

Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos

Opportunistic yeast infections and enzymatic profile of the etiological agents

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo¹, Aline Mary de Almeida Farias¹,
Reginaldo Gonçalves de Lima Neto¹, Vanessa Karina Alves da Silva¹,
André Ferraz Goiana Leal¹ e Rejane Pereira Neves¹

RESUMO

Infecções por leveduras são freqüentes em imunocomprometidos, contudo espécies emergentes têm alterado o perfil epidemiológico. A habilidade de secretar proteases tem sido associada à patogenicidade do gênero *Candida*. Esta pesquisa teve como objetivos diagnosticar leveduroses em pacientes imunocomprometidos e avaliar a virulência dos agentes etiológicos baseado em teste de secreção de protease utilizando soro de albumina bovina como substrato. Do total de 104 pacientes estudados, 19 apresentaram episódios de leveduroses. O trato respiratório (63,2%), seguido pelo trato urinário (10,5%) foram os locais mais comuns de infecção. *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e espécies emergentes como *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* foram isoladas. Cinco isolados de *Candida parapsilosis* e um de *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* exibiram alta atividade enzimática. Concluímos que a caracterização enzimática de isolados de *Candida* pode ser um útil marcador prognóstico, especialmente em imunocomprometidos, uma vez que leveduroses nestes pacientes são geralmente graves.

Palavras-chaves: Infecções por leveduras. Imunocomprometidos. Atividade proteásica. Patogenicidade.

ABSTRACT

Yeast infections are common in immunocompromised patients, although emerging species have been changing the epidemiological profile. The ability to secrete proteinases has been associated with pathogenicity within the genus *Candida*. This study had the aims of diagnosing yeast infections in immunocompromised patients and evaluating the virulence of the etiological agents, based on a proteinase secretion assay using bovine serum albumin as a substrate. Out of a total of 104 patients studied, 19 presented episodes of yeast infection. The respiratory tract (63.2%), followed by the urinary tract (10.5%), were the most common sites of infection. *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* and emerging species such as *Candida krusei* and *Candida guilliermondii* were isolated. Five isolates of *Candida parapsilosis* and one of *Candida albicans* and *Candida guilliermondii* exhibited high enzymatic activity. We conclude that enzymatic characterization of *Candida* isolates may be a useful prognostic marker, especially among immunocompromised individuals, since yeast infections in such patients are generally serious.

Key-words: Yeast infections. Immunocompromised patients. Proteinase activity. Pathogenicity.

A incidência de infecções oportunistas por leveduras tem se tornado crescente, devido à maior agressividade no tratamento de neoplasias, transplante de órgãos, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), lupus eritematoso sistêmico (LES), entre outras doenças^{21 25}.

Infecções sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são freqüentes no hospedeiro imunocomprometido, com aproximadamente 20 espécies reconhecidamente patogênicas destacando-se *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida*

glabrata^{8 21 24}, sendo consideradas de difícil diagnóstico com altas taxas de morbidade e mortalidade, apesar das terapias antifúngicas²⁹.

Atualmente, podemos evidenciar uma mudança marcante no perfil epidemiológico das leveduroses ao serem relatados casos de infecções por espécies emergentes^{6 21 29}.

Estas leveduras apresentam a habilidade de passar da condição de comensal a patogênica quando sob condições favoráveis no hospedeiro, dependendo para isso dos diversos fatores de virulência, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases¹⁵.

Atividade proteásica relaciona-se diretamente com a degradação de componentes teciduais como colágeno, queratina e mucina, além de componentes imunológicos como anticorpos, complemento e citocinas. A habilidade de leveduras de interesse médico em secretar proteases tem sido associada a fatores de patogenicidade³⁰.

1. Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Endereço para correspondência: Dra Rejane Pereira Neves. Rua José Paraíso 135/01, Boa Viagem, 51030-390 Recife, PE.

Fax: 55 81 2126-8482

e-mail: rejadel@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 05/12/2008

Aceito em 20/03/2009

O presente estudo objetivou diagnosticar infecções oportunistas por leveduras e avaliar a virulência dos agentes etiológicos quanto à produção de protease.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes. Foram avaliados pacientes imunocomprometidos internados em diversos setores do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HCPE), no período de Janeiro de 2006 a janeiro de 2007, com sintomatologia e/ou lesões sugestivas para levedurosos. Os quadros clínicos mais comuns foram definidos de acordo com o local de acometimento: infecções do trato respiratório, trato urinário, trato gastrointestinal e casos de lesões localizadas ou disseminação.

A coleta das amostras clínicas foi realizada de acordo com o local e características das lesões, após aprovação pelo Comitê de Ética em Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). No Laboratório de Micologia Médica da UFPE, as amostras foram processadas através de método padrão (exame direto e cultura) para diagnóstico micológico segundo Lacaz e cols¹⁹. O exame direto das amostras obtidas foi realizado a partir de preparações em lâminas a fresco, clarificadas com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 20% ou contrastadas com tinta Nankin. Posteriormente, o material para análise foi semeado em quadriplicata nos meios ágar Sabouraud (Difco) e Brain Heart Infusion (Difco), ambos contendo 50mg/L de cloranfenicol. As placas foram mantidas a 30°C e 37°C durante dez dias.

Isolados. A identificação dos agentes etiológicos foi realizada segundo Barnett e cols³ e Hoog e cols¹⁴ através da observação das características macroscópicas (aspecto, coloração e bordos das colônias), microscópicas (presença de pseudomicélio, micélio verdadeiro e produção de clamidosporos) e fisiológicas (assimilação

de fontes de nitrogênio e carbono, fermentação de fontes de carbono e produção de urease). As leveduras também foram avaliadas através de método automatizado VITEK 120 (BioMérieux).

Deteção de protease. Testes preliminares de patogenicidade foram desenvolvidos através da detecção da enzima protease utilizando-se meio indutor contendo soro de albumina bovina (BSA, fração V, Sigma, St Louis, MO) como substrato¹. As leveduras isoladas foram suspensas em 1,0mL de água destilada esterilizada e contadas em câmara de Neubauer obtendo-se concentração de 106 células/mL. Posteriormente, foram inoculadas em poços no referido meio de cultura e incubadas a temperatura de 37°C, com o objetivo de detectar a formação de um halo transparente. O teste foi realizado em triplicata com leitura ao final de sete dias e cálculo da zona de atividade (ZA) que equivale à relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de precipitação. Os valores da ZA foram agrupados em quatro classes: ausente (-; 1,0); muito baixo (+; 0,90-0,99); baixo (++; 0,80-0,89); alto (+++; 0,70-0,79)²⁸.

RESULTADOS

Foram avaliados 104 pacientes internados no HCPE os quais apresentaram diversas doenças de base e fizeram uso prolongado de drogas que conduziram a estados de imunossupressão permanente ou transitória, no período de janeiro de 2006 a janeiro de 2007. Destes, 19 pacientes exibiram estado de neutropenia e apresentaram na microscopia direta das amostras clínicas numerosas células de leveduras brotantes, com formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro. Foi obtido um isolado de levedura para cada caso avaliado, com exceção de um paciente que apresentou lesões em sítios corpóreos distintos (**Tabela 1**). A idade variou entre 16 e 86 anos, destacando-se o sexo feminino com 53% dos casos.

TABELA 1

Infecções oportunistas por leveduras e atividade proteásica dos agentes etiológicos.

Paciente	Sexo	Idade	Doença de base	Local	Espécies de <i>Candida</i>	ZA
1	M	32	insuficiência renal	TGI	<i>Candida albicans</i>	++
2	M	33	tuberculose pulmonar	TR	<i>Candida krusei</i>	++
3	M	72	câncer e diabetes mellitus	TR	<i>Candida parapsilosis</i>	+++
4	F	55	hipotireoidismo	TU	<i>Candida albicans</i>	++
5	M	26	AIDS	TR	<i>Candida tropicalis</i>	+
6	F	50	lupus eritematoso	disseminada	<i>Candida albicans</i>	++
7	M	24	tuberculose pulmonar	TR	<i>Candida albicans</i>	++
8	M	58	câncer	Pele	<i>Candida guilliermondii</i>	+++
9	F	60	diabetes mellitus	TR	<i>Candida parapsilosis</i>	+++
10	F	16	lupus eritematoso	TR	<i>Candida parapsilosis</i>	+
11	M	26	AIDS	TR	<i>Candida albicans</i>	+++
12	M	86	osteomielite	tecido ósseo e pele	<i>Candida parapsilosis</i>	+++
13	F	35	tuberculose pulmonar	TR	<i>Candida albicans</i>	++
14	F	63	diabetes mellitus	TU	<i>Candida albicans</i>	+++
15	F	27	insuficiência renal	TR	<i>Candida tropicalis</i>	+
16	F	52	diabetes mellitus	disseminada	<i>Candida parapsilosis</i>	+++
17	M	31	pneumonia	TR	<i>Candida albicans</i>	++
18	F	82	insuficiência renal	TR	<i>Candida albicans</i>	++
19	F	20	AIDS	TR	<i>Candida albicans</i>	-

ZA: zona de atividade proteásica, F: sexo feminino, M: sexo masculino, TGI: trato gastrointestinal, TR: trato respiratório, TU: trato urinário. AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida, -: ausente, +: muito baixa, ++: baixa, +++: alta.

As condições de imunossupressão relacionadas às leveduras diagnosticadas incluíram insuficiência renal crônica e aguda, tuberculose pulmonar, SIDA, diabetes mellitus, LES, entre outras doenças de base, associadas aos seus respectivos tratamentos. Quanto à localização das leveduras, verificamos que o local mais acometido foi o trato respiratório com 63,2%, seguido pelo trato urinário com 10,5% dos casos.

Os isolados de leveduras obtidos foram identificados como *Candida albicans* (50%), *Candida parapsilosis* (30%) e *Candida tropicalis* (10%). Outras espécies como *Candida krusei* (5%) e *Candida guilliermondii* (5%), consideradas patógenos emergentes, também foram isoladas.

Do total de 20 isolados de *Candida* testados, 100% foram produtores de protease, variando os valores de ZA entre as espécies testadas e o local da infecção, destacando-se cinco isolados de *Candida parapsilosis* e um de *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* que exibiram alta atividade desta enzima (Tabela 1).

Os valores de ZA destes isolados demonstraram relação direta com o grau de agressividade das leveduras. Cinco dos seis isolados de *Candida parapsilosis* apresentaram alta atividade proteásica, dos quais três foram obtidos do trato respiratório (secreção traqueal e lavado brônquico) e dois de tecido ósseo e pele. De forma semelhante, *Candida albicans* obtida de urina de paciente com diabetes mellitus e *Candida guilliermondii*, obtida através de biópsia da pele de paciente com câncer fazendo uso de quimioterápicos, também apresentaram valores elevados de protease.

DISCUSSÃO

As leveduras do gênero *Candida* equivalem a 8-10% da causa das infecções oportunistas e permanecem como importantes patógenos nosocomiais^{5 16}. Alta incidência de infecções oportunistas por leveduras tem sido evidenciada sob manifestações clínicas e fatores de risco relacionados à neutropenia como diabetes mellitus, tuberculose pulmonar, LES, AIDS, uso de drogas imunossupressoras, mucosite induzida por quimioterapia ou altas doses de irradiação^{2 17 27}.

Vários aspectos da imunidade são alterados em pacientes com diabetes e tuberculose. Nestas doenças, a função de leucócitos polimorfonucleares é deprimida, ocorrendo nos casos de diabetes quando a acidose está presente. A aderência leucocitária, a quimiotaxia e a fagocitose podem ser afetadas conduzindo a infecções oportunistas por leveduras^{7 20}.

Estudos prévios desenvolvidos com pacientes imunocomprometidos de ambos os sexos e com infecções fúngicas do trato respiratório revelaram predominância no sexo feminino^{12 16}, corroborando com os casos avaliados nesta pesquisa.

Estruturas dos agentes etiológicos evidenciadas ao exame direto, como pseudomicélio e micélio verdadeiro, reforçam a condição de infecção dos pacientes, afastando a possibilidade de colonização. Gow¹¹ e Lacaz¹⁹ consideram que estas diferenciações facilitam a adesão, invasão e disseminação no tecido hospedeiro.

Em concordância com os resultados de Hamza e cols¹³ *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada a partir de infecções do trato respiratório, seguida por *Candida glabrata* e *Candida krusei*, demonstrando que a emergência de espécies não-*albicans* tem produzido efeito relevante nas condutas clínicas⁹. Estudo comparativo de infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos verificou que a taxa de mortalidade associada com *Candida krusei* foi de 49%, se comparada à taxa de apenas 28% por *Candida albicans*⁸.

Dentre os atributos associados à virulência do gênero *Candida*, destaca-se a elaboração de enzimas proteolíticas e estudos experimentais têm sugerido que elevada produção de proteases é um importante aspecto de *Candida* para interação com tecido hospedeiro e virulência^{4 10 22}.

Nutrientes contidos no BSA resultam em níveis elevados de protease, demonstrando o potencial de invasão dos agentes etiológicos²². Zaugg e cols³¹ avaliaram atividade desta enzima por espécies não-*albicans*, não sendo observadas variações. Diferenças ou ausência na expressão desta enzima por leveduras isoladas de pacientes HIV-positivos podem ser explicadas pelo uso extensivo de inibidores de proteases³².

Pesquisa recente desenvolvida por Nawrot e cols²³ com pacientes imunocomprometidos demonstrou que leveduras isoladas de sangue produziram significativamente menos protease que as obtidas de infecções do trato respiratório, corroborando com nossos resultados. Todavia, Oksuz e cols²⁶ verificaram que apenas *Candida albicans* isolada do trato urogenital e pele de imunocompetentes apresentam alta expressão proteásica.

De acordo com Silva e cols³⁰, esta metodologia pode ser utilizada na caracterização fenotípica de leveduras e, portanto, servir como um marcador epidemiológico de infecções por *Candida*, especialmente em ambiente hospitalar que predispõe os imunocomprometidos a leveduras graves e de repetição devido aos procedimentos invasivos a que estes pacientes estão expostos¹⁸.

O isolamento de espécies de *Candida* de amostras clínicas de pacientes com reduzida resistência imunológica deve ser considerado um achado significativo, tendo correspondido na maioria dos casos a infecções secundárias²⁷.

REFERÊNCIAS

1. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Ninomiya K, Vidotto V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia 128: 143-150, 1994.
2. Barnes PD, Marr KA. Risk, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. British Journal of Haematology 139: 519-531, 2007.
3. Barnett JA, Paine RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.
4. Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. Japanese Journal of Infectious Diseases 59: 73-76, 2006.
5. Cardona-Castro N, Revankar SG, Ortiz P, Cuervo C, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Patterson TF. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from Colombian women with vulvovaginal candidiasis. Revista Iberoamericana de Micologia 19: 89-94, 2002.

6. Carvalho AMR, Melo LRB, Moraes VL, Neves RP. Invasive *Trichosporon* cutaneum infection in an infant with wilms. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 1-2, 2008.
7. Chadeganipour M, Shadzi S, Dehghan P, Bijary J. The incidence of opportunistic fungi in patients suspected of tuberculosis. *Mycoses* 43: 269-272, 2000.
8. Colombo AL, Guimaraes T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 599-607, 2003.
9. Costa KRC, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia* 167: 73-79, 2009.
10. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Medical Mycology* 39: 303-313, 2001.
11. Gow NA. *Candida albicans* switches mates. *Molecular Cell* 10: 217-218, 2002.
12. Gyanchandani A, Khan ZK, Prasad R. Fungal infections in immunocompromised patients with pulmonary tuberculosis as a secondary disease. *Journal de Mycologie Medicale* 8: 147-152, 1998.
13. Hamza OJM, Matee MIN, Moshi MJ, Simon ENM, Mugusi F, Mikx FHM, Helderman WHP, Rijs AJMM, Ven AJAM, Verweij PE. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC Microbiology* 8: 135-144, 2008.
14. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, The Netherlands, 2000.
15. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. *Mycoses* 45: 160-165, 2002.
16. Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. *Journal de Mycologie Médicale* 18: 83-88, 2008.
17. Koh AY, Kohler JR, Coogshall KT, Rooijen NV, Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *Plos pathogens* 4: e35, 2008.
18. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 161: 213-218, 2006.
19. Lacaz CS, Porto E. Tratado de Micologia Médica. Editora Sarvier, São Paulo, 2002.
20. Levidiotou-Stefanou S. Fungal infections in patients with diabetes mellitus and renal diseases. *Acta Microbiologica Hellenica* 53: 83-88, 2008.
21. Macêdo DPC, Silva VKA, Farias AMA, Melo LRB, Wilhelm AB, Neves RP. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 1-7, 2008.
22. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host-pathogen interactions. *Cell Microbiology* 6: 915-926, 2004.
23. Nawrot U, SkaBa J, WBodarczyk K, Fonteyne PA, Nolard N, Nowicka J. Proteolytic activity of clinical *Candida albicans* isolates in relation to genotype and strain source. *Polish Journal of Microbiology* 57: 27-33, 2008.
24. Neves RP, Cavalcanti MAQ, Chaves GM, Magalhães OMC. Yeasts isolated from clinical samples of AIDS patients. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 363-364, 2002.
25. Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clinical Infectious Diseases* 41: 521-526, 2005.
26. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, Koc AN. Phospholipase and Proteinase Activities in Different *Candida* Species Isolated from Anatomically Distinct Sites of Healthy Adults. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 60:280-283, 2007.
27. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 20: 485-506, 2006.
28. Price ME, Walkison ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14, 1982.
29. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection* 14: 5-24, 2008.
30. Silva JO, Ferreira JC, Candido RC. Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 354-355, 2007.
31. Zaugg C, Zepelin MB, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infection and Immunity* 69: 405-412, 2001.
32. Zepelin MB, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *Journal of Investigative Dermatology* 113: 747-751, 1999.