente sanguínea causada por *Candida* spp.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Confirmar a identificação das linhagens de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida guilliermondii* (ATCC 46036), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida dubliniensis* (MYA-646) e *Candida krusei* (ATCC 749) por PCR espécie-específica;
- b) Produzir extratos antigênicos totais destas linhagens de *Candida*;
- c) Montar uma soroteca de pacientes com candidemia;
- d) Desenvolver e padronizar teste sorológico, por meio do uso do teste de ELISA para *Candida*, a fim de diferenciar pacientes com e sem candidemia, diferenciar, entre os pacientes com candidemia, pacientes com *C. albicans* de *Candida* não-*albicans* e, posteriormente, diferenciar as principais espécies que causam candidemia.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

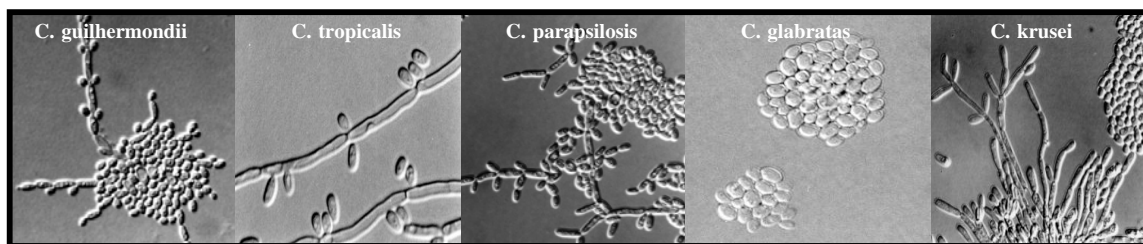
#### 3.1 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS GERAIS

Em 1842, foram identificadas lesões na cavidade bucal de crianças, denominadas de sapinho, sendo, nove anos mais tarde, caracterizado *Oidium albicans* como agente etiológico desta moléstia. Esta denominação, juntamente com a denominação dada por Zopf de *Monilia albicans*, foram utilizadas até 1923, quando foi criado o gênero *Candida*, que permanece até a atualidade (ODDS, 1979; SIDRIM & ROCHA, 2004).

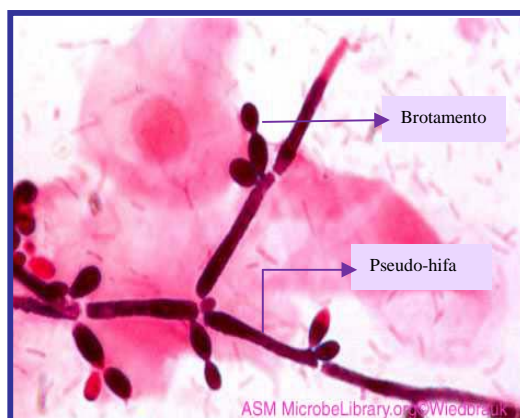
Existem mais de 100.000 espécies de fungos, que, por possuírem características específicas, como ausência de celulose e pigmento fotossintético e presença de glicogênio, constituem um reino denominado atualmente *Fungi* (GUARRO, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Por ser dinâmica e progressiva, a taxonomia de fungos freqüentemente requer troca na nomenclatura, o que muitas vezes dificulta o entendimento para profissionais da área médica. Em geral, a classificação e identificação dos agentes etiológicos fúngicos é baseada em aspectos macro e micromorfológicos da fase assexuada, pois o conhecimento da fase sexuada é pouco observado. (GUARRO, 1999).

As leveduras do gênero *Candida* pertencem à divisão *Ascomycota* e família *Sacharomycetaceae* (GUARRO, 1999). Existem aproximadamente 200 espécies de *Candida* (SHOHAM & LEVITZ, 2005) distribuídas na natureza como, por exemplo, em plantas e na microbiota normal de mamíferos e aves. No entanto, aproximadamente 10% das espécies de *Candida* têm importância clínica como agente de micoses em seres humanos (EGGIMANN *et al.*, 2003). As principais espécies relacionadas a infecções clínicas incluem *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida lusitaniae* e *Candida guilliermondii* (SLAVIN, 2002; EGGIMANN *et al.*, 2003) (Figura 2). Estas leveduras reproduzem-se primariamente por brotamento dando origem aos blastoconídios, podendo algumas vezes desenvolver estruturas alongadas denominadas pseudo-hifas ou ainda hifas com septos regulares (LACAZ *et al.*, 2002) (Figura 3).



**Figura 2.** Microscopia de algumas das principais espécies de *Candida* relacionadas com infecções clínicas (HOOG *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Coloração de Gram de *Candida albicans* mostrando brotamentos e pseudo-hifas. Fonte: Microbe Library. Disponível em: [http://www.telmeds.org/AVIM/Amico/Levaduras/images\\_levaduras/candida/candida200.jpg](http://www.telmeds.org/AVIM/Amico/Levaduras/images_levaduras/candida/candida200.jpg) (Acesso em 01/10/2007).

As espécies de *Candida* crescem em aerobiose e suportam pH entre 2,5 e 7,5 e temperatura de 20 a 38°C, sendo que o crescimento ótimo das espécies patogênicas pode ser observado entre 35 e 37°C. As colônias se desenvolvem bem em meios de Sabouraud e ágar sangue e são de textura cremosa, membranosas e úmidas, não formando hifas aéreas (LACAZ *et al.*, 2002) (Figura 4).



**Figura 4.** Colônia característica de *Candida*. Fonte: Banco de imagens, DoctorFungus. *Candida*. Disponível em: <http://www.doctorfungus.org/imageban> (Acesso em 01/10/2007).

### 3.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES E CARACTERÍSTICAS

*C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo (WARNOCK, 2007). Esta levedura apresenta como principais fatores de patogenicidade e virulência, a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (YANG, 2003). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, no entanto, casos de resistência adquirida aos azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

*Candida dubliniensis* foi reconhecida como uma nova espécie por SULLIVAN *et al.* (1995) em um estudo onde 17 a 35% dos pacientes com infecção por HIV/AIDS estavam colonizados ou infectados por este agente em cavidade bucal, na Irlanda. As características morfológicas e bioquímicas desta espécie são muito semelhantes a *C. albicans*, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las (SULLIVAN *et al.* 1995). Atualmente, ainda são raros os casos de doenças sistêmicas relacionadas a esta nova espécie, estando a maior parte destes associados a infecções de mucosa bucal e, aparentemente, esta espécie emergente é menos patogênica do que a *C. albicans*, mas tem

maior facilidade em desenvolver resistência aos azólicos, particularmente ao fluconazol (SULLIVAN & COLEMAN, 1998).

Em países da América Latina, principalmente no Brasil, *C. tropicalis* é extremamente freqüente, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia e possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos, danos na mucosa gastrointestinal e transplantes de medula óssea (WARNOCK, 2007). Esta espécie também é relatada também em pacientes com linfoma, leucemia e diabetes, sendo sua freqüência maior em leucemias e menor em tumores sólidos (DIMOPOULOS *et al.*, 2007). Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e, na grande maioria, aos triazólicos (KRCMEY & BARNES, 2002).

*C. parapsilosis* é outro importante patógeno hospitalar, sendo reconhecida como a segunda principal causa de infecção na corrente sanguínea em países da América Latina (WARNOCK, 2007). Sua ocorrência é ainda maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de tratamento intensivo, onde a prevalência de infecções na corrente sanguínea por *C. parapsilosis* é de 17% a 50% dos casos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; AQUINO *et al.*, 2005). Esta espécie também apresenta uma alta associação com o uso de cateter intravenoso e nutrição parenteral (GALVÁN & MARISCAL, 2006). Embora *C. parapsilosis* esteja associada ao uso de cateter venoso central, há uma controvérsia se este deveria ser então removido ou não. Alguns autores sugerem que o cateter venoso central deveria ser removido sempre que possível, desde que esteja associado com uma falha no tratamento e mortalidade alta, enquanto outros preferem tentar terapia antifúngica sem a remoção do cateter (KARTHAUS & CORNELLY, 2007). Contudo, *C. parapsilosis* apresenta uma baixa mortalidade quando comparada com a *C. albicans*. A explicação para este fato pode estar relacionada à baixa virulência da *C. parapsilosis* em modelos animais, a incapacidade de aderir e penetrar o endotélio de células humanas e a sua suscetibilidade à fagocitose (AQUINO *et al.*, 2005). Esta espécie também é reconhecida pela sua capacidade de se desenvolver em soluções contendo glicose e de produzir biofilme (AQUINO *et al.*, 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

*C. glabrata* é a segunda ou terceira espécie mais comum de ICS relatada nos EUA e na Europa e os isolados clínicos desta espécie apresentam menor sensibilidade ao

fluconazol (WARNOCK, 2007). Conseqüentemente, um aumento nos índices de infecção por *C. glabrata* tem sido observado em diferentes grupos de pacientes expostos prolongadamente a este antifúngico (GALVÁN & MARISCAL, 2006; SENDID *et al.*, 2006). Há também relatos da menor suscetibilidade de isolados desta espécie em relação a anfotericina B. Em uma análise envolvendo 949 isolados clínicos de *C. glabrata*, observou-se que cerca de 53% das amostras apresentaram concentração inibitória mínima (MIC) muito maiores que 1mg/mL, valores estes considerados muito elevados para a terapêutica com doses convencionais deste medicamento (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

*C. krusei* tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea e estudos indicam também um aumento da ocorrência desta espécie em pacientes neutropênicos expostos prolongadamente ao fluconazol (WARNOCK, 2007).

*C. guilliermondii* faz parte da microbiota humana da pele e mucosas, mas ocasionalmente pode causar onicomicose, osteomielite, endocardite, fungemia e infecções invasivas. No entanto, infecções de corrente sanguínea são ainda infreqüentes e a maioria dos casos descritos se relaciona a pacientes com câncer (GIRMENIA *et al.*, 2006).

### 3.3 VIAS DE INFECÇÃO POR *Candida* sp.

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta freqüência com que colonizam e infectam hospedeiros humanos. Por exemplo, espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20-80% da população adulta saudável e entre as mulheres, cerca de 20-30% apresentam colonização vaginal por espécies deste mesmo gênero (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento das barreiras anatômicas. Estas alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem estar associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, uso de antibióticos e imunossupressão induzida por atos médicos, e o comprometimento das barreiras anatômicas podem estar associadas a queimaduras, procedimentos médicos invasivos, nutrição parenteral ou uso de cateter venoso central (GALVÁN & MARISCAL, 2006).

Infecções por *Candida* sp. podem envolver desde doenças superficiais a invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco (LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004). Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer órgãos como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo (FILLER & SHEPPARD, 2006).

Acredita-se que a maioria dos casos de ICS por *Candida* sp. seja adquirida por via endógena, principalmente pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal. Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador desta translocação de *Candida* (GALVÁN & MARISCAL, 2006).

A origem endógena da ICS por *Candida* sp. foi originalmente sugerida por KRAUSE *et al.* (1969), quando ele ingeriu uma solução de *Candida* sp. na concentração de  $10^{12}$  (UFC) e, após duas horas, apresentou culturas de sangue e urina com a levedura. Com esse experimento, os pesquisadores deduziram que *Candida* sp. provinda do intestino pode causar infecção sistêmica em duas etapas distintas. Primeiramente, através da translocação do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea e, posteriormente, pela invasão de outros órgãos. No experimento de Krause, esta segunda etapa foi prevenida pela administração de altas doses de nistatina oral após a ingestão da suspensão de *Candida*.

A colonização da membrana mucosa por *Candida* sp. tem sido demonstrada como indutora da candidemia, sustentando a colonização como um pré-requisito para subsequente infecção sistêmica (EGGIMANN *et al.*, 2003).

A aquisição exógena de *Candida* causando candidemia também é postulada, apresentando um significativo aumento do risco quando associada a recursos intravasculares e nutrição parenteral (GALVÁN & MARISCAL, 2006). Esta aquisição exógena também pode estar vinculada ao contato com as mãos dos profissionais da área da saúde, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração de soluções contaminadas (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

### 3.4 FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES HEMATOGÊNICAS POR *Candida* spp.

Alguns fatores, como quimioterapia, uso de corticosteróides e neutropenia, agem primariamente causando imunossupressão, enquanto outros estão associados a quebra de barreiras de proteção como cateteres vasculares, queimaduras e uso de soluções parenterais, os quais facilitam a invasão e conseqüente infecção por leveduras (BOTA *et al.*, 2004).

Um fato importante a ser comentado se refere à incidência de pacientes com ICS por *Candida* no início e após a sua internação. No momento da internação somente 5-10% dos pacientes apresentam infecção por *Candida*, mas irremediavelmente esta proporção aumenta com o tempo de internação e exposição aos fatores de risco, podendo chegar a 50-86% em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (EGGIMANN *et al.*, 2003).

Qualquer fator que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* spp. aos capilares mesentéricos. Sendo assim, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida* sp. (uso de antibióticos, neutropenia) ou determinem atrofia ou lesão das mucosas intestinais (nutrição parenteral, quimioterapia), podem potencializar o fenômeno de translocação no trato gastrointestinal (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). A neutropenia é um importante fator de risco para ICS por *Candida* sp., uma vez que as leveduras tendem a invadir os tecidos na deficiência de neutrófilos, células essenciais para a fagocitose de um grande número de fungos oportunistas (EGGIMANN *et al.*, 2003). O uso de antibióticos, previamente ou concomitante a candidemia, favorece o crescimento de leveduras do gênero *Candida* spp no trato gastrointestinal, o que pode também favorecer a translocação para a corrente sanguínea (GALVÁN & MARISCAL, 2006).

Assim, os principais fatores de risco para ICS por *Candida* incluem o uso de drogas imunossupressoras, e/ou um amplo espectro de antibiótico-terapia, uso de corticosteróides, AIDS, prolongada estadia no hospital ou em UTI, injúria na mucosa gastrointestinal, neutropenia, nutrição parenteral, hemodiálise e o uso de cateter venoso central (AQUINO *et al.*, 2005; SHOHAM & LEVITZ, 2005; DIMOPOULOS *et al.*, 2007). Infecções na corrente sangüínea também estão freqüentemente associadas com intervenções cirúrgicas,

pacientes transplantados, pacientes com tumores sólidos e com doenças hematológicas (TORTORANO *et al.*, 2006).

Muito freqüentemente, *C. albicans* é o principal agente etiológico envolvido em ICS; contudo, espécies NAC cada vez mais têm sido relatadas como uma causa de infecção em pacientes com doenças adjacentes, como doenças hematológicas, infecção por HIV e tumores sólidos. Estes pacientes constituem um grupo de risco para infecções oportunistas por estarem expostos a vários fatores de risco para o desenvolvimento de infecção fúngica sistêmica, devido às terapias específicas e procedimentos diferenciados (AQUINO *et al.*, 2005). Da mesma forma, os pacientes da unidade de tratamento intensivo têm mais riscos de desenvolverem infecções sistêmicas por *Candida* sp., devido aos fatores predisponentes que expõem os pacientes aos diferentes graus de suscetibilidade às infecções por *Candida* (BÄR & HECKER, 2002).

### 3.5 DIAGNÓSTICO

Com o aumento da incidência de infecções sistêmicas por *Candida* sp., uma necessidade urgente de procedimentos diagnósticos se tornou evidente. A identificação da espécie do organismo infectante se tornou muito importante por diversas razões. Primeiro, porque as espécies diferem em relação à suscetibilidade antifúngica. Como exemplo, *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol e *C. glabrata* requer doses maiores deste antifúngico do que as doses convencionais. Segundo, porque a identificação da espécie tem relevância epidemiológica; por exemplo, para monitoramento das taxas de infecções hospitalares. Terceiro, o risco de desenvolvimento da infecção em órgãos profundos e a gravidade da manifestação clínica difere dependendo da espécie infectante; por exemplo, *C. tropicalis* comumente se torna invasiva em pacientes neutropênicos, mas não em transplantados de fígado (ELLEPOLA & MORRISON, 2005). Contudo, o diagnóstico da infecção sistêmica por *Candida* permanece apresentando muitas dificuldades e desafios a serem superados.

Seis procedimentos principais são recomendados para a identificação de ICS por *Candida*: apresentação clínica, cultura, detecção de antígenos circulantes, detecção de



metabólitos circulantes, detecção de anticorpos e métodos moleculares (BÄR & HECKER, 2002). Porém, todos os métodos mencionados acima têm seus inconvenientes.

Iniciamos pela apresentação clínica do paciente, a qual é baseada principalmente em febre e calafrios não responsivos à antibióticos, sendo muitas vezes inespecíficos (PERSAT *et al.*, 2002; BÄR & HECKER, 2002; EGGIMANN *et al.*, 2003), não diferindo uma bacteremia de uma fungemia. Seguimos então pela hemocultura, cultivo ou cultura do sangue, que utiliza meios bifásicos como o Isolator®, através do método de lise-centrifugação, e métodos automatizados como BactAlert® ou Bactec® que detectam o crescimento de fungos, emitindo um sinal de alerta. No entanto, eles apresentam além de baixa sensibilidade (YERA *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2005; SENDID *et al.*, 2006; LAÍN *et al.*, 2007b), a necessidade de amostras de 20mL de sangue do paciente, o que nem sempre é obtido (ELLEPOLA & MORRISON, 2005). Além disso, apenas apresenta resultados positivos com mais do que  $10^4$  células de microrganismos/mL de sangue e pode demorar até 48 h para a obtenção do resultado, apenas indicando o crescimento de um microrganismo, sem a identificação da espécie do mesmo. Contudo, o padrão de identificação de infecções sistêmicas por *Candida* sp. é a cultura de sítios estéreis como sangue e tecidos de biópsias (BÄR & HECKER, 2002).

A detecção de anticorpos tem valor limitado pelos resultados falso-negativos em pacientes imunocomprometidos, que apresentam uma resposta imune baixa ou indetectável onde a produção de anticorpos varia de acordo com o estado imune do paciente, e pelos resultados falso-positivos que podem ocorrer em indivíduos hígidos, como resultado de colonização comensal (QUINDÓS *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2005). Na tentativa de reduzir estes resultados falso-positivos, alguns pesquisadores têm desenvolvido testes para detectar anticorpos diretamente contra os antígenos citoplasmáticos (LAÍN *et al.*, 2007b) ou antígenos da fase filamentosa (BIKANDI *et al.*, 1998). Em relação aos resultados falso-negativos, a detecção de anticorpos para o grupo de pacientes imunocomprometidos pode ser menos útil. Contudo, pacientes imunocomprometidos podem ter antígeno em excesso, tornando a detecção de antígenos uma estratégia potencialmente melhor para o diagnóstico de ICS por *Candida* (ELLEPOLA & MORRISON, 2005).

As limitações citadas acima também podem ser superadas através da melhora da especificidade destes testes utilizando antígenos apropriados (moléculas purificadas ou

antígenos recombinantes) e a sensibilidade pode ser aumentada utilizando técnicas mais sensíveis e padronizadas como ELISA (QUINDÓS *et al.*, 2004).

Já no diagnóstico baseado na detecção de antígenos e metabólitos, os resultados apresentam pouca sensibilidade e diagnóstico equivocado pelo fato de serem rapidamente retirados da circulação sanguínea. Com relação aos antígenos, a *C. albicans* apresenta uma grande complexidade antigênica que se localizam basicamente no citoplasma e na parede celular. Os antígenos citoplasmáticos mais importantes para o diagnóstico sorológico da ICS por *Candida* são a enolase e um antígeno de 47 kDa referente a um fragmento de uma proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90). Em relação aos antígenos da parede celular devemos ressaltar a manana, que é um polissacarídeo muito abundante nas leveduras e nos micélios de *C. albicans* e um antígeno específico do micélio de alta massa molecular (>260 kDa) (POTÓN, 2006) e altamente imunogênico para humanos (QUINDÓS *et al.*, 2004). Com relação aos componentes não antigênicos (metabólitos circulantes) podemos citar o D-arabinitol, o  $\beta$ -1,3 glicana e o DNA que são liberados durante a infecção e podem ser de utilidade diagnóstica (POTÓN, 2006) (Figura 5).

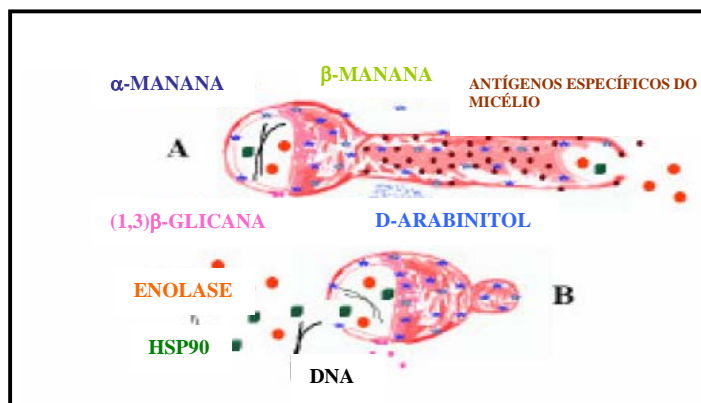


Figura 5- Principais componentes do micélio (A) e da levedura (B) de *C. albicans* utilizados no diagnóstico sorológico da candidemia (Adaptada de Potón, 2006).

Contudo, há relatos de que a detecção de mananas em pacientes com ICS por *Candida* sp. permitiu um diagnóstico específico, mas pouco sensível, devido à curta duração da mananemia, e apesar dos diferentes antígenos estudados, a detecção de antígenos em pacientes com candidemia não permitiu solucionar o problema diagnóstico que apresenta esta micose e ainda não existe um teste aceito universalmente (SENDID *et al.*, 1999). Além

da manana, a glicana também é um componente importante da parede celular que se libera durante a infecção, podendo ser detectada no plasma como 1,3  $\beta$ -D-glicana. No entanto, este polissacarídeo não é específico da candidose hematogênica, podendo ser utilizado no diagnóstico de várias outras micoses, além de apresentar alguns falso-positivos em pacientes em hemodiálise e com aparatos que possuam membranas de celulose, assim como aqueles tratados com albumina ou produtos de globulina, agentes cancerosos e certos antibióticos (POTÓN, 2006). Assim, até o momento, os métodos desenvolvidos para o diagnóstico sorológico não têm alcançado uma distribuição generalizada por sua baixa sensibilidade em amostras únicas e um lento desenvolvimento de novos testes comercializados. No entanto, o diagnóstico da ICS por *Candida* sp. pode se beneficiar do desenvolvimento de novos testes baseados na detecção de antígenos e anticorpos contra *Candida*, sendo os principais alvos de estudo os antígenos: enolase (LAÍN *et al.*, 2007b) e manana (FUJITA *et al.*, 2006), e entre os anticorpos se destacam aqueles dirigidos contra antígenos da fase micelial (BIKANDI *et al.*, 1998; LAÍN *et al.*, 2007a).

Analisando ainda outros métodos diagnósticos para candidemia, existem métodos moleculares empregando PCR, contudo, estes não estão ainda bem padronizados ou prontamente disponíveis nos laboratórios clínicos. Podemos citar como exemplo, PCRs que envolvem regiões altamente conservadas do DNA ribossômico, incluindo genes de rRNA 5,8S, 18S e 28S, sendo estes os mais utilizados, assim como também as regiões dos espaçadores transcritos internos (ITS) destes genes (ELLEPOLA & MORRISON, 2005).

Há também métodos de detecção mais sofisticados, que incluem a utilização de sondas específicas marcadas com fluorescência, a análise do polimorfismo do tamanho do fragmento amplificado (AFLP), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) e PCR em tempo real (WHITE *et al.*, 2005).

Além dos testes diagnósticos mencionados acima, existe também a identificação fenotípica das espécies de *Candida* utilizando assimilação de carboidratos, testes de fermentação e morfologia. Métodos mais rápidos e menos trabalhosos de identificação fenotípica têm sido desenvolvidos como, por exemplo, *RapID Yeast Plus System* (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Georgia, USA), o qual contém substratos convencionais e cromogênicos e requer de 4 a 5 horas, ou ainda, placas para a assimilação de carboidratos e/ou detecção enzimática como, por exemplo, API 20C AUX (*bioMerieux-*

Vitec, Hazelwood, Mo), o API *Candida* (bioMerieux, France), o Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, France), que utilizam o aumento da turbidez (API 20C AUX) ou a produção de cor (API *Candida* e o Auxacolor), onde cada um dos poços contém um substrato diferente para produzir um perfil bioquímico particular, ou até sistemas bioquímicos automatizados como o ID 32C (bioMerieux, France), o Vitek Yeast Bioquímica Card (bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo), o Vitek 2 ID-YST Card (bioMerieux Vitek, Inc.). No entanto, a maioria destes testes não é exata para a identificação de leveduras patogênicas comuns, apresentando falhas na identificação de espécies mais raras e recentes como, por exemplo, *C. dubliniensis* (VERWEIJ *et al.*, 1999).

Há também um meio cromogênico (CHROMagar *Candida*, France), o qual incorpora substratos ligados em um corante químico em um meio sólido para diferenciar *Candida* spp. pela cor e/ou textura do crescimento colonial (*C. albicans* = verde, *C. tropicalis* = azul/púrpura e *C. krusei* = rosa). No entanto, há relatos de que este meio pode apresentar o mesmo padrão para *C. albicans* e *C. dubliniensis* (ELLEPOLA & MORRISON, 2005).

O exame histopatológico de seção tecidual é um dos métodos mais confiáveis e estáveis no diagnóstico de infecções sistêmicas. Contudo, o reconhecimento do patógeno depende da sua abundância e da sua aparência característica. A presença de blastoconídios e pseudo-hifas característicos de *Candida* spp. pode ser utilizado como parâmetro para candidose hematogênica. Contudo, este método diagnóstico fornece apenas a informação de presença ou ausência de doença fúngica, podendo até reconhecer o gênero do patógeno infectante, mas não identifica a espécie e conseqüentemente, seu impacto da decisão para o tratamento é limitada (ERJAVEC & VERWEIJ, 2002). Apesar de tudo, a prática clínica das infecções fúngicas é geralmente diagnosticada baseada nas características clínicas em conjunto com o isolamento em cultura do microrganismo (BÄR & HECKER, 2002).

Existe também um teste inicial que pode ser feito na maioria dos laboratórios que é a prova do tubo germinativo, a qual pode orientar na diferenciação de espécies entre *C. albicans* e *Candida* não-*albicans*. No entanto, devido ao aumento da prevalência de espécies emergentes e ao fato de 5-10% de *C. albicans* não apresentarem a formação de tubo germinativo, este método não pode ser considerado absoluto para a identificação de *C. albicans* (LACAZ *et al.*, 2002).

Outro problema no diagnóstico das infecções sistêmicas por *Candida* é a diferenciação de colonização de infecção fúngica, pois *Candida* spp. podem ser isoladas em

cultura, mas representar uma colonização da flora sem significância etiológica ou, ao contrário, induzirem infecções sistêmicas sem cultura positiva (PERSAT *et al.*, 2002).

Devido às poucas características clínicas definidas e problemas no diagnóstico das infecções sistêmicas por *Candida*, a representação clínica tem sido enfatizada na literatura, assim como outros critérios como métodos sorológicos estão sendo avaliados (BÄR & HECKER, 2002).

O desenvolvimento de um procedimento minucioso com bases sorológicas, padronizado e confiável é, portanto, necessário. Para este fim, muitos ensaios comerciais (ELISA) estão agora emergindo, os quais detectam anticorpos parcialmente associados com detecção de antígeno, permitindo análises de numerosas amostras (PERSAT *et al.*, 2002).

### 3.6 RESPOSTA IMUNE CONTRA *Candida* sp.

A resposta imune inata é a primeira resposta contra a invasão fúngica, a qual inclui células polimorfonucleares (PMNs, neutrófilos, basófilos, eosinófilos) e monócitos. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa, capturando, fagocitando e matando os microrganismos (FRADIN *et al.*, 2007). Anormalidades quantitativas ou qualitativas nos neutrófilos e monócitos são associadas com infecções invasivas, pois estas células reconhecem e opsonizam as células leveduriformes via receptores de reconhecimento da parede celular do fungo, receptores de manana e  $\beta$ -glicana. Assim, pacientes com linfoma, leucemia, doença granulomatosa crônica, pacientes com câncer e receptores de quimioterapia com conseqüente neutropenia, têm risco aumentado à infecção disseminada (SHOHAM & LEVITZ, 2005). Já os macrófagos ativam resposta imune pela apresentação do antígeno e induzindo a secreção de sinais proinflamatórios Th1, as células natural killer (NK) induzem atividade anti-*Candida* em fagócitos profissionais (LÓPEZ-RIBÓT *et al.*, 2004), e as células dendríticas capturam e processam antígenos, expressando moléculas co-estimulatórias de linfócitos, migrando para órgãos linfóides e secretando citocinas para iniciar resposta imune, além de apresentar o antígeno aos linfócitos T CD4 e T CD8 (MEGIOVANNI *et al.*, 2006). Os mecanismos exatos pelos quais os anticorpos protegem contra infecção por *Candida* sp. são desconhecidos, mas eles comumente incluem a

inibição da adesão ou da formação do tubo germinativo, opsonização e neutralização das enzimas relacionadas à virulência (LÓPEZ-RIBÓT *et al.*, 2004).

SHOHAM & LEVITZ (2005) relatam que a resposta imune varia de acordo com as espécies fúngicas encontradas. A relativa importância do mecanismo de defesa específico inato e adaptativo difere, dependendo do organismo e do sítio de infecção (Tabela 1), além do fato que, entre as espécies, o morfotipo fúngico como, por exemplo, levedura, pseudo-hifa e hifa de *C. albicans*, é um determinante importante na resposta do hospedeiro. Enquanto leveduras e esporos são efetivamente fagocitados, o tamanho das hifas impede a efetiva ingestão.

**Tabela 1.** Deficiências nas defesas do hospedeiro que predisõem os pacientes às infecções fúngicas específicas (Modificada de Shoham & Levitz, 2005).

<b>PATÓGENO FÚNGICO</b>	<b>FATORES NO HOSPEDEIRO</b>
<i>Candida</i> spp. (mucosa)	Diminuição da imunidade celular
<i>Candida</i> spp. (disseminada)	Injúria da mucosa, neutropenia
<i>Aspergillus</i>	Neutropenia, altas doses de corticosteróides
<i>Cryptococcus</i> spp.	Diminuição da imunidade celular e corticosteróides
Zigomicetos	Neutropenia, corticosteróides, diabetes, cetoacidose
<i>Fusarium</i>	Neutropenia, corticosteróides
<i>Scedosporium</i>	Neutropenia
<i>Trichosporon</i>	Neutropenia

### 3.7 EPIDEMIOLOGIA-ASPECTOS GERAIS

Nas últimas décadas, as ICS causadas pelo gênero *Candida* têm chamado a atenção da área médica devido à sua alta mortalidade e ao aparecimento de espécies NAC indicando um perfil de suscetibilidade resistente, representando um grande desafio aos clínicos devidos às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (AQUINO *et al.*, 2005).

Apesar do uso difundido dos antifúngicos para o tratamento e profilaxia de infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, a candidemia permanece a mais freqüente doença fúngica potencialmente letal e está associada com uma estadia prolongada no hospital, resultando em custos mais elevados (YERA *et al.*, 2001; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; CHENG *et al.*, 2005; TORTORANO *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 2007). *Candida* spp. são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas nosocomiais e constituem a quarta causa principal de infecções na corrente sangüínea, segundo dados obtidos em 50 hospitais dos EUA (COLOMBO *et al.*, 1999; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; AQUINO *et al.*, 2005; ELLEPOLA & MORRISON, 2005; PEMÁN *et al.*, 2005; RUIZ *et al.*, 2005; KARTHAUS & CORNELLY, 2007; PASSOS *et al.*, 2007), respondendo por cerca de 8 a 10% dos casos de infecções documentadas neste sítio (PEMÁN *et al.*, 2005; RUIZ *et al.*, 2005; BEDINI *et al.*, 2006; SENDID *et al.*, 2006; DIMOPOULOS *et al.*, 2007). A evolução da incidência desta infecção aumentou substancialmente nas últimas décadas, ocupando a sétima posição nos anos 80, quinta posição de 1986 a 1990 e quarta posição nos anos 90 (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Na América do Sul, tem sido observada uma distribuição diferente das espécies e do perfil de suscetibilidade (AQUINO *et al.*, 2005). A distribuição de espécies de *Candida* obtidas da corrente sangüínea varia de acordo com a área geográfica e a população na qual os estudos foram realizados, provavelmente devido às variações dos microrganismos endógenos dos pacientes (SANDVEN, 2000; AQUINO *et al.*, 2005; WARNOCK, 2007). Por exemplo, enquanto na América do Norte nota-se o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies NAC, na América do Sul, observa-se o predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

A gravidade da candidemia é confirmada pela alta taxa de mortalidade. Infecção na corrente sanguínea por *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* parece particularmente ser mais grave, provavelmente pelo fato destas espécies ocorrerem mais em pacientes com condições adjacentes, ou seja, doença de base (TORTORANO *et al.*, 2006).

### 3.8 EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL

A ocorrência de ICS causadas por *Candida* em hospitais terciários aumentou substancialmente nas últimas décadas em diferentes partes do mundo. As melhores casuísticas sobre a relevância desta infecção foram publicadas nos EUA (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

EDMOND *et al.* (1999), no mesmo país, avaliaram a prevalência de diferentes agentes relacionados à ICS em pacientes admitidos em 49 hospitais, durante um período de 3 anos. Neste estudo, os agentes mais isolados de ICS foram *Staphylococcus coagulase-negativo* (31,9%), *Staphylococcus aureus* (15,7%), enterococos (11,1%) e *Candida spp.* (7,6%).

Em Manitoba, no Canadá, a prevalência de agentes causadores de ICS foi avaliada por KARLOWSKY *et al.* (1997) durante o período de 1976 a 1996, resultando num total de 816 fungemias, das quais 771 foram causadas por espécies de *Candida*. Foi observado que entre 1976 e 1980 as espécies de *Candida* representavam a 13ª causa de ICS, enquanto no período de 1991 a 1996 passaram a ser a 4ª causa de infecção neste sítio.

Até 1995, a maior fonte de conhecimento sobre epidemiologia de infecções na corrente sanguínea causada por *Candida* provinham da América do Norte. Somente em 1996, um estudo envolvendo mais de um hospital na Europa foi publicado (VOSS *et al.*, 1996). Conseqüentemente, em 1997, a Confederação Européia de Micologia Médica (ECMM) proferiu um levantamento sobre infecções na corrente sanguínea por *Candida* (TORTORANO *et al.*, 2004; TORTORANO *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por TORTORANO *et al.* (2006) na Europa, reuniu dados de sete países europeus, entre eles Inglaterra, França, Itália, Espanha, Suécia, Áustria e Alemanha no período de 1997 a 1999, constatando 2089 episódios. *C. albicans* foi responsável por mais de 50% dos casos, exceto em pacientes com doenças hematológicas



malignas. Nestes pacientes, *C. albicans* foi isolada em 35% dos casos, *C. tropicalis* em 17% e outras espécies de *Candida* em 24%, estando *C. krusei* envolvida com a metade destes casos (12%).

A contribuição de diferentes espécies de *Candida* varia entre os países do levantamento da ECMM. *C. albicans* foi identificada em 56% dos casos, alcançando de 67% na Suécia e nos países de língua alemã a 43% na Espanha. Neste último país, *C. parapsilosis* foi a espécie de NAC isolada com a maior frequência, sendo esta de 30%. *C. glabrata*, causando 14% dos episódios, foi a segunda espécie de NAC mais comum em todos os países, exceto na Itália e na Espanha, atingindo a terceira e quarta posição, respectivamente. *C. tropicalis* ocorreu em 7% dos casos (TORTORANO *et al.*, 2006).

BASSETI *et al.* (2006) relataram estudo retrospectivo de 1999 a 2003 na Itália obtendo 182 episódios de pacientes com infecção na corrente sanguínea causada por *Candida* no Hospital Universitário de Gênova. Destes 182, 74 (aproximadamente 40%) foram devido a *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis* (23%), *C. glabrata* (15%), *C. tropicalis* (9%) e outras espécies de *Candida* (13%). Neste mesmo estudo, foi constatado o aumento da incidência de pacientes com infecção na corrente sanguínea causada por *Candida* durante o período de estudo de 1,25 em 1999 a 3,06 episódios por 10.000 pacientes ao ano em 2003.

Também na Itália, BEDINI *et al.* (2006) relataram um estudo retrospectivo de 2000 a 2003 em um Hospital Universitário de Modena. Eles obtiveram 94 episódios de pacientes com infecção na corrente sanguínea causada por *Candida* spp. Destes, 48 pacientes eram homens, com uma média de idade de 61 anos (0-89). A incidência de pacientes com infecção na corrente sanguínea causada por *Candida* spp. foi de 0,90 episódios por 10.000 pacientes ao ano. A espécie mais frequentemente isolada foi *C. albicans* com aproximadamente 40% dos episódios, seguida de *C. parapsilosis*, com 22%, *C. tropicalis*, com 16%, *C. glabrata*, com 12%, *C. krusei*, com 3%, *C. lusitanae*, com 2%, *C. guilliermondii*, com 2% e *Candida pelliculosa*, com 1%. Apesar da *C. albicans* ser a espécie mais prevalente, as espécies de NAC acometeram aproximadamente 60% dos episódios de candidemia. A taxa de mortalidade geral após um mês de diagnóstico de fungemia foi de 38,2%, sendo doenças hematológicas (71,4%) e transplante de órgãos sólidos (50%) responsáveis pelas maiores taxas. Estudos estatísticos deste trabalho

relataram *C. tropicalis* e *C. glabrata* como as espécies mais associadas com esta alta taxa de mortalidade, sendo responsáveis por 60% e 50% dos óbitos, respectivamente.

Um estudo publicado por SENDID *et al.* (2006) relatou, do período de 1993 a 2003, 430 episódios de pacientes com ICS causados por *Candida* sp., em um Hospital Universitário França. Os resultados demonstraram *C. albicans* como a espécie mais freqüentemente isolada compreendendo cerca de 60% dos isolados. A única exceção foi nos pacientes da unidade oncologia/hematologia, nos quais *C. albicans* representou menos de 35% dos isolados, enquanto a maioria foi de espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, as quais são resistentes ou menos sensíveis às drogas do grupo azol. Uma possível explicação para este fato seria a profilaxia com estas drogas, principalmente fluconazol conduzido durante longos períodos de neutropenia e após transplante de medula óssea. Estes pesquisadores também relataram a emergência de *C. glabrata* desde 1996. A análise da utilização de drogas antifúngicas sistêmicas revelou um aumento exponencial do uso fluconazol entre 1993 e 2002, com um aumento do uso de baixas doses desta droga, geralmente utilizada para profilaxia até 1996. Muitos relatos têm demonstrado que o uso abaixo de 400mg pode aumentar a freqüência de *C. glabrata* em pacientes hospitalizados, demonstrando que esta emergência de *C. glabrata* parece estar relacionada com o uso de baixas doses de fluconazol (<400mg) antes de 1997.

CUENCA-ESTRELLA *et al.* (2002) publicaram uma pesquisa abrangendo Espanha e Argentina. Este estudo foi realizado do período de 1996-1999, em 99 centros médicos, composto por 55 na Espanha e 44 na Argentina. Eles obtiveram 744 isolados de pacientes com infecção na corrente sanguínea causada por *Candida* sp., no qual 514 foram obtidos da Espanha e 230 da Argentina. Espécies de NAC causaram mais episódios de fungemia que espécies de *C. albicans* em ambos os países. *C. parapsilosis* foi a espécie mais isolada, 39% (201/514) na Espanha e 30% (70/230) na Argentina. *C. albicans* foi isolada em 30% (155/514) e 40% (94/230), seguida por *C. tropicalis* 10,7% (55/514) e 20,4% (47/230), *C. glabrata* 9,5% (49/514) e 2,6% (6/230), *C. krusei* 5,1% (26/514) e 2,2% (5/230), na Espanha e Argentina respectivamente. Assim, nos centros médicos da Espanha, 69,8% dos episódios foram causados por espécies de NAC e na Argentina atingiu 59,1% dos episódios, e a taxa da incidência de fungemia causada pela *C. parapsilosis* foi significativamente notada em ambos os países.

PEMÁN *et al.* (2005) publicaram um estudo retrospectivo do período de 1997 a 1999 em 19 hospitais também na Espanha. Eles obtiveram 293 isolados de pacientes com infecção na corrente sanguínea causada por *Candida*, atingindo mais homens 190/293 (64,8%) que mulheres 103/293 (35,2%), principalmente acima de 64 anos.

Os dados epidemiológicos obtidos por PEMÁN *et al.* (2005) concordam com os dados obtidos por CUENCA-ESTRELLA *et al.* (2002), os quais demonstram espécies de NAC causando mais episódios de fungemia que espécies de *C. albicans*. Esta última acometeu 43% dos casos seguida por *C. parapsilosis* (29%), *C. tropicalis* (10%), *C. glabrata* (8%), *C. krusei* (3%), *C. guilliermondii* (2%) e *C. famata* (1%). A ordem de frequência das espécies não variou, exceto por *C. parapsilosis* ser uma espécie mais prevalente que *C. albicans* nos estudos de CUENCA-ESTRELLA *et al.* (2002), fato que não foi observado por PEMÁN *et al.* (2005). *C. glabrata* foi a quarta espécie mais frequente encontrada nos três estudos da Espanha (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002; PEMÁN *et al.*, 2005 e TORTORANO *et al.*, 2006).

Já na Oceania, SLAVIN (2002) relataram um estudo retrospectivo de nove hospitais no período de 1995 a 1998 obtendo 366 isolados de pacientes com ICS, na Austrália. A espécie mais frequente foi *C. albicans* acometendo 206 pacientes (56%), seguida por *C. parapsilosis* com 50 pacientes (14%), *C. glabrata* com 46 pacientes (13%), *C. krusei* com 18 pacientes (5%), *C. tropicalis* com 16 pacientes (4,5%) e 19 pacientes apenas classificados com NAC (5%). A proporção de infecções devido a *C. albicans* foi menor em pacientes com doenças hematológicas. De 56 pacientes, apenas 24 foram acometidos por *C. albicans* (43%). Interessantemente, a segunda espécie mais comum foi *C. krusei*, acometendo 15 pacientes (27%), enquanto *C. parapsilosis* acometeu 9%, *C. glabrata* 7% e *C. guilliermondii* 5% dos casos. Estes resultados demonstraram *C. krusei* como a espécie mais prevalente em pacientes com doenças hematológicas quando comparada com os pacientes dos outros grupos. Somente 3 pacientes não pertencentes ao grupo das doenças hematológicas foram acometidos por *C. krusei*, sendo 1 paciente com transplante de fígado, 1 com câncer de pulmão e 1 com apoplexia (derrame cerebral). Já os pacientes cirúrgicos foram mais acometidos por *C. albicans* 86/125 (69%). A segunda espécie mais frequente foi *C. glabrata* com 12%, seguida por *C. parapsilosis* com 10%. Dados avaliando sexo e idade foram obtidos apenas de 334 pacientes, divididos em 198 homens e 136 mulheres, com uma média de idade de 61 anos (0-97), e a taxa de mortalidade avaliada em 207

pacientes, sendo que 27,5% destes foram a óbito. Este estudo também relatou aumento da porcentagem de espécies de NAC nos últimos anos, demonstrando significância estatística no decréscimo da proporção de *C. albicans* com o tempo.

### 3.9 EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL E AMÉRICA LATINA

COLOMBO *et al.* (1999), num estudo retrospectivo de 22 meses durante o período de janeiro de 1995 a outubro de 1996, conduzido em 6 hospitais, 4 do Estado de São Paulo e 2 do Estado do Rio de Janeiro, obtiveram 145 pacientes com ICS por *Candida*. Destes, 85 homens e 60 mulheres com uma média de idade de 32 anos (0-98 anos). Espécies de NAC acometeram 63% dos casos, sendo a espécie mais freqüente *C. albicans* (37%), seguida de *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *Candida rugosa* (5%), *C. glabrata* (4%), *C. guilliermondii* (2%), *C. krusei* (1%), *Candida lipolytica* (1%) e *C. famata* (1%). A baixa incidência de *C. glabrata* e *C. krusei* pode ser relacionada ao raro uso de fluconazol nestes hospitais, onde a terapia padrão utilizada foi a anfotericina B. A taxa de mortalidade foi de 50%. As espécies mais freqüentes relacionadas com a mortalidade foram *C. tropicalis* (63%), *C. albicans* (52%) e *C. parapsilosis* (28%).

GODOY *et al.* (2003), publicaram um estudo retrospectivo do período de 1999 a 2000 envolvendo cinco hospitais de 4 países da América Latina: Venezuela, Argentina, Peru e Brasil (Porto Alegre e São Paulo), obtendo 103 isolados de ICS por *Candida* spp. Espécie de NAC acometeram 58% de todos os episódios, sendo a espécie mais freqüente *C. albicans* (42%), seguida de *C. tropicalis* (24,2%), *C. parapsilosis* (21,3%), *C. glabrata* (7,7%), *C. guilliermondii* (2,9%) e *C. lusitaniae* (1,9%).

RUIZ *et al.* (2005) publicaram um estudo retrospectivo do período de 1998 a 2001 de um hospital público de Botucatu em São Paulo, obtendo 75 isolados de ICS por *Candida* sp. Destes, 34 (45,3%) homens e 34 (45,3%) mulheres, sendo 7 isolados sem especificação de sexo, de diferentes idades variando de 0 a 65 anos. A espécie mais freqüentemente isolada foi *C. albicans* (38,7%), seguida de *C. parapsilosis* (30,7%), *C. tropicalis* (12%), *C. krusei* (10,7%), *C. guilliermondii* (6,6%) e *C. glabrata* (1,3%).

ANTUNES *et al.* (2004) publicaram um estudo retrospectivo do período de 2002 a 2003, obtendo 120 isolados de ICS por *Candida* sp., do Complexo Hospitalar Santa Casa

de Porto Alegre. A maioria dos episódios de ICS desta instituição foi ocasionada por espécies de NAC com 51,6% dos casos. A distribuição de espécies demonstrou o seguinte perfil: *C. albicans* acometendo 48,3% dos casos, seguida de *C. parapsilosis* com 25,8%, *C. tropicalis* com 13,3%, *C. glabrata* com 3,3%, *C. krusei* com 1,7% e outras espécies de *Candida* com 7,5%.

AQUINO *et al.* (2005) publicaram um estudo retrospectivo de 6 anos, 1998 a 2004, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Eles obtiveram 131 isolados, sendo 77 homens e 54 mulheres com uma média de idades de 28 anos, variando de 0 a 91 anos de idade. Entre os principais fatores de risco e doenças adjacentes observados, foi relatado o uso de cateter venoso central em 71,8% dos casos, uso de corticosteróides em 66,4%, suporte de ventilação mecânica em 48,9%, neutropenia em 28,2%, quimioterapia em 23,7%, nutrição parenteral em 25,2%, cirurgia abdominal em 24,4% e outros tipos cirúrgicos em 13,7%. Febre foi o principal sintoma clínico observado, acometendo 87% dos pacientes (114/131), seguida de lesão na pele (13,1%), hipotensão (8,4%), hipotermia (4,6%) e lesão na ocular (3,9%). Espécies de NAC acometeram 55% de todos os episódios, sendo a espécie mais freqüente *C. albicans* (45%), seguida de *C. parapsilosis* (24,4%), *C. tropicalis* (15,3%), *C. glabrata* (6,9%), *C. krusei* (4,6%) e outras espécies de *Candida* (3,8%). Sessenta e oito pacientes (51,9%) foram a óbito num período de 30 dias após o episódio de ICS por *Candida*. Esta taxa de mortalidade variou de acordo com a doença adjacente e condição do paciente. As espécies de *Candida* mais associadas com esta taxa de mortalidade foram *C. glabrata* com 78% e *C. tropicalis* com 60%. As demais espécies como *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* foram associadas com a mortalidade em torno de 50%.

COLOMBO *et al.* (2006) publicaram um estudo envolvendo 11 hospitais pertencentes a 9 cidades das regiões sul, sudeste e central do Brasil no período de 2003 a 2004. Eles obtiveram 712 isolados de ICS por *Candida* spp. Destes 400 (56%) homens e 312 (43,8%) mulheres com uma média de idade de 41 anos (0 a 96 anos de idade). *Candida* spp. compreendeu o quarto patógeno mais isolado de ICS, precedido por *Staphylococcus* coagulase-negativo, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Entre os principais fatores de risco e doenças adjacentes, foram relatados o uso de cateter venoso central (70%), pacientes internados na UTI (46%), cirurgia (39%), ventilação mecânica (38%), uso de corticosteróides (32%), pacientes com câncer (27%), cirurgia abdominal (25%), nutrição parenteral (21%), doenças cardíacas (19%), doenças pulmonares (19%), insuficiência renal

(19%) e doenças neurológicas (17%). Febre foi o principal sintoma clínico observado, acometendo 62% dos pacientes (678 dos 712 foram pacientes avaliados), seguido de hipotensão (8,4%) e hipotermia em 7% (620 dos 712 pacientes foram avaliados). Espécies de NAC acometeram 58,6% de todos os episódios, sendo a espécie mais freqüente *C. albicans* (40,9%), seguida de *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%), *Candida pelliculosa* (6,2%), *C. glabrata* (4,9%), *C. guilliermondii* (2,4%), *Candida ohmeri* (1,3%), *C. krusei* (1,1%) e outras espécies de *Candida* (1,3%). A taxa de mortalidade foi observada no 3º, 7º e 30º dia após a infecção com 19%, 31% e 54%, respectivamente. Esta taxa de mortalidade no 30º dia após a infecção foi de 43% para crianças menores de 1 ano de idade, 23% para crianças entre 1 e 12 anos, e 63% para adultos. A ICS por *C. parapsilosis* foi associada menor mortalidade (45%) que ICS por *C. albicans* (57%).

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS DE *Candida* spp. UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO TOTAL

As linhagens de *Candida* spp. utilizadas para a produção dos extratos protéicos totais estão descritas na Tabela 2.

**TABELA 2**-Linhagens das principais espécies de *Candida* envolvidas em infecção de corrente sanguínea, utilizadas para a produção dos extratos protéicos totais no presente trabalho. Fonte: *American Type Culture Collection*. Disponível em: [www.atcc.org](http://www.atcc.org) (Acesso em 01/09/2007).

Espécie e linhagem ATCC	Outras designações	Isolamento	Nível de Biossegurança (BSL*)
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	CBS 562 572; CCRC 20512; IFO 1385; JCM 1542, NRRL Y-12983	Lesão de pele humana, interdigital, Uruguai	1
<i>Candida dubliniensis</i> MYA-646	CBS 7987; NRRL Y-17841	Cavidade bucal de paciente infectado com HIV, Dublin, Irlanda	1
<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 46036	NRRL Y-2075 CBS 2030; CCRC 21697; CCRC 22093; IFO 10106;	Inseto do olmeiro americano	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	CBS 604 ,CCRC 20515, IFO 1396; JCM 1785; NRRL Y-12969;	Porto Rico	1
<i>Candida krusei</i> ATCC 749	ATCC 6258 CBS 573; CCRC 20514; IFO 1064; IFO 1395; JCM 1609; NRRL Y-413; NRRL Y-7179	Escarro de paciente com broncomiçose, Sri Lanka	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC2001	CBS 138	Fezes	1
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	ATCC 7349; CBS 94; CCRC 20520; IFO 1070; IFO 1400; JCM 1541; NRRL Y-12699; NRRL Y-12968; NRRL Y-607	Paciente com broncomiçose	1

**BSL-1** não causa doença em indivíduos adultos sadios. **ATCC** - *American Type Culture Collection*; **CBS** - *Centraalbureau Voor Schimmelcultures*; **CCRC** - *Culture Collection and Research Center*; **IFO** - *Institute for Fermentation Culture Collection*; **JCM**- *Japan Collection of Microorganisms*; **NRRL** - *Agricultural Research Service Culture Collection*.

## 4.2 ANTICORPOS PRIMÁRIOS – SOROS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA

Para a obtenção dos soros e dos isolados de *Candida* spp., contou-se com a colaboração do setor de micologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Assim, quando solicitada uma hemocultura de rotina no setor de micologia, e esta era positiva para *Candida* sp., o número de identificação deste paciente foi repassado para o setor de bioquímica para a verificação da existência de soros neste setor. Tendo esta confirmação, estes soros foram armazenados a -20°C e repassados para o Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Assim, após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, iniciou-se desenvolvimento do projeto entre o período de março de 2006 a março de 2007, com a parceria do setor de Micologia deste hospital para a obtenção dos soros de pacientes com candidemia. Neste período, foram obtidas 25 amostras de soros de pacientes com hemoculturas positivas diagnosticados pelo Bactec® e posteriormente identificadas com o sistema bioquímico automatizado ID 32C (BioMerieux, France) para a informação do agente etiológico.

O setor de Micologia, além do fornecimento dos soros dos pacientes com hemoculturas positivas, forneceu a identificação do agente etiológico, número do prontuário para buscas de informações dos pacientes para projetos futuros, o motivo da internação do paciente, idade, sexo, se o paciente é portador de HIV e, sempre que possível, as colônias isoladas das hemoculturas positivas para a extração do DNA e posterior confirmação das espécies de *Candida* sp. por PCR espécie-específica.

Como controle para os ensaios de ELISA e *western blotting*, foram utilizados 32 soros de indivíduos hígidos coletados de alunos e funcionários do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para realização desta coleta, os voluntários assinaram um termo de compromisso livre e esclarecido.



### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total das linhagens de *Candida* sp. utilizadas para a produção do antígeno protéico total e dos isolados das hemoculturas referentes aos soros dos pacientes com candidemia foi utilizado para confirmação da espécie por PCR espécie-específica.

O método utilizado para isolamento do DNA total destas amostras foi um método mecânico adaptado a partir de um protocolo de extração com lise por maceração com adição de nitrogênio líquido (ZHANG *et al.*, 1996). As culturas de *Candida* foram inoculadas em placas com ágar Sabouraud e incubadas a 30°C por 2 ou 3 dias, dependendo da espécie. As colônias foram recolhidas e maceradas em presença de nitrogênio líquido, em gral e pistilo, e ressuspensas em 0,2 mL de tampão de extração (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,01 M EDTA, 1% SDS) em microtubo. Foram adicionados 0,2 mL de fenol-clorofórmio (1:1) ao microtubo e agitado em vórtex por 6 min.

Em seqüência, foram adicionados 0,3 mL de fenol-clorofórmio (1:1) e 0,3 mL de tampão de extração e agitado mais 4 min em vórtex. O extrato foi centrifugado por 5 min a 13000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. O DNA foi re-extraído com 0,3 mL de fenol-clorofórmio (1:1) e centrifugado por mais 5 min. O sobrenadante foi transferido a outro microtubo, onde foram adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado. Os ácidos nucléicos foram precipitados por incubação a -20°C por 14 a 16 h. Após uma centrifugação por 15 min a 13000 rpm, o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado, seco a temperatura ambiente e ressuspensado em 50 µL de água MilliQ. RNase na concentração de 50 µg/mL foi adicionada e após 30 min a 37°C, a qualidade do DNA foi verificada visualmente sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os microtubos, contendo o DNA tratado com RNase e verificados, foram armazenados a -20°C.

### 4.4 PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA

O método de PCR utilizado para a identificação e confirmação das espécies de *Candida* utilizadas neste trabalho foi adaptado a partir do protocolo utilizado por CHANG *et al.* (2001). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL

contendo 10 a 20 ng de DNA, 10 mM Tris HCl pH 8,3/ 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de desoxirribonucleotídeo, 0,8 µL de cada *primer* (20 pmol/µL) e 1 U de *Taq platinum* DNA- polimerase.

As condições para a realização deste PCR foram: desnaturação inicial de 94°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 1 min, anelamento de 63°C por 1 min, extensão de 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

Os *primers* utilizados foram os mesmo projetados por LI *et al.* (2003) com base nas seqüências disponíveis no GenBank do espaçador transcrito interno (ITS) 1 e 2: AY207072 para *C. parapsilosis*, AY207080 para *C. tropicalis*, AY207076 para *C. guilliermondii*, AY 207067 para *C. albicans*, AY207070 para *C. krusei*, AY 207081 para *Cryptococcus neoformans*, AY207068 para *C. glabrata*. Assim, os *primers* projetados foram: CP (*C. parapsilosis*, 5'-GGC GGA GTA TAA ACT AAT GGA TAG-3'), CT (*C. tropicalis*, 5'-AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A-3'), CGU (*C. guilliermondii*, 5'-GTA TTG GCA TGG GTA GTA CTG-3'), CA (*C. albicans*, 5'- TCA ACT TGT CAC AGA TTA TT-3'), CK (*C. krusei*, 5'- GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTC A-3'), CN (*Cryptococcus neoformans*, 5'- TGG ACT TTG GTC CAT TTA TCT AC-3'), CGLA (*C. glabrata*, 5'-CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T-3'). O *primer* universal ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') foi projetado conforme WHITE *et al.* (1990).

Os controles positivos da reação foram os DNAs extraídos das linhagens ATCC de cada uma das espécies de *Candida* utilizadas neste trabalho.

#### 4.5 CULTIVOS DAS LINHAGENS TIPO *Candida* sp. PARA A PRODUÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO TOTAL

As leveduras, referentes às linhagens descritas no item 4.1, foram cultivadas por 72 h, em 100 mL de caldo Sabouraud dextrose (2% glicose, 1% peptona e 0,3% extrato de levedura) a 37°C. Após crescimento, foi verificada a não contaminação do cultivo por microscopia óptica, as leveduras foram mortas pela adição de mertiolato de sódio (0,2 g/L) e incubadas por 24 h, sem agitação, a 4°C. A determinação das taxas de crescimento foi realizada por espectrometria (DO 600 nm). As células foram separadas do fluido sobrenadante por centrifugação a 5000 rpm durante 15 min, lavadas com água destilada estéril e novamente centrifugadas a 5000 rpm por 15 min. O sedimento celular, formado após a centrifugação, foi congelado e concentrado por liofilização por aproximadamente 12 h e as proteínas foram extraídas por maceração em nitrogênio líquido. A preparação final constituiu o antígeno bruto.

#### 4.6 PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS TOTAIS

Após a concentração do sedimento celular por liofilização, como descrito no item 4.5, este foi macerado em nitrogênio líquido, utilizando gral e pistilo, até a completa pulverização. Este material foi transferido para um tubo do tipo Falcon de capacidade de 15 mL, adicionado de tampão de ressuspensão (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA), numa relação 1:1 (peso células maceradas:tampão de ressuspensão), agitado em vórtex por 5 min (com intervalos de 1 min entre vórtex e banho de gelo), transferido para um tubo cônico de 2 mL e centrifugado a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante da centrifugação foi coletado para que se pudesse repetir novamente todo o processo de ressuspensão e centrifugação e coletar a segunda fração de sobrenadante, os quais foram juntados em um mesmo tubo e armazenados a -20°C, constituindo-se então o antígeno total.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração protéica das amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). A curva padrão foi feita com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma), numa concentração que variou de 4 a 28  $\mu\text{g/mL}$ . A leitura foi realizada a 595 nm entre 5 a 30 min, após a mistura da amostra com o reagente, em espectrofotômetro Ultrospec-2000 (Pharmacia, Biotech).

#### 4.8 ELISA (ENSAIO IMUNO-ENZIMÁTICO)

As placas (BD Falcon 3912, Biosciences) de titulação foram sensibilizadas por adsorção física com os antígenos protéicos totais produzidos e diluídos em solução tamponada carbonato-bicarbonato (0,02 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,03 M  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 9,6) no volume de 100  $\mu\text{L}$ /poço. A concentração dos antígenos protéicos totais referentes a cada espécie de *Candida* foi testada para padronização da técnica. Foram testadas as quantidades de 0,250  $\mu\text{g}$ , 0,125  $\mu\text{g}$ , 0,0625  $\mu\text{g}$  e 0,03125  $\mu\text{g}$  de antígeno protéico total. Apenas para *C. tropicalis* foram testadas as quantidades de antígeno de 0,125  $\mu\text{g}$ , 0,0625  $\mu\text{g}$ , 0,03125  $\mu\text{g}$  e 0,01562  $\mu\text{g}$ , após a verificação que as quantidades iniciais não eram adequadas. Para os testes de ELISA foi utilizado, basicamente, o protocolo descrito em MAYER & WALKER (1987). Após a sensibilização das placas com o antígeno, as mesmas foram incubadas por 14 a 16 h, a 4°C. Os poços das microplacas sensibilizadas foram lavados 3 vezes com solução blotto/PBS1X 5% (0,01M PBS pH 7,4). Ligações não-específicas foram bloqueadas por incubação das placas durante 120 min a 37°C com blotto/PBS1X 5%. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween (0,01 M PBS pH 7,4; 0,05% Tween 20). Em cada poço sensibilizado foram adicionados 0,1 mL das amostras de soro diluídas 1:1600, 1:3200, 1:6400 em blotto 5%, para padronização da técnica com o anticorpo primário, incubando-se durante 90 min a 37°C, com exceção de *C. tropicalis* que foram utilizadas as diluições de 1:6400, 1:12800 e 1:25600. Após 3 lavagens com blotto/PBS1X 5%, foram adicionados 0,1 mL de conjugado anti-IgG humana-peroxidase (GE-Healthcare) na diluição 1:2000 em Blotto/PBS1X 5%. Após a incubação de 60 min a 37°C e 3 lavagens com PBS-Tween

0,05%, foi adicionado em cada poço 0,1 mL de solução cromógena [OPD, em 0,01 M de tampão citrato de sódio (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 M ácido cítrico) e 0,005% de peróxido de hidrogênio, como substrato para a enzima]. Nesta etapa, a incubação foi de 15 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os controles negativos consistiram de poços não sensibilizados com os antígenos. A reatividade foi avaliada espectrofotometricamente através das leituras de densidade ótica (DO) em comprimento de onda de 492 nm.

Após a padronização da técnica, foram realizados os testes individuais com cada soro utilizando uma concentração de antígeno protéico total e diluição do anticorpo primário específico estabelecido para cada espécie de *Candida*. Os pontos de corte para cada antígeno total foram determinados com a média dos soros negativos (indivíduos hígidos) acrescidos de 2 desvios padrão.

Para as construções dos gráficos de ELISA foi utilizado programa GraphPad Prism 4.

#### 4.9 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ELETROFORESE

O extrato protéico total de cada espécie de *Candida*, resultante da extração de proteínas descrito no item 4.6, foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA) 20%. Para cada volume de amostra, correspondente à determinada quantidade de proteína requerida, foram adicionados TCA 20% numa proporção de 1:1 (v/v), seguido de incubação a 4°C, por 14 a 16h. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 min, lavadas com acetona 100% e novamente centrifugadas na mesma rotação por 3 min, repetindo-se este processo por 3 vezes. Após o descarte da acetona e a evaporação total da mesma, os sedimentos protéicos foram ressuspensos no volume de 20 µL de tampão de amostra desnaturante 1X [0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol (v/v), 0,01% (p/v) azul de bromofenol, 4% 2-mercaptoetanol (v/v), 2% SDS] e expostas a temperatura de 100°C por 5 min e aplicados no gel.

#### 4.10 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE

Cada extrato protéico total produzido e preparado segundo o item 4.9 foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, descrito por LAEMMLI (1970), utilizando o sistema “*Mini Protean II Electrophoresis Cell*” (BioRaD). A solução do gel separador com concentração final de acrilamida de 12% continha: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 12% acrilamida-bisacrilamida (p/v), 0,1% SDS, 0,05% persulfato de amônio (v/v) e 0,05% TEMED (v/v). A solução do gel concentrador com concentração final de acrilamida de 4 % continha: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% acrilamida-bisacrilamida (p/v), 0,1% SDS, 0,05% persulfato de amônio (v/v) e 0,05% TEMED (v/v).

O sistema foi montado em cuba apropriada e preenchido com tampão de corrida 1X [0,3% Tris, 1,44% glicina e 0,1% SDS (p/v)]. As amostras ressuspendidas em tampão de amostra desnaturante, preparadas como mencionadas anteriormente, foram aplicadas no gel. Após a eletroforese (100 V por aproximadamente 2 h), os géis foram colocados em solução de coloração Coomassie Coloidal (10% sulfato de amônio p/v, 2% ácido fosfórico v/v, 20% metanol, coomassie blue G 0,05%) por 14 a 16h e descorados em água destilada, ou submetido à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose.

#### 4.11 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE

Após o término da migração das amostras no gel de poliacrilamida, descrito no item 4.10, o mesmo foi colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose de mesmo tamanho, sendo ambos envolvidos por papéis-filtro. Tanto os papéis-filtro como a nitrocelulose foram previamente umedecidos em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,8). O sistema foi montado em uma cuba apropriada preenchida com tampão de transferência e submetida a 400 mA por 2 h.

#### 4.12 WESTERN BLOTTING

Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, esta foi corada com vermelho de Ponceau (1:200) para a confirmação da transferência. Após descorar a membrana com TBS-T 1x (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6), esta foi bloqueada com Blotto, leite em pó desnatado diluído em TBS para a concentração de 5%, descrito em JOHNSON *et al.* (1984), onde permaneceu a 4°C por 14 a 16 h. A seguir, foram realizadas 3 lavagens com TBS-T 1x. A membrana foi incubada por 1 h sob agitação com diferentes soros em Blotto 5% (1:3200 para soros de pacientes com candidemia por *C. albicans*; 1:1600 para soros de pacientes com candidemia por *C. guilliermondii* e *C. krusei*; 1:800 para soros de pacientes com candidemia por *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, e 1 :12800 para soros de pacientes com candidemia por *C. tropicalis*). Após lavagens com TBS-T 1x, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado anti-IgG humana-peroxidase (GE-Healthcare) em Blotto 5% (1:2000) por 1 h sob agitação. A seguir, a membrana foi lavada com TBS-T 1x e a revelação realizada com a adição da solução de revelação, na seguinte proporção:

- 5 mg de DAB (Sigma);
- 30 mL de TBS-T 1X;
- 150 µL de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

A interrupção da reação ocorreu com adição de água destilada. Todas as lavagens e incubações foram realizadas à temperatura ambiente e com agitação constante.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS TOTAIS

Após cultivo das linhagens tipo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*, o crescimento foi determinado e as proteínas extraídas e quantificadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características do cultivo das linhagens de *Candida* spp. na produção dos antígenos totais.

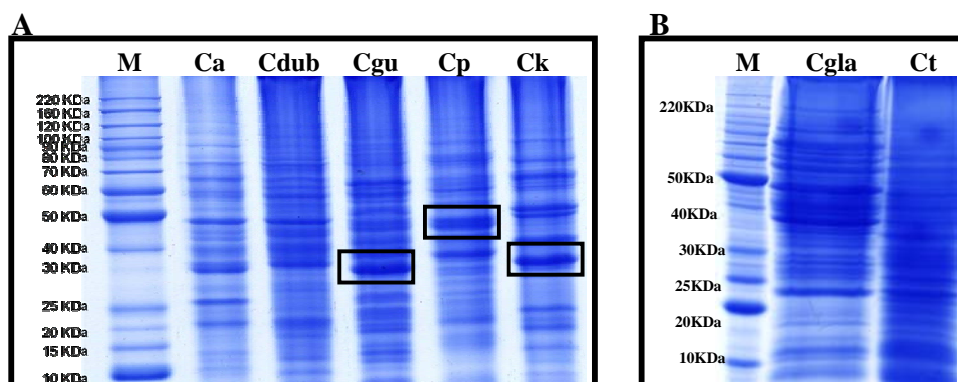
<b>Linhagem tipo</b>	<b>DO 660 nm</b>	<b>Concentração protéica (mg/mL)</b>
<i>C. albicans</i> ATCC18804	2,508	4,6
<i>C. dubliniensis</i> ATCC7987	2,752	2,7
<i>C. guilliermondii</i> ATCC46036	2,772	3,72
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	2,904	3,81
<i>C. krusei</i> ATCC749	2,704	3,03
<i>C. glabrata</i> ATCC2001	2,420	0,915
<i>C. tropicalis</i> ATCC4563	2,355	0,273

Todas as espécies de *Candida* apresentaram um crescimento de aproximadamente  $10^8$  células/mL, o que resultou em um bom rendimento na extração, fato demonstrado numa quantificação protéica de aproximadamente 3 a 5 mg/mL. Este fato apenas não foi evidenciado em duas das espécies trabalhadas, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, as quais demonstraram um crescimento equivalente às demais, mas sem rendimento semelhante.



## 5.2 ANÁLISES DOS ANTÍGENOS PROTÉICOS TOTAIS

Após a produção dos antígenos (Tabela 3), estes foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, conforme item 4.5, como observado na Figura 6. Esta análise em SDS-PAGE permitiu a visualização de um perfil protéico semelhante entre as espécies por pertencerem ao mesmo gênero. No entanto, foi possível observar também a existência de proteínas características, como por exemplo, uma proteína de aproximadamente 50 kDa destacada em *C. parapsilosis*, uma proteína de aproximadamente 40 kDa destacada em *C. krusei*, e uma proteína de aproximadamente 30 kDa destacada em *C. guilliermondii*.



**Figura 6-** Análise em SDS-PAGE dos antígenos protéicos totais extraídos das principais espécies de *Candida* em infecção na corrente sanguínea. **M-** Marcador de massa molecular. Em **A**, **Ca** (*C. albicans*), **Cdub** (*C. dubliniensis*), **Cgu** (*C. guilliermondii*), **Cp** (*C. parapsilosis*), **Ck** (*C. krusei*). Em **B**, **Cgla** (*C. glabrata*) e **Ct** (*C. tropicalis*). Em cada canaleta foram aplicados volumes correspondentes a 75 µg de proteína.

### 5.3 ANTICORPOS PRIMÁRIOS

Foram obtidas 25 amostras de soros de pacientes com hemoculturas positivas. A maioria destes pacientes foi acometida por espécies de *Candida* sp., com exceção apenas de três pacientes os quais não foram utilizados neste estudo (Tabela 4).

Como controle para os ensaios de ELISA e *western blotting*, foram utilizados 32 soros de indivíduos hígidos coletados de alunos e funcionários do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tabela 5).

**TABELA 4**– Dados referentes aos pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com infecção na corrente sanguínea, dos quais foram coletados soros.

Nº DO SORO DO PACIENTE	DATA DA COLETA	Nº DO PRONTUÁRIO	MOTIVO DA INTERNAÇÃO	IDADE DO PACIENTE	AGENTE ETIOLÓGICO DA FUNGEMIA*	OBSERVAÇÕES	OBTENÇÃO DA HEMOCULTURA
1	15/5/2006	10283703	UTI neonatal	0	<i>C. albicans</i>		Sim
2	11/4/2006	7925670	internação cirúrgica	43	<i>C. tropicalis</i>		Sim
3	8/5/2006	10283505	internação cirúrgica	65	<i>C. guilliermondii</i>		Sim
4	4/5/2006	10241972	internação cirúrgica	59	<i>C. albicans</i>	óbito	Não
5	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	<i>Penicillium</i>		-
6	31/5/2006	8252736	internação clínica	37	<i>C. intermedia</i>		Sim
7	21/5/2006	10305688	internação cirúrgica	66	<i>C. tropicalis</i>		Sim
8	24/7/2006	4529459	internação cirúrgica	37	<i>C. glabrata</i>	2 amostras	Sim
9	17/7/2006	4323200	internação clínica	53	<i>C. albicans</i>		Sim
10	15/7/2006	6738900	emergência adulto	65	<i>C. parapsilosis</i>		Não
11	29/7/2006	9899899	Não informado	Não informado	<i>Cryptococcus sp</i>		-
12	18/8/2006	10333094	oncologia pediátrica	16	<i>C. guilliermondii</i>		Não
13	16/8/2006	10257996	internação pediátrica	7 meses	<i>C. parapsilosis</i>		Não
14	10/8/2006	10340099	internação clínica	31	<i>C. albicans</i>	HIV	Não
15	13/9/2006	9769886	oncologia pediátrica	17	<i>C. krusei</i>		Não
16	1/9/2006	12731694	UTI	22	<i>C. krusei</i>	HIV	Sim
17	Não informado	10495711	UTI	31	<i>C. albicans</i>		Sim
18	7/12/2006	10368231	transplante medula óssea	16	<i>C. parapsilosis</i>		Sim
19	6/12/2006	2455822	emergência adulto	70	<i>C. parapsilosis</i>	anemia severa	Sim
20	27/1/2007	10535501	UTI	Não informado	<i>C. albicans</i>	2 amostras	Sim
21	6/2/2007	10232254	internação clínica	Não informado	<i>Cryptococcus sp</i>		-
22	27/1/2007	10535501	UTI	Não informado	<i>C. albicans</i>		Não
23	23/1/2007	10528412	internação clínica	Não informado	<i>C. albicans</i>		Sim
24	23/2/2007	10541811	internação cirúrgica	Não informado	<i>C. tropicalis</i>		Não
25	Não informado	3619830	UTI	Não informado	<i>C. intermedia</i>		Não

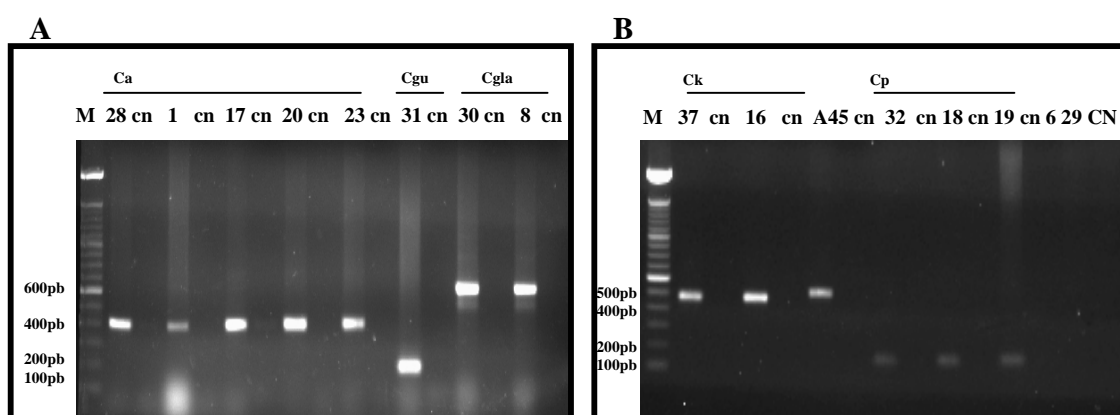
\*Identificação do Setor de Micologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através dos métodos diagnósticos hemocultura e assimilação de carboidratos automatizado ID32C.

**Tabela 5-** Soros de indivíduos hígidos obtidos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<b>Número soro indivíduos hígidos</b>	<b>Sexo</b>
L2	Feminino
L3	Feminino
L6	Feminino
L10	Feminino
L11	Masculino
L12	Feminino
L13	Feminino
L14	Masculino
L15	Masculino
L16	Feminino
L17	Masculino
L18	Feminino
L19	Masculino
L20	Masculino
L21	Feminino
L22	Feminino
L23	Feminino
L24	Masculino
L25	Masculino
L26	Feminino
L27	Masculino
L28	Feminino
L29	Feminino
L30	Feminino
L31	Feminino
L32	Masculino
L33	Feminino
L34	Feminino
L35	Feminino
L36	Feminino
L37	Masculino
L38	Feminino

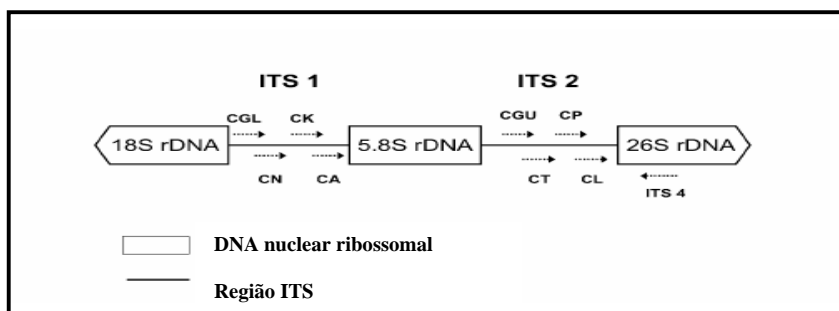
#### 5.4 CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida* POR PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA

Para todas as linhagens ATCC de *Candida* utilizadas para a produção do extrato protéico total como antígeno e nas colônias de *Candida* isoladas das hemoculturas positivas de número 1,2,3,6,7,8,9,16,17,18,19,20, 23 que foram obtidas referentes aos soros dos pacientes com candidemia, o DNA foi extraído para a confirmação da espécie por PCR espécie-específica (Figura 7).



**Figura 7-** PCR espécie específica para identificação de *Candida* spp. **Cn**, controle negativo, sem DNA na reação de PCR. Em **A**, **Ca** (*C. albicans*), 28: ATCC 18804; 1, 17, 20 e 23 DNAs extraídos de cultivos em Sabouraud a partir de hemoculturas de pacientes com candidemia por *C. albicans*. **Gu** (*C. guilliermondii*) 31: ATCC 46036; **Cgla** (*C. glabrata*), 30: ATCC 2001; 8 DNA extraído de cultivo em Sabouraud a partir de hemocultura de paciente com candidemia por *C. glabrata*. Em **B**, **Ck** (*C. krusei*), 37: ATCC 749; 16 DNA extraído de cultivo em Sabouraud a partir de hemocultura de paciente com candidemia por *C. krusei*. **A45** (*Cryptococcus neoformans*). **Cp** (*C. parapsilosis*), 32: ATCC 22019; 18 e 19 DNAs extraídos de cultivos em Sabouraud a partir de hemoculturas de pacientes com candidemia por *C. parapsilosis*. **6** (*C. intermedia*). **29** (*C. dubliniensis*). **CN** (controle negativo) do mix para 6 e 29.

Esta PCR espécie-específica consiste na amplificação das regiões transcritas internas 1 e 2 do gene do rRNA das espécies de *Candida*. Existem 8 *primers* espécie-específicos e 1 *primer* universal, o qual anela em uma região do gene rRNA 26S. Estes 8 *primers* identificam espécies de *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans*, cada um específico para cada espécie conforme esquematizado na figura abaixo (Figura 8).



**Figura 8**– Esquema da organização genômica do rDNA 18S, ITS 1, rRNA 5.8S, ITS 2 e rDNA 26S. CGL, CK, CN, CA, CGU, CP, CT e CL representam *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae* respectivamente. ITS4 foi o primer universal. (Li *et al.*, 2003).

Os tamanhos dos produtos de PCR são: *C. parapsilosis* 126 pb, *C. tropicalis* 149 pb, *C. albicans* 402 pb, *C. krusei* 475 pb, *C. glabrata* 632 pb, *C. guilliermondii* 185 pb, *C. lusitaniae* 116 pb e *Cryptococcus neoformans* 516 pb. *C. lusitaniae* não foi utilizada neste estudo.

Através dos resultados da PCR espécie-específica, resumidos na tabela 6, foram confirmadas todas as linhagens tipo de *Candida* utilizadas no presente estudo para a produção dos antígenos totais, com exceção de *C. tropicalis*, na qual não foi possível a amplificação do DNA desta linhagem como também os DNAs extraídos das hemoculturas referentes aos soros 2 e 7 de pacientes com candidemia acometidos por esta mesma espécie, assim como os DNAs referentes aos soros de número 9, de pacientes com candidemia por *C. albicans*, e de número 3, de pacientes com candidemia por *C. guilliermondii*, mesmo após vários testes com modificações na PCR. As espécies cujos DNAs foram extraídos das hemoculturas referentes aos soros 1, 17, 20 e 23, de pacientes com candidemia por *C. albicans*, *C. glabrata* (hemocultura referente ao soro 8), *C. krusei* (hemocultura referente ao soro 16) e *C. parapsilosis* (hemoculturas referentes aos soros 18 e 19) também foram confirmadas. Além destes, também foram testados o DNA extraído da linhagem de *C. dubliniensis* utilizada na produção do antígeno e o DNA extraído da hemocultura referente ao soro 6 de paciente com candidemia por *C. intermedia*. Como não havia primers para estas espécies, foi utilizado um mix, com todos os primers juntos, com a intenção de verificar a não amplificação com nenhuma das principais espécies de *Candida* presente em ICS. Por este motivo que estes dois produtos de PCR apresentaram um controle negativo

geral e todos os demais produtos apresentaram controles negativos individuais. Tanto *C. dubliniensis* como a hemocultura referente ao soro número 6, como estimado, não apresentaram amplificação.

**Tabela 6-** Resultados da PCR espécie-específica.

**A**

SOROS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA			
Nº DO SORO DO PACIENTE	AGENTE ETIOLÓGICO DA FUNGEMIA	OBTENÇÃO DA HEMOCULTURA	CONFIRMAÇÃO POR PCR*
1	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim
2	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Não
3	<i>C. guilliermondii</i>	Sim	Não
4	<i>C. albicans</i>	Não	-
5	<i>Penicillium</i>	-	-
6	<i>C. intermedia</i>	Sim	Sim
7	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Não
8	<i>C. glabrata</i>	Sim	Sim
9	<i>C. albicans</i>	Sim	Não
10	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-
11	<i>Cryptococcus sp</i>	-	-
12	<i>C. guilliermondii</i>	Não	-
13	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-
14	<i>C. albicans</i>	Não	-
15	<i>C. krusei</i>	Não	-
16	<i>C. krusei</i>	Sim	Sim
17	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim
18	<i>C. parapsilosis</i>	Sim	Sim
19	<i>C. parapsilosis</i>	Sim	Sim
20	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim
21	<i>Cryptococcus sp</i>	-	-
22	<i>C. albicans</i>	Não	-
23	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim
24	<i>C. tropicalis</i>	Não	-
25	<i>C. intermedia</i>	Não	-

**B**

ATCC	ESPÉCIE	CONFIRMAÇÃO POR PCR*
18804	<i>C. albicans</i>	Sim
750	<i>C. tropicalis</i>	Não
22019	<i>C. parapsilosis</i>	Sim
46036	<i>C. guilliermondii</i>	Sim
2001	<i>C. glabrata</i>	Sim
MYA646	<i>C. dubliniensis</i>	Sim
749	<i>C. krusei</i>	Sim

**A**, soros de pacientes com candidemia. **B**, linhagens tipo *Candida* spp.

\* PCR realizada com *primers* espécie-específicos, segundo item 4.4

## 5.5 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNO-ENZIMÁTICO (ELISA)

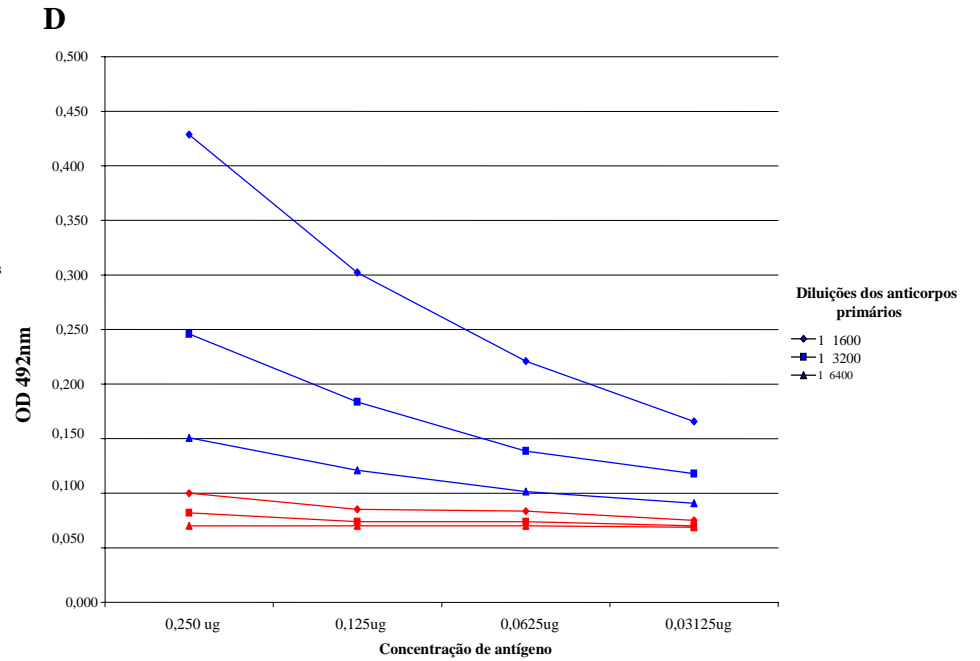
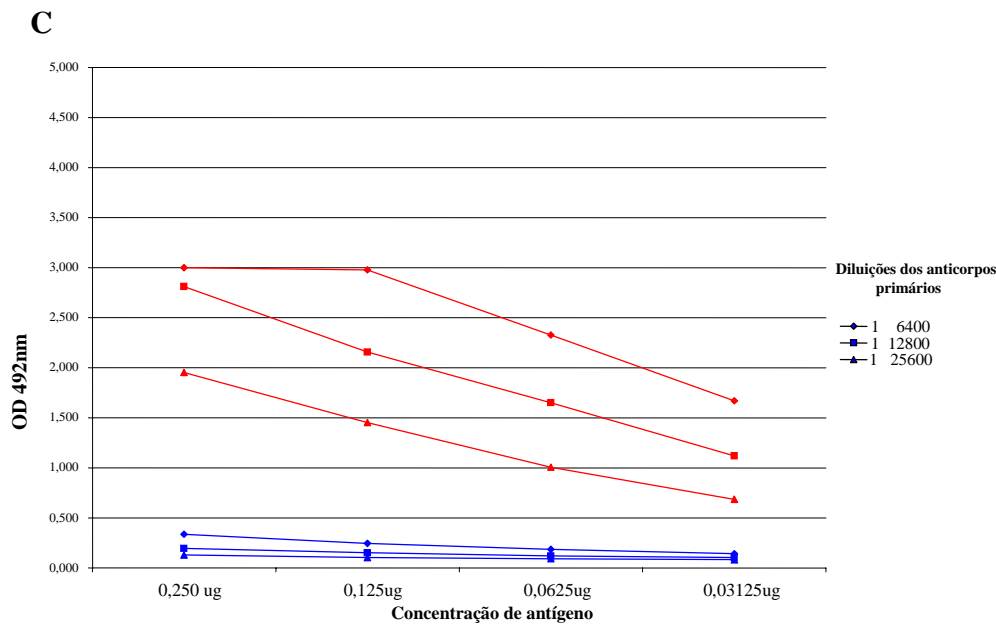
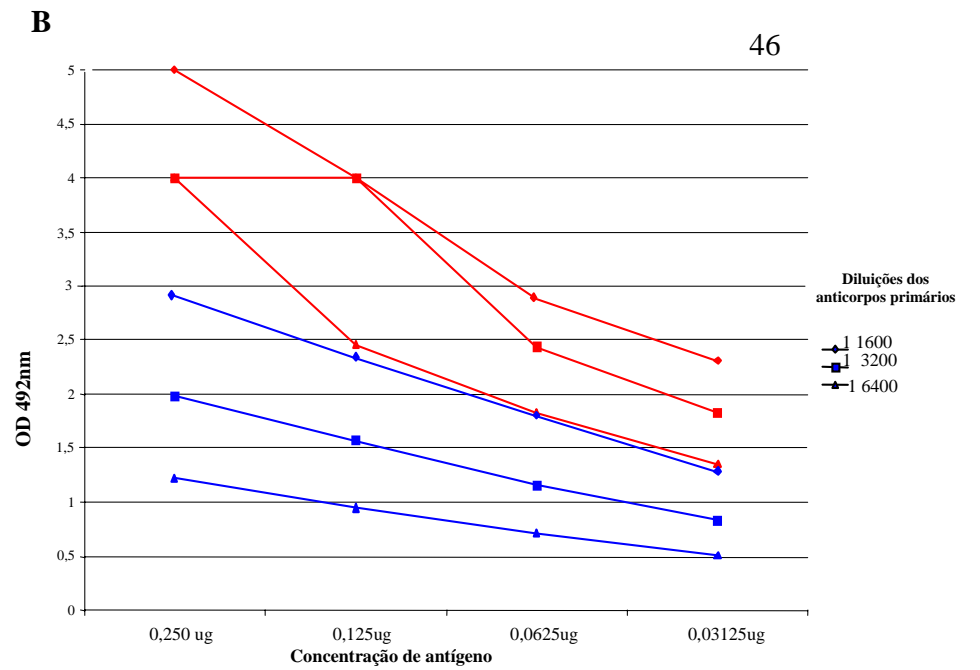
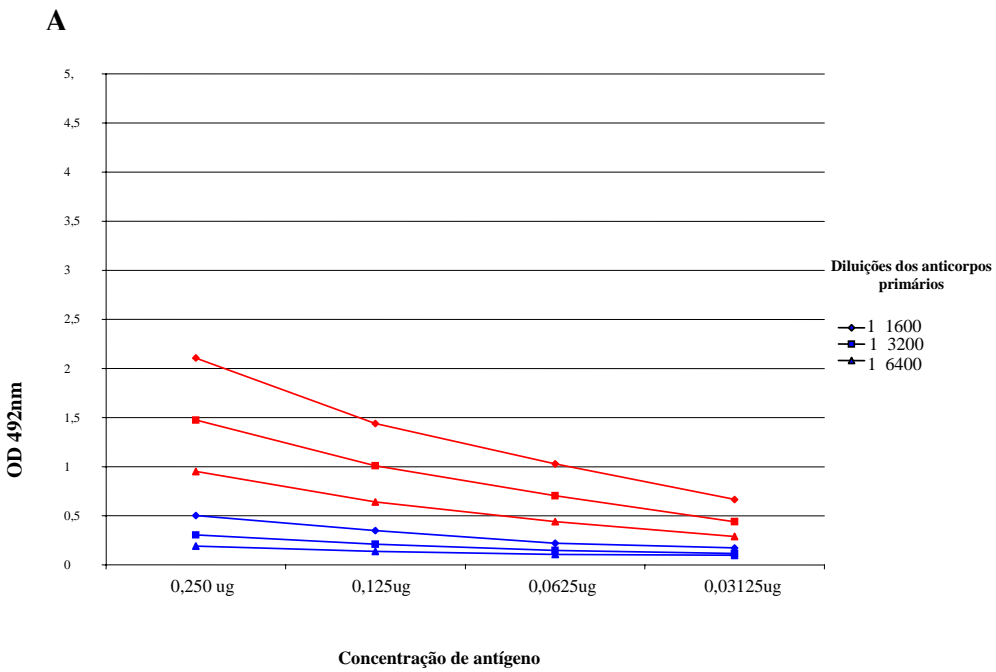
Inicialmente, o objetivo do projeto foi a padronização da técnica imuno-enzimática (ELISA) para cada antígeno protéico total individualmente para identificar a concentração do antígeno e a diluição do anticorpo primário ideal. Posteriormente à padronização destas condições para o ELISA, realizou-se os testes com os soros de pacientes com candidemia, separadamente.

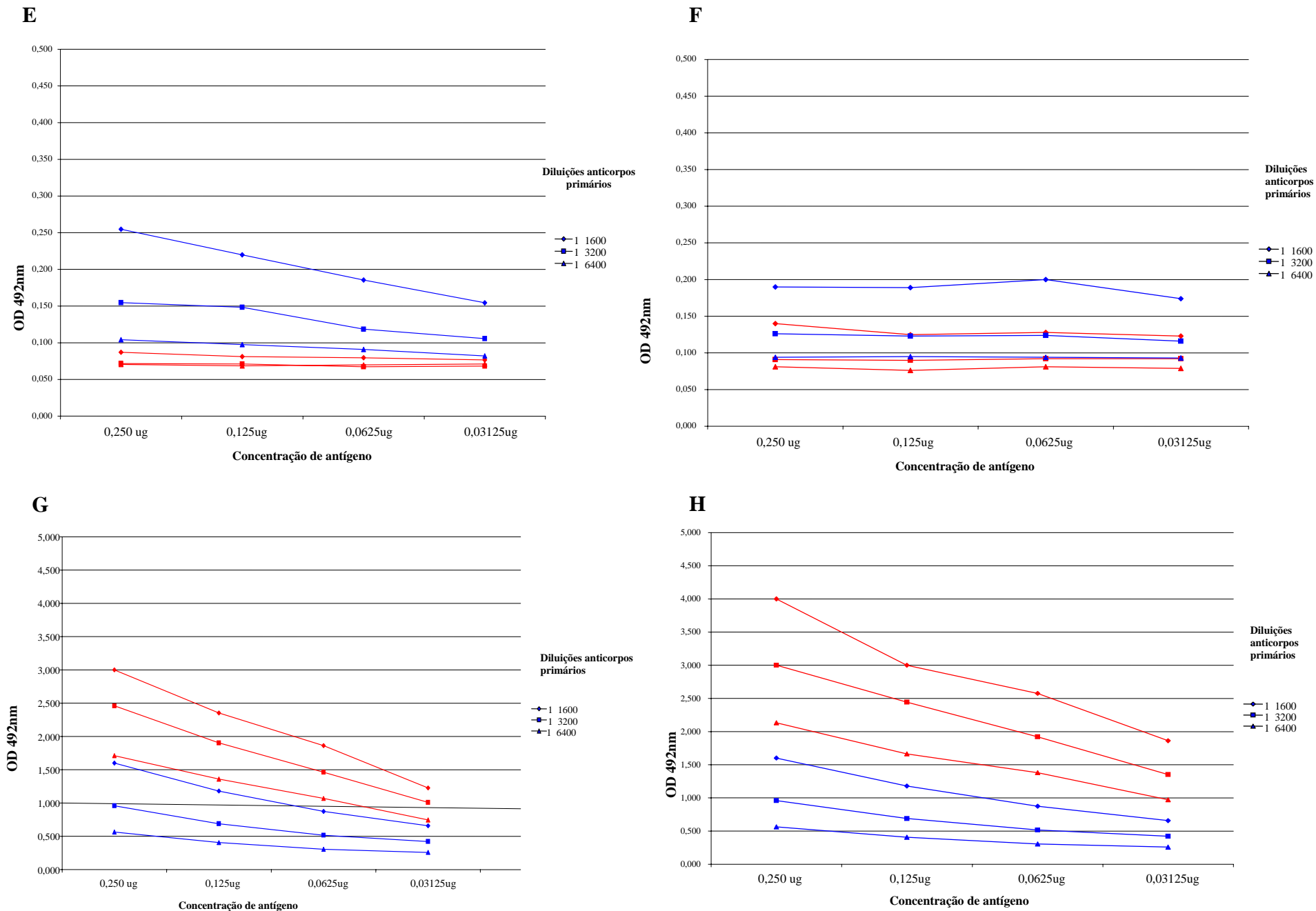
Para a padronização, foram realizados diversos testes com diferentes concentrações de antígenos e diferentes diluições, sempre com diluições seriadas. Assim, as concentrações dos antígenos testadas foram: 0,250 µg, 0,125 µg, 0,0625 µg e 0,03125 µg. Já as diluições para os anticorpos primários testados foram: 1: 1600, 1: 3200 e 1: 6400. Essas concentrações e diluições para os extratos protéicos totais foram utilizadas para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*, separadamente, com exceção da *C. tropicalis*, onde foi utilizada a concentração de antígeno 0,125 µg, 0,0625 µg, 0,03125 µg e 0,015625 µg e 1: 6400, 1: 12800 e 1: 25600 de anticorpo primário, pois os testes preliminares com as concentrações mencionadas acima para esta espécie demonstraram uma absorvância superior a absorvância máxima do leitor de microplaca. Utilizou-se para cada antígeno um *pool* de soros positivos referente a mesma espécie utilizada para a sensibilização da placa de ELISA e um *pool* de soros negativos, ou seja, de indivíduos hígidos. Isso gerou curvas, sendo possível observar e determinar as melhores concentrações de antígeno e diluição do anticorpo primário, que possibilitasse uma diferença no *pool* de soros positivos com os soros negativos, com as menores quantidades possíveis de soro e de antígeno.

Dessa maneira, para o antígeno de *C. guilliermondii*, foi preparado um *pool* de soros positivos com 2 soros de pacientes com candidemia (nº 3 e 12) acometidos por *C. guilliermondii* (Figura 9A). Para o antígeno de *C. albicans*, foi preparado um *pool* de soros positivos com 6 soros de pacientes com candidemia (nº 4, 14, 17, 20, 22 e 23) acometidos por *C. albicans* (Figura 9B). Para o antígeno de *C. tropicalis*, foi preparado um *pool* de soros positivos com 3 soros de pacientes com candidemia (nº 2, 7 e 24) onde o agente etiológico foi identificado como *C. tropicalis* (Figura 9C). Já para o antígeno de *C.*



*parapsilosis*, foi preparado um *pool* de soros positivos com 3 soros de pacientes com candidemia (nº 13, 18 e 19) acometidos por *C. parapsilosis* (Figura 9D). Para o antígeno de *C. krusei*, foi utilizado *pool* de soros positivos com 2 soros de pacientes com candidemia (nº 15 e 16) onde o agente era *C. krusei* (Figura 9E). Para o antígeno de *C. glabrata*, utilizou-se um *pool* de soros positivos com 2 soros coletados em períodos diferentes referente ao mesmo paciente (nº 8) acometido por *C. glabrata* (Figura 9F). E para o antígeno de *C. dubliniensis*, não havia soros disponíveis de pacientes com candidemia acometidos por *C. dubliniensis*, contudo, utilizou-se um *pool* de soros positivos com 6 soros de pacientes com candidemia (nº 4, 14, 17, 20, 22 e 23) acometidos por *C. albicans* (Figura 9G) e um *pool* 11 de soros positivos de pacientes com candidemia na qual o agente fosse NAC (nº 2, 3, 7, 8, 12, 13, 15, 16, 18, 19, e 24) (Figura 9H). Essa separação em dois grupos, pacientes com *C. albicans* e pacientes com *Candida* não-*albicans*, foi devido ao fato de *C. dubliniensis* e *C. albicans* serem muito semelhantes entre si, podendo gerar muita reatividade cruzada. O *pool* de soros negativos testados para cada antígeno individual foi o *pool* dos 32 soros de indivíduos hígidos obtidos neste estudo. Foram utilizados 4 controles para os ensaios imuno-enzimáticos: branco – B (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o antígeno), A1 (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o anticorpo primário), A2 (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o anticorpo secundário) e BL (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o Blotto).





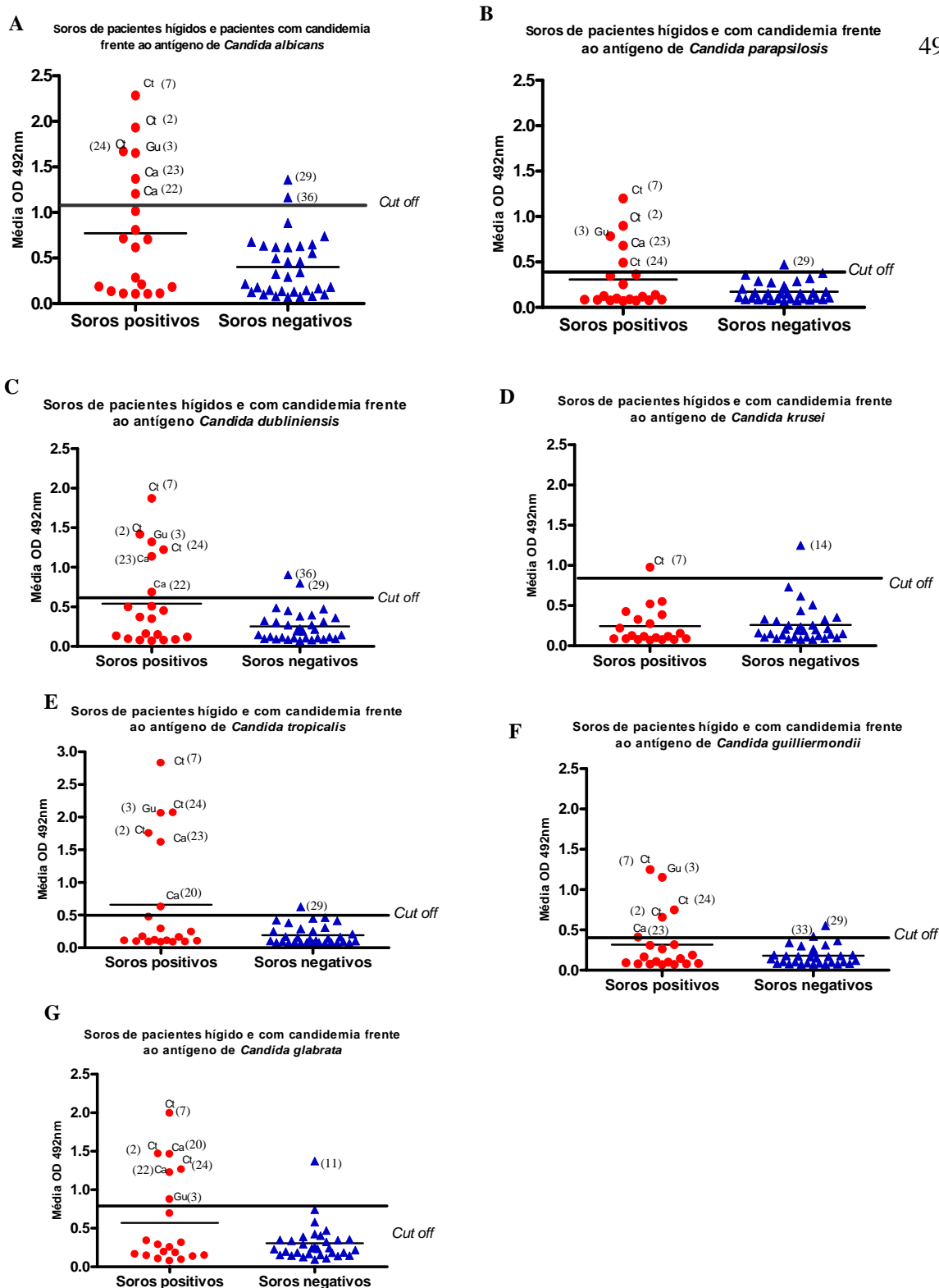
**Figura 9-** Padronização da concentração de antígeno e diluição de anticorpo primário para o teste de ELISA. Vermelho, soros positivos. Azul, indivíduos hígidos. **A,** *C. guilliermondii*. **B,** *C. albicans*. **C,** *C. tropicalis*. **D,** *C. parapsilosis*. **E,** *C. krusei*. **F,** *C. glabrata*. **G,** *C. dubliniensis* frente ao pool de soros positivos de pacientes com ICS por *C. albicans*. **H,** *C. dubliniensis* frente ao pool de soros positivos de pacientes com ICS por espécies NAC.

Com a padronização das condições para o ELISA, determinou-se que para *C. albicans* a concentração ótima de antígeno era 0,03125 µg e a diluição do anticorpo primário 1: 6400 para os testes posteriores com os soros individualmente; para o antígeno *C. guilliermondii*, 0,0625 µg de concentração de antígeno e 1: 3200 para a diluição do anticorpo primário; para o antígeno de *C. tropicalis*, determinou-se a concentração de antígeno 0,0625 µg e a diluição do anticorpo primário 1: 25600; para o antígeno de *C. parapsilosis*, a melhor concentração de antígeno era de 0,0625 µg e a diluição do anticorpo primário 1: 1600; para o antígeno de *C. krusei*, a melhor concentração de antígeno era de 0,125 µg e a diluição do anticorpo primário 1: 3200; para o antígeno de *C. glabrata*, a melhor concentração de antígeno era de 0,03125µg e a diluição do anticorpo primário 1: 1600; para o antígeno de *C. dubliniensis*, a melhor concentração de antígeno era de 0,03125 µg e a diluição do anticorpo primário 1: 6400.

## 5.6 TESTE ELISA PARA OS SOROS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA E PACIENTES HÍGIDOS

Após a padronização do ensaio imuno-enzimático para cada extrato protéico total, realizou-se testes com todos os soros individuais utilizados no presente estudo (soros positivos de pacientes com candidemia e soros negativos de pacientes hígidos), investigados separadamente, com cada antígeno protéico total de *Candida* utilizado neste trabalho.

Foram testados os soros de pacientes com candidemia (nº 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 13,14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24 e 25) e os 32 soros de indivíduos hígidos com o antígeno de *C. albicans* (Figura 10A), com antígeno de *C. parapsilosis* (Figura 10B), com o antígeno de *C. dubliniensis* (Figura 10C), com o antígeno de *C. krusei* (Figura 10D), com o antígeno de *C. tropicalis* (Figura 10E), com o antígeno de *C. guilliermondii* (Figura 10F) e com o antígeno de *C. glabrata* (Figura 10G).



**Figura 10-** Gráfico representativo de ELISA das principais espécies de *Candida* em infecção na corrente sanguínea. Círculos, soro de pacientes com candidemia. Triângulos, soro de indivíduos hígidos. **A**, 0,03215 µg de antígeno total de *C. albicans* e diluição dos soros primários 1:6400. **B**, 0,0625 µg de antígeno total de *C. parapsilosis* e diluição dos soros 1:1600. **C**, 0,03215 µg de antígeno total de *C. dubliniensis* e diluição dos soros primários 1:6400. **D**, 0,125 µg de antígeno total de *C. krusei* e diluição dos soros 1:3200. **E**, 0,0625 µg de antígeno total de *C. tropicalis* e diluição dos soros primários 1:25600. **F**, 0,0625 µg de antígeno total de *C. guilliermondii* e diluição dos soros 1:3200. **G**, 0,03215 µg de antígeno total de *C. glabrata* e diluição dos soros primários 1:1600.

Analisando os gráficos de ELISA, foi possível observar que houve reatividade cruzada de alguns soros positivos com os antígenos totais não só da mesma espécie causadora da candidemia, como também com as demais espécies analisadas no estudo. Houve sempre o mesmo padrão de soros positivos apresentando reatividade independente do antígeno testado. Assim, os soros de número 2, 7 e 24 de pacientes com candidemia acometidos por *C. tropicalis* e o soro de número 3 de paciente com candidemia acometido por *C. guilliermondii* sempre apresentaram resultados acima do ponto de corte quando testados com os antígenos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*. O soro de número 20 de paciente com candidemia por *C. albicans* apresentou resultado acima do ponto de corte apenas com dois antígenos mencionados anteriormente, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, e os soros de números 22 e 23 de pacientes com candidemia por esta mesma espécie apresentaram positividade para os antígenos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, respectivamente. Apenas o soro de número 7 de paciente com candidemia acometido por *C. tropicalis* apresentou resultado positivo frente ao antígeno de *C. krusei*. Todos os demais soros positivos utilizados nos testes de ELISA apresentaram resultados falso-negativos. Estes resultados também estão apresentados na Tabela 7.

Com relação aos soros negativos, poucos soros apresentaram resultados falso-positivos e, em geral, sempre se tratando do mesmo soro. Assim, os soros de número 29 e 36 apresentaram resultados acima do ponto de corte frente aos antígenos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Apenas o soro de número 29 também apresentou resultados acima do ponto de corte para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, sendo que, neste último antígeno, o soro de número 33 também apresentou resultado acima do ponto de corte. Já para os antígenos totais de *C. glabrata* e *C. krusei*, os soros que apresentaram resultados acima do ponto de corte foram os de número 11 e 14, respectivamente.

**Tabela 7-** Resultados dos testes de ELISA e da PCR espécie-específica para os soros de pacientes com candidemia obtidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Nº DO SORO DO PACIENTE	AGENTE ETIOLÓGICO DA FUNGEMIA	OBTENÇÃO DA HEMOCULTURA	CONFIRMAÇÃO POR PCR	RESULTADO DO ELISA REFERENTE AOS SOROS DE PACIENTES COM ICS PARA CADA ANTÍGENO							MOTIVO DA INTERNAÇÃO DO PACIENTE	IDADE DO PACIENTE
				<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. glabrata</i>		
1	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	UTI neonatal	0
2	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Não								internação cirúrgica	43
3	<i>C. guilliermondii</i>	Sim	Não								internação cirúrgica	65
4	<i>C. albicans</i>	Não	-								internação cirúrgica	59
5	<i>Penicillium</i>	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	não informado	não informado
6	<i>C. intermedia</i>	Sim	Sim								internação clínica	37
7	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Não								internação cirúrgica	66
8	<i>C. glabrata</i>	Sim	Sim								internação cirúrgica	37
9	<i>C. albicans</i>	Sim	Não	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	internação clínica	53
10	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	emergência adulto	65
11	<i>Cryptococcus sp</i>	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	não informado	não informado
12	<i>C. guilliermondii</i>	Não	-								oncologia pediátrica	16
13	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-								internação pediátrica	7 meses
14	<i>C. albicans</i>	Não	-								internação clínica (HIV)	31
15	<i>C. krusei</i>	Não	-								oncologia pediátrica	17
16	<i>C. krusei</i>	Sim	Sim								UTI (HIV)	22
17	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim								UTI	31
18	<i>C. parapsilosis</i>	Sim	Sim								transplante medula óssea	16
19	<i>C. parapsilosis</i>	Sim	Sim								emergência anemia severa	70
20	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim								UTI	não informado
21	<i>Cryptococcus sp</i>	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	internação clínica	não informado
22	<i>C. albicans</i>	Não	-								UTI	não informado
23	<i>C. albicans</i>	Sim	Sim								internação clínica	não informado
24	<i>C. tropicalis</i>	Não	-								internação cirúrgica	não informado
25	<i>C. intermedia</i>	Não	-								UTI	não informado

NT ( soro não testado)

- ( soro com resultado abaixo do ponto de corte para o antígeno testado)

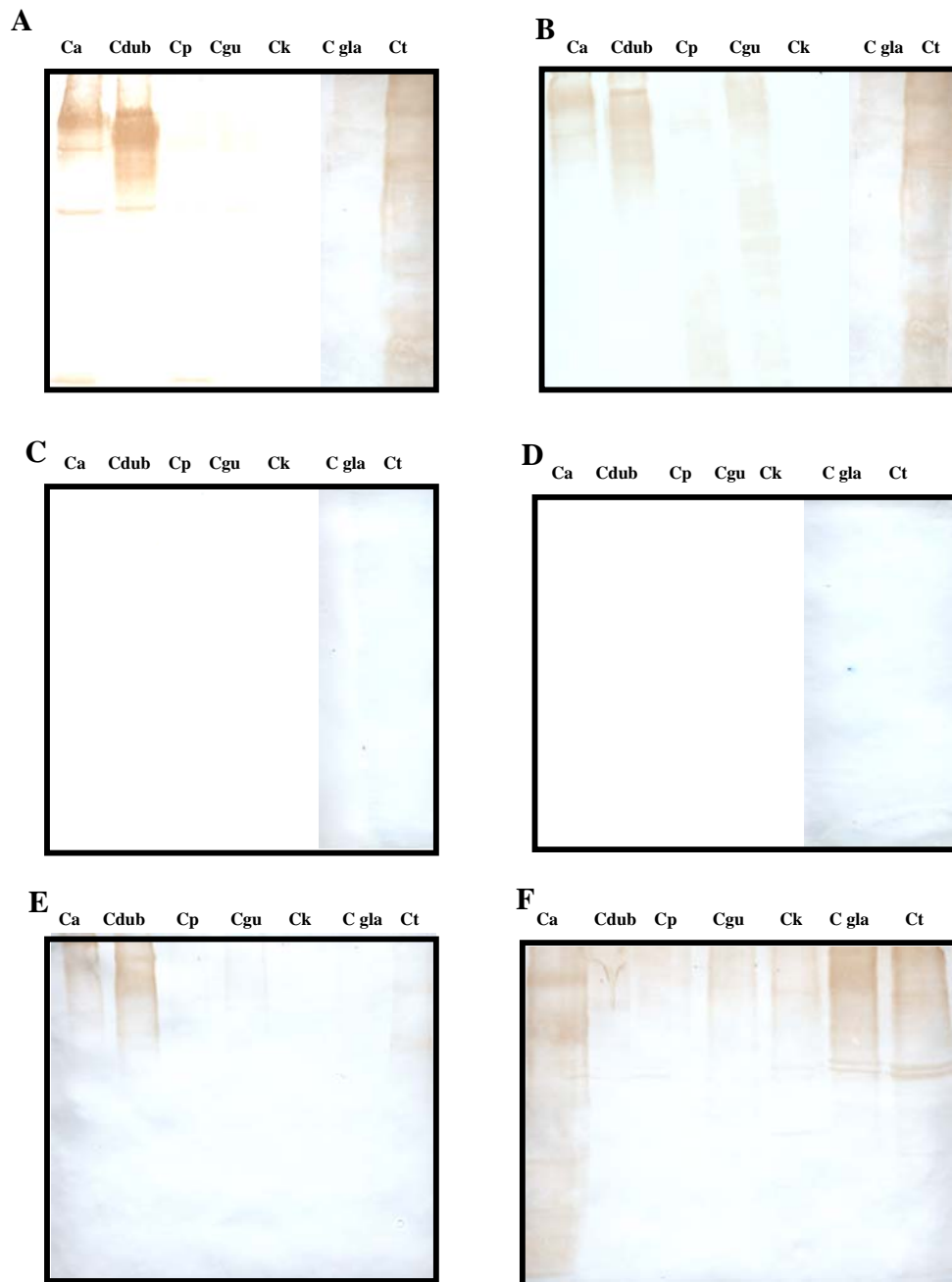
+ (soro com resultado acima do ponto de corte para o antígeno testado)

### 5.7 WESTERN BLOTTING

Após os testes de ELISA e verificada a reatividade cruzada entre as espécies com alguns soros de pacientes com candidemia, realizou-se a técnica de *western blotting* para se observar o perfil sequencial de bandas resultantes da reação do antígeno total com as amostras de soros dos pacientes com candidemia, ou seja, individualização de antígenos, a fim de investigar a presença de uma proteína diferenciada entre as espécies que futuramente pudesse ajudar a solucionar esta reatividade cruzada encontrada nos testes de ELISA.

Desta foram, utilizou-se as 7 espécies de *Candida* utilizadas neste estudo e um *pool* de soros de pacientes acometidos por *C. albicans* (soros nº 4, 14, 17, 20, 22 e 23, Figura 11A), *C. guilliermondii* (soro nº 3 e 12, Figura 11B), *C. parapsilosis* (soros nº 13, 18 e 19, Figura 11C), *C. krusei* (soros nº 15 e 16, Figura 11D), *C. glabrata* (soro nº 8, Figura 11E) e *C. tropicalis* (soros nº 2, 7 e 24, Figura 11F), separadamente. Para a realização destes experimentos, foi utilizado, após alguns testes com diferentes quantidades de proteínas, 10 µg de proteína de cada extrato protéico total de *Candida* utilizada no presente estudo e a metade da diluição padronizada para cada espécie na técnica de ELISA relatada anteriormente, ou seja, para o *western blotting* com o *pool* de soros de *C. albicans* foi utilizada a diluição 1:3200, para o *pool* de soros de *C. guilliermondii* e *C. krusei* foi utilizada a diluição 1: 1600, para o *pool* de soros de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* foi utilizada a diluição 1: 800 e para o *pool* de soros de *C. tropicalis* foi utilizada a diluição 1:12800.





**Figura 11-** Análise por *western blotting* dos antígenos totais das principais espécies de *Candida* em infecção na corrente sanguínea. **Ca** (*C. albicans*); **Cdub** (*C. dubliniensis*); **Cp** (*C. parapsilosis*); **Cgu** (*C. guilliermondii*); **Ck** (*C. krusei*); **Cgla** (*C. glabrata*); **Ct** (*C. tropicalis*); **A**, Pool de soros primários de pacientes com candidemia por *C. albicans* diluídos 1:3200. **B**, Pool de soros primários de pacientes com candidemia por *C. guilliermondii* diluídos 1:1600. **C**, Pool de soros primários de pacientes com candidemia por *C. parapsilosis* diluídos 1:800. **D**, Pool de soros primários de pacientes com candidemia por *C. krusei* diluídos 1:1600. **E**, Pool de soros primários de pacientes com candidemia por *C. glabrata* diluídos 1:800. **F**, Pool de soros primários de pacientes com candidemia por *C. tropicalis* diluídos 1:12800. Foram utilizados 10 µg de proteínas por canaleta.

Analisando os resultados do *western blotting*, foi possível observar um padrão coerente com os resultados apresentados no ELISA. Assim, o *pool* de soros de pacientes acometidos por *C. albicans* e *C. guilliermondii* reagiram com todos os antígenos totais, com exceção dos antígenos de *C. krusei* e *C. glabrata*, os quais não apresentaram ou apresentaram muito pouca reação antígeno-anticorpo. O *pool* de soros de pacientes acometidos por *C. tropicalis* também apresentou reatividade com todos os antígenos, principalmente com proteínas de maior massa molecular. O *pool* de soros de pacientes acometidos por *C. parapsilosis* e *C. glabrata* apresentou reatividade com os antígenos de *C. albicans* e *C. dubliniensis* demonstrando também esta reação antígeno-anticorpo mais especificamente com proteínas de maior massa molecular. Já o *pool* de soros de pacientes acometidos por *C. krusei* não demonstrou nenhuma reatividade com qualquer um dos antígenos totais testados.

## 6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, as infecções por *Candida* spp. começaram a receber atenção considerável da área médica, por apresentarem uma alta incidência e serem causa relevante de infecção na corrente sanguínea, apresentando uma alta mortalidade (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; AQUINO *et al.*, 2005). Além disso, as ICS constituem um sério problema devido ao longo tempo de internação e pelos altos custos médicos (CHENG *et al.*, 2005; SENDID *et al.*, 2006; TORTORANO *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 2007).

A distribuição de espécies de *Candida* spp isoladas de corrente sanguínea pode apresentar variações segundo a área geográfica e população em que são realizados os estudos, provavelmente devido a variações na microbiota endógena dos pacientes (SANDVEN, 2000; AQUINO *et al.*, 2005; WARNOCK, 2007). Nos últimos anos, houve um aumento de espécies de NAC, sendo relatados estudos onde estas atingiram a maioria dos casos de ICS, apontando o uso difundido de antibióticos do grupo dos azol como causa principal deste fato (COLOMBO *et al.*, 1999; KRCMEY & BARNES, 2002; RUIZ *et al.*, 2005; AQUINO *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; BASSETI *et al.*, 2006; BEDINI *et al.*, 2006). Algumas espécies como, por exemplo, *C. krusei* e *C. glabrata*, apresentam resistência às principais drogas deste grupo de antifúngicos e o desenvolvimento de resistência em amostras de *Candida* spp. é um fenômeno que tem ocorrido nos últimos anos, principalmente em pacientes que utilizaram fluconazol como profilaxia e em pacientes neutropênicos com câncer (LOEFFLER & STEVENS, 2003). Este fenômeno é mais evidente nos Estados Unidos, onde esta conduta é adotada há mais tempo do que na América do Sul e, especificamente, no Brasil (COLOMBO *et al.*, 1999).

Conseqüentemente, estes fatores, tanto do ponto de vista terapêutico, se tratando da resistência de algumas espécies de *Candida*, quanto do ponto de vista epidemiológico, relacionado com a alta incidência e variações geográficas e populacionais, demonstram a necessidade da identificação destas leveduras em nível de espécie, para permitir uma melhor abordagem terapêutica a ser instituída ao paciente infectado e monitoramento das taxas de infecções hospitalares, bem como para a identificação de surtos de infecções por *Candida*. No entanto, os sintomas clínicos da candidemia são inespecíficos, baseados

apenas em febre e calafrios não responsivos a antibióticos e os métodos convencionais de identificação destas leveduras não são completos ou apresentam falhas como, por exemplo, falta de sensibilidade ou especificidade, ou às vezes requerem procedimentos invasivos que não podem ser executados devido às condições clínicas de alguns pacientes (ELGUEZABAL *et al.*, 2005). Desta maneira, outros critérios diagnósticos estão sendo avaliados como alguns métodos sorológicos (BÄR & HECKER, 2002). Alguns ensaios comerciais, ELISA, por exemplo, estão emergindo, contudo ainda necessitam de uma padronização para ter uma maior confiabilidade (PERSAT *et al.*, 2002).

Os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico de candidemias podem ser baseados então na detecção de anticorpos contra *Candida* spp., detecção de antígenos deste microrganismo ou detecção de componentes não-antigênicos como, por exemplo, D-arabinitol, glicanas e ácidos nucleicos (QUINDÓS *et al.*, 2004).

Entre os antígenos potencialmente interessantes se encontram a enolase, um antígeno citoplasmático de 48 kDa (LAÍN *et al.*, 2007b) e a manana, um polissacarídeo da parede celular de leveduras e da fase micelial de *C. albicans* (POTÓN, 2006) altamente imunogênico para humanos (YERA *et al.*, 2001; QUINDÓS *et al.*, 2004). Entre os anticorpos se destacam aqueles dirigidos contra os antígenos da fase micelial (BIKANDI *et al.*, 1998; LAÍN *et al.*, 2007a).

Estudos realizados com provas experimentais desenvolvidas em laboratórios de investigação demonstraram que a detecção de mananas no soro de pacientes com candidemia permitiu um diagnóstico específico, contudo, pouco sensível devido à curta duração na circulação sanguínea, como evidenciado por SENDID *et al.* (1999) onde o ELISA comercial *Platelia Candida Antibody test*, Bio-Rad, France demonstrou uma especificidade de 94% e uma sensibilidade de 53% no diagnóstico de ICS por *Candida* através de detecção de anticorpos anti-manana em pacientes imunocompetentes.

Antígenos de *Candida* com atividade enzimática, como enolase, aspartil-proteinase e metalopeptidase, têm sido utilizados como alvos para a detecção de anticorpos. No entanto, kits comerciais não estão mais disponíveis atualmente devido a pouca sensibilidade ou falta de uma padronização mais apurada. Testes com a enolase apresentaram uma sensibilidade de 50 a 92,5% e uma especificidade de 78 a 95% para o diagnóstico de candidemia (LAÍN *et al.*, 2007b). Testes de ELISA para metalopeptidase de *C. albicans* apresentaram uma

sensibilidade de 83% e uma especificidade de 97% (MOUDIN *et al.*, 1998). Já no ELISA para a detecção de anticorpos contra aspartil-proteinase secretada (Sap) de *C. albicans*, um fator de virulência liberado durante a invasão tecidual, apresentou em um estudo com 33 soros de pacientes com candidemia, uma especificidade de 76% e uma sensibilidade de 69,7%, tornando-o menos desejável para o diagnóstico desta infecção (NA & SONG, 1999).

No presente estudo, objetivou-se a padronização de um ELISA para detectar anticorpos de pacientes com candidemia utilizando extrato protéico total de cada principal espécie de *Candida* envolvida na ICS, e não somente de *C. albicans* como a maioria dos estudos com este microrganismo, a fim de observar o comportamento e perfil destes ensaios frente ao extrato total. A primeira preocupação foi confirmar as espécies utilizadas tanto para a produção dos antígenos quanto as das hemoculturas referentes aos soros. Assim, esta confirmação foi obtida de todas as linhagens ATCC utilizadas para a produção dos extratos protéicos totais e de algumas colônias isoladas das hemoculturas positivas referentes aos soros dos pacientes com candidemia, com exceção das amostras referentes à *C. tropicalis*, as quais não apresentaram amplificação.

Na padronização das concentrações dos extratos protéicos totais e das diluições dos anticorpos primários a serem utilizadas para cada extrato de *Candida*, foram evidenciados três experimentos, um com o extrato protéico de *C. parapsilosis*, outro com o extrato protéico de *C. krusei* e, o terceiro, com o extrato protéico de *C. glabrata*, onde os soros de indivíduos hígidos se sobressaíram aos soros de pacientes com candidemia. Estes resultados foram ocasionados pelo fato dos soros utilizados nesta padronização serem de indivíduos com algum tipo de imunossupressão, como paciente HIV, transplantado de medula óssea, paciente da oncologia, paciente com anemia severa, além de um paciente recém-nascido de sete meses, o qual ainda não tem sua resposta imune bem estabelecida. Somente no terceiro extrato, de *C. glabrata*, não foi utilizado soros de pacientes com alguma imunossupressão.

Os resultados obtidos nos testes de ELISA com os soros individuais demonstraram uma alta reatividade cruzada de determinados soros com todos os antígenos totais, com exceção do antígeno total da *C. krusei* onde apenas um destes soros (soro nº 7 de paciente acometido por *C. tropicalis*) apresentou reatividade cruzada. Assim, os soros de número 2, 7 e 24 de pacientes com candidemia acometidos por *C. tropicalis* e o soro de número 3 de

paciente com candidemia acometido por *C. guilliermondii* sempre apresentaram resultados acima do ponto de corte quando testados com os antígenos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*. O soro de número 20 de paciente com candidemia por *C. albicans* apresentou resultado acima do ponto de corte apenas com dois antígenos mencionados anteriormente, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, e os soros de números 22 e 23 de pacientes com candidemia por esta mesma espécie apresentaram positividade para os antígenos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, respectivamente. Os demais soros não reagiram independente do extrato protéico total testado. Este fato pode ser explicado pela resposta imune do paciente estar atrasada ou diminuída, ou se tratar de um paciente imunocomprometido (ELLEPOLA & MORRISON, 2005), não sendo então, detectada no ELISA. Estes resultados falso-negativos, onde a produção de anticorpos varia de acordo com o estado imune do paciente, pode ser melhorado utilizando-se amostras seriadas de um mesmo paciente (POTÓN, 2006).

Em conseqüência da reatividade cruzada apresentada nos testes de ELISA, foi realizada análise por *western blotting* para observar o perfil protéico de cada um dos 7 extratos protéicos totais de *Candida* utilizados neste estudo, frente a *pool* de soros de paciente com candidemia acometidos por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, separadamente. Analisando estes resultados, foi possível observar um padrão coerente com os resultados de ELISA, onde os soros que apresentaram reatividade cruzada, ou seja, os soros de pacientes acometidos por *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* confirmaram a reatividade com todos os antígenos com exceção dos extratos de *C. krusei* e *C. glabrata*, duas espécies importantíssimas devido à resistência ao principal grupo de antifúngicos utilizados na ICS, onde estes soros demonstraram nenhuma ou pouca reatividade. Já o *pool* de soros de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* demonstrou alguma reatividade, principalmente com proteínas de maior massa molecular, somente com *C. albicans* e *C. dubliniensis*, uma espécie descrita em 1995 (SULLIVAN *et al.*, 1995) e muito semelhante a *C. albicans*.

Os soros de pacientes com candidemia acometidos por *C. krusei* foram os únicos que não reagiram com nenhum dos 7 extratos nos testes de ELISA e nas análises de *western blotting*. Provavelmente isto tenha ocorrido pelo fato de pacientes acometidos por esta espécie geralmente serem portadores de doenças hematológicas malignas ou serem

submetidos a transplante de medula óssea (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003) e isso gerar uma resposta imune ausente ou diminuída, dificultando sua detecção. No caso, foi evidenciado que estes dois soros eram um de paciente com HIV e o outro de paciente da oncologia pediátrica, podendo explicar a falta de resposta imune por imunodepressão e quimioterapia, respectivamente.

Esta reatividade cruzada entre as espécies verificadas no presente estudo foi devida à utilização de extratos protéicos totais. No entanto, isto pode ser futuramente aperfeiçoado selecionando-se antígenos apropriados, moléculas purificadas ou antígenos recombinantes (QUINDÓS *et al.*, 2004; ELGUEZABAL *et al.*, 2005). Alguns estudos relatam que os primeiros antígenos utilizados na detecção de anticorpos em pacientes com candidemia também utilizavam extratos antigênicos muito complexos que sempre incluíam as mananas. Nestes trabalhos, se detectavam fundamentalmente anticorpos anti-manana, que estão presentes em pacientes com candidemia e também em pacientes sem infecção por *Candida*, além de indivíduos hígidos, o que reduzia a especificidade das provas, fato este também verificado no presente estudo, onde alguns soros de pessoas hígidas apresentaram alguma reatividade. No entanto, apesar da baixa especificidade que apresenta a detecção de anticorpos anti-manana, estes anticorpos podem ter utilidade no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com candidemia se estudada a evolução dos títulos de anticorpos em amostras seriadas de um mesmo paciente (POTÓN, 2006).

Na tentativa do aumento da especificidade do diagnóstico sorológico da candidemia, têm sido utilizados antígenos da fase micelial de *C. albicans*, uma vez que a fase micelial facilita a penetração do fungo nos tecidos e, portanto, os anticorpos contra os antígenos desta fase morfológica poderiam ser um marcador de invasão tissular. Como exemplo, podemos citar LAÏN *et al.* (2007a) que têm utilizado o antígeno recombinante Hwp1 da parede celular de *C. albicans* em um teste de ELISA para detectar a presença de anticorpos em paciente com ICS por *Candida*, o qual demonstrou uma sensibilidade de 88,9% e uma especificidade de 82,6%.

Portanto, o diagnóstico desta infecção utilizando métodos independentes do cultivo, ou seja, detecção de antígenos, anticorpos, componentes não antigênicos e métodos moleculares, podem ser úteis em paciente crítico febril que apresenta hemoculturas negativas e fatores de risco para desenvolver esta infecção fúngica. Em geral, as combinações de várias provas podem ser úteis para superar as deficiências de cada prova

individual (FUGITA *et al.*, 2006). Já a reatividade cruzada na utilização de extratos protéicos totais pode ser aperfeiçoada selecionando-se antígenos específicos, moléculas purificadas ou antígenos recombinantes (QUINDÓS *et al.*, 2004; ELGUEZABAL *et al.*, 2005). Algumas das proteínas características de cada espécie individualizada podem ser candidatos em potencial para expressão heteróloga e produção de antígeno recombinante para novos testes.



## 7 CONCLUSÕES

- Muitos estudos para diagnóstico de ICS por *Candida* são direcionados para *C. albicans* e ainda apresentam pouca sensibilidade, o que demonstra a necessidade de mais estudos nesta área e testes mais minuciosos, padronizados e confiáveis.
- A utilização de extrato protéico total gera muita reatividade cruzada com outras espécies de *Candida* e a presença de imunossupressão pode dificultar os testes sorológicos. Para solucionar estas dificuldades são necessárias a utilização de antígenos recombinantes ou de moléculas purificadas e amostras seriadas dos pacientes, respectivamente.
- Para ter uma maior confiabilidade do teste, é necessário aumentar o número de soros de pacientes com candidemia e ter amostras seriadas de um mesmo paciente para tentar solucionar problemas de resposta imune muito baixa ou ausente que dificultam sua detecção nos testes.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A.G.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; AVEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Candidemia in a brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46:239-241, 2004.

AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidaemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 9:411-418, 2005.

BÄR, W.; HECKER, H. Diagnosis of systemic *Candida* infections in patients of the intensive care unit. Significance of serum antigens and antibodies. *Mycoses*, 45: 22-28, 2002.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F.B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BCM Infectious Diseases*, 6:21, 2006.

BEDINI, A.; VENTURELLI, C.; MUSSINI, C.; GUARALDI, G.; CODELUPPI, V.; BORGHI, V.; RUMPIANESI, F.; BARCHIEST, F.; ESPOSITO, R. Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in a Italian tertiary-care hospital. *Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 12: 75-80, 2006.

BIKANDI, J.; MILLÁN, R.S.; REGÚLEZ, P.; MORAGUES, M.D.; QUINDÓS, G.; POTÓN, J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes during experimental infections by different *Candida* species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5:369-374, 1998.

BOTA, D.P.; VILLALOBOS, H.R.; DIMOPOULOS, G.; MELOT, C.; VICENT, J.L. Potential risk factors for infection with *Candida* spp in critically ill patients. *Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 10: 550-555, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

CHANG, H.C.; LEAW, S.N.; HUANG, A.H.; WU, T.L.; CHANG, T.C. Rapid Identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3466-3471, 2001.

CHENG, M.; YANG, Y.; YAO, T.; LIN, C.; LIU, J.; TANG, R.B; YU, K.; FAN, Y.; HSIEH, K.; HO, M.; LO, H. Risk factors for fatal candidaemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BCM Infectious Diseases*, 5:22, 2005.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36:599-607, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non-*albicans* candidaemia in brazilian tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34:281-286, 1999.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOKC, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:2816-2823, 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCÍA-EFFRÓN, G.; TUDELA-RODRIGUEZ, J. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49:981-987, 2002.

DIMOPOULOS, G.; KARABINIS, A.; SAMONIS, G. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26:377-384, 2007.

EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; MC CLISH, D.K.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 29:239-244, 1999.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, 3:685-702, 2003.

ELGUEZABAL, N.; LOPITZ-OTSOA, F.; LAÍN, A.; LARRINOA, I.F.; MORAGUES, M.D.; POTÓN, J. Serodiagnosis of mycosis using recombinant antigens. *Mycopathologia*, 160:97-109, 2005.

ELLEPOLA, A.N.B.; MORRISON, C. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology*, 43:65-84, 2005.

ERJAVEC, Z.; VERWEIJ, P.E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resistance Updates*, 5:3-10, 2002.

FILLER, S. G.; SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathogens*, 2: 1099-1105, 2006.

FRADIN, C.; MAVOR, A. L.; WEINDL, G.; SCHALLER, M.; HANKE, K.; KAUFMANN, S. H. E.; MOLLENKOPF, H. HUBE, B. The early transcriptional response

of human granulocytes to infection with *Candida albicans* is not essential for killing but reflects cellular communications. *Infection and Immunity*, 75:1493-1501, 2007.

FUJITA, S.; TAKAMURA, T.; NAGAHARA, M.; HASHIMOTO, T. Evaluation of a newly developed down-flow immunoassay for detection of serum mannan antigens in patients with candidaemia. *Journal of Medical Microbiology*, 55:537-543, 2006.

GALVÁN, B. & MARISCAL, F. Epidemiología de la candidemia em UCI. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23:12-15, 2006.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:2458-2464, 2006.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; BELINDA, C.; ALMEIDA, L.P.; MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp bloodstreams isolates from Latin American hospitals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98:401-405, 2003.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIEGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:454-500, 1999.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M.J. CD-ROM *Atlas of Clinical Fungi*, 2004.

JOHNSON, D.A.; GAUTSCH, J.W.; SPORTSMAN, J.R.; ELDER, J.H. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Analysis Techniques*, 1:3-8, 1984.

KARLOWSKY, J.A.; ZHANEL, G.G.; KLYM, K.A.; HOBAN, D.J.; KABANI, A.M. Candidemia in a Canadian tertiary care hospital from 1976 to 1996. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 28:5-9, 1997.

KARTHAUS, M. & CORNELLY, O.A. Treatment options in candidaemia. *Mycoses*, 50:44-49, 2007.

KRAUSE, W.; MATHEIS, H.; WULP, K. Fungemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *The Lancet Infectious Diseases*, 598-599, 1969.

KRCMERY, V. & BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, 50:243-260, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; VACCARI, E.M.H.; MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*. Ed Sarvier, São Paulo, 2002.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-85, 1970.

LÁIN, A.; ELGUEZABAL, N.; BRENA, S.; GARCÍA-RUIZ, J. C.; PALACIO, A.; MORAGUES, M. D.; POTÓN, J. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein I. *BCM Microbiology*, 7:35, 2007a.

LÁIN, A.; MORAGUES, M. D.; GARCÍA-RUIZ, J. C.; MENDOZA, J.; CAMACHO, A.; PALACIO, A.; POTÓN, J. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14:318-319, 2007b.

LI, YL; LEAW, JH; CHEN, H; CHANG, HC; CHANG, TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 22:693-696, 2003.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 36:31-41, 2003.

LÓPEZ-RIBOT, JL; CASANOVA, M; MURGUI, A; MARTÍNEZ, JP. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 41: 187-196, 2004.

MAYER, R.J.; WALKER, J.H. Immunological methods in cell and molecular biology. *London, Academic Press*, 325, 1987.

MEGIOVANNI, A.M.; SANCHEZ, F.; SARMIENTO, M.R.; MOREL, C.; GLUCKMAN, J.C.; BOUDALY, S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *Journal of Leukocytes Biology*, 79:977-988, 2006.

MOUDIN, B.; RODIER, M.; DANIAULT, G.; JACQUEMIN, J. L. Improved immunodiagnosis of human candidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay using a *Candida albicans* 52-kilodalton metalloproteinase. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5:823-825, 1998.

NA, B. & SONG, C. Use of monoclonal antibody in diagnosis of candidiasis caused by *Candida albicans*: Detection of circulating aspartyl proteinase antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6:924-929, 1999.

ODDS, F.C. *Candida* and candidosis. Leicester University Press, 1-2, 1979.

PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; ARAÚJO, C. R.; NASCIMENTO, E.S.; SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; SALES, W.S.; SILVA, M.R.R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Myopathologia*, 163:145-151, 2007.

PÉMAN, J.; CATÓN, E.; GOBERNARDO, M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-years multicentre study in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24:23-30, 2005.

PERSAT, F.; TOPENOT, R.; PIENS, M.A.; THIEBAUT, A.; DANNAOUI, E.; PICOT, S. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidosis. *Mycoses*, 45:455-460, 2002.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.L. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20:133-163, 2007.

POTÓN, J. Microbiological non-culture methods for the diagnosis of invasive candidiasis: usefulness of surrogate markers. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23:2025, 2006.

QUINDÓS, G.; MORAGUES, M.D.; PONTÓN, J. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 10-14, 2004.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.E.; PIRES, M.F.C.; SILVA, B.C.M.; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; SILVA, E.G.; AULER, M.E.; PAULA, C.R. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the public hospital, Botucatu, São Paulo. *Journal de Micologie Médicale*, 15:13-21, 2005.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidaemia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17:73-81, 2000.



SENDID, B.; TABOURET, M.; POIROT, J.L; MATHIEU, D.; FRUIT, J.; POULAIN, D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* manana e anti-manana antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:1510-1517, 1999.

SENDID, B.; COTTEAU, A.; FRAÇOIS, N.; HAVELOOSE, A.; STANDAERT, A.; CAMUS, D.; POULAIN, D. Candidaemia and antifungal therapy in a French University hospital: rough trends over a decade and possible links. *BCM Infectious Diseases*, 6:80, 2006.

SHOHAM, S. & LEVITZ, S.M. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*, 129:596-582, 2005.

SIDRIM, J.C.S., ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2004.

SLAVIN, M.A. The epidemiology of candidaemia and mould infections in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49:3-6, 2002.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis* characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:329-334, 1998.

SULLIVAN, D.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNETT, D. E.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141:1507-1521, 1995.

TORTORANO, A.M.; PAMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C.C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month

European confederation of medical mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23:317-322, 2004.

TORTORANO, A.M.; KIBBLER, C.C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27:359-366, 2006.

UZUN, O.; ASCIOGLU, S.; ANAISSIE, E.J.; REX, J.H. Risk factors and predictors of outcome in patients with cancer and breakthrough candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1713-1717, 2001.

VERWEIJ, P. E.; BREUKER, J. M.; RIJS, A. J. M. M.; MEIS, J. F. G. M. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *Journal of clinical pathology*, 52:271-273, 1999.

VOSS, A.; KLUYTMAS, J. A.; KOELEMAN, J. C.; SPANJAARD, L.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; VERBRUGH, H. A.; VOS, M. C.; WEERSINK, A. Y.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A; MEIS, J. F. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15:909-912, 1996.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 48:1-12, 2007.

WHITE, P.L.; ARCHER, A.E.; BARNES, R.A. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:2181-2187, 2005.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, 1990 apud LI, YL; LEAW, JH; CHEN, H; CHANG, HC; CHANG, TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 22:693-696, 2003.

YANG, Y. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 36:223-228, 2003.

YERA, H.; SENDID, B.; FRANÇOIS, N.; CAMUS, D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20:864-870, 2001.

ZHANG, D.; YANG, Y.; CASTLEBURY, L.A.; CERNIGLIA, C.E.A. A method for the large scale isolation of high transformation. *FEMS Microbiology Letter*, 145:261-265, 1996.