



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA

CANDIDA NÃO-ALBICANS:
AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL NO
ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE CANDIDÚRIA

MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA

CANDIDA NÃO-ALBICANS:
AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL NO
ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE CANDIDÚRIA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Microbiologia, como requisito final à obtenção
do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Cristina Furlaneto

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48c Oliveira, Marcelo Tempesta de.
Candida não-albicans : avaliação de fatores de virulência e perfil no estudo epidemiológico de candidúria / Marcelo Tempesta de Oliveira. – Londrina, 2011.
91 f. : il.

Orientador: Marcia Cristina Furlaneto. .
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* – Teses. 2. *Candida não-albicans* – Teses. 3. *Candida albicans* – Virulência – Teses. 4. *Candida* – Epidemiologia – Teses. 5. Microorganismos patogênicos – Teses. 6. Microbiologia médica – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 616.934

MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA

CANDIDA NÃO-ALBICANS:
AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL NO ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO DE CANDIDÚRIA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Microbiologia, como requisito final à obtenção
do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Marcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
UEM – Maringá - PR

Profª. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
UTFPR – Londrina - PR

Londrina, 28 de março de 2011.

Dedico:

À Minha mãe Sueli, meu maior orgulho, meu maior amor...

Por me ver com os olhos de Deus...

Por me amar com o amor de Deus...

Por me abençoar, com a bênção de Deus...

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”

(John Dewey)

“A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu e pensar o que ninguém pensou.”

(A. Szent-Gyorgyi)

“... A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita... A nossa recompensa está no esforço, não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa...”

(Mahatma Gandhi)

“Temos que aprender a nos desvincular do concreto e convencional, e começarmos uma relação mais íntima com o abstrato, sem timidez ou medo do desconhecido, pois as grandes descobertas futuras serão oriundas da atitude profunda do realmente sentir.”

(Marcelo Tempesta)

“... seja feita a Vossa vontade...”

AGRADECIMENTOS

No período de desenvolvimento deste projeto, muitos fatores me levaram a concluir que o laboratório, muito mais que um ambiente de trabalho, foi um lar. Nele, além de descobrir o ilimitado mundo do conhecimento, percebi mais uma vez o quanto sou iluminado pela convivência com pessoas maravilhosas, que além de contribuírem profissionalmente, me agradeceram com as suas amizades. Portanto, é com enorme carinho que expresso meus agradecimentos a todos que compartilharam um pedaço de suas vidas comigo.

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, orientadora deste trabalho, pela confiança, paciência, dedicação e respeito para comigo, no decorrer desta orientação, ao transmitir seus conhecimentos e experiência com sabedoria, ética e profissionalismo.

... À Márcia Cristina Furlaneto, minha segunda mãe nesta aventura longe de casa, que me educou e aconselhou no caminho, que me criticou, cobrou e brigou quando necessário, fazendo o que toda boa mãe faz! Obrigado por ajudar a me tornar quem sou...

À professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, minha primeira e eterna orientadora, sem a qual eu não teria decidido traçar o extraordinário caminho da investigação científica. Por todos os ensinamentos profissionais e pelas lições de vida. Por sempre alimentar a chama da busca por mais conhecimento, instigando a curiosidade e raciocínio, discutindo e desafiando, me fazendo sempre evoluir. Obrigado pela luz de sua pessoa.

À professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, por ser este exemplo maravilhoso de profissional, por ser este exemplo maravilhoso de pessoa. Obrigado por também compartilhar sua luz comigo, me fazendo aprender, em todos os aspectos da vida, em cada momento desfrutado juntos. Sou seu fã!

Agradeço a todos os amigos de laboratório, em especial, Emanuele Júlio Galvão de França (Manú) e Daniel Favero, pela convivência de irmãos.

Aos meus eternos amigos e familiares, pela compreensão dos momentos de ausência, pela segurança e felicidade que a existência de vocês me traz...

À minha namorada Larissa, por estar ao meu lado nos melhores e nos piores momentos. Por fazer dos meus dias mais dia, por fazer das minhas noites mais noite, por fazer da minha vida mais vida...

OLIVEIRA, Marcelo Tempesta de. *Candida não-albicans*: avaliação de fatores de virulência e perfil no estudo epidemiológico de candidúria. 2011. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais patógenos causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil epidemiológico da candidúria no HU de Londrina/PR entre os anos de 2006 e 2007, classificar a extensão da candidúria em diferentes níveis e identificar fatores de risco específicos para o isolamento de espécies de *Candida não-albicans*. Foram incluídos no estudo isolados clínicos de *Candida* spp obtidos de indivíduos urocultura positivos cuja detecção foi $\geq 10^2$ UFC mL⁻¹. Também foi realizada a análise comparativa ultraestrutural da interação de diferentes morfotipos de *C. parapsilosis* com a superfície de unha e cabelo humanos pelo emprego da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a avaliação da expressão dos genes *SAPs* de 15 isolados clínicos de *C. tropicalis* em resposta aos substratos BSA e hemoglobina pela técnica de PCR em tempo real. Um total de 157 isolados de *Candida* foi obtido, incluindo *C. albicans* (n=72), *C. tropicalis* (n=54), *C. glabrata* (n=20), *C. parapsilosis* (n=8), *C. krusei* (n=2) e *C. dubliniensis* (n=1). A extensão da candidúria foi classificada em tres diferentes níveis: nível 1 (candidúria leve), nível 2 (candidúria de risco) e nível 3 (candidúria pesada). Houve diferença significativa entre a frequência de isolamento de *C. albicans* e espécies não-*albicans* em relação aos diferentes níveis de candidúria estabelecidos neste estudo, evidenciando a candidúria nível 3 (candidúria pesada) como um fator de risco independente para o isolamento de espécies não-*albicans*. A MEV revelou que as células do fenótipo “smooth” de *C. parapsilosis* aderem em maior número em ambas as superfícies em relação aos observados para o fenótipo “crepe”. Diferentes perfis na qualidade e quantidade de produção de matriz extracelular entre os dois morfotipos de *C. parapsilosis* também foram observados. A avaliação da expressão dos genes *SAPs* de *C. tropicalis* mostrou que as condições de cultivo testadas proporcionaram a indução significativa dos genes *SAPT1*, *SAPT2* e *SAPT3* em relação à situação controle (ausência de substrato), cujo perfil de expressão variou qualitativa e quantitativamente de acordo com o substrato utilizado e os diferentes isolados. Pode-se concluir que a contagem de UFC mL⁻¹ de urina e subsequente classificação da extensão da candidúria em diferentes níveis pode ser utilizada como marcador de isolamento de espécies de *Candida não-albicans*. Conclui-se também que diferentes substratos influenciam a expressão diferencial de genes relacionados à morfologia, adesão e produção de matriz extracelular de *C. parapsilosis*, assim como genes de virulência (*SAPs*) de *C. tropicalis*, respostas estas que também se mostraram linhagem-dependente, não relacionadas ao sítio de isolamento.

Palavras-chave *Candida não-albicans*. Epidemiologia. Candidúria. *Phenotypic switching*. *SAP*. PCR em tempo real.

OLIVEIRA, Marcelo Tempesta de. *Candida non-albicans*: evaluation of virulence factors and epidemiological profile of candidúria. 2011. 91 f. Thesis (Doctorate in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Candida species are the major pathogens causing nosocomial infections worldwide. Thus, this study aimed to establish the epidemiological profile of candidúria at UH of Londrina/PR between the years 2006 and 2007, to classify the extent of candiduria at different levels and to identify specific risk factors for the isolation of *Candida non-albicans* species. The study included clinical isolates of *Candida* obtained from patients positive urine cultures whose detection was $\geq 10^2$ CFU mL⁻¹. We also performed comparative ultrastructural analysis of the interaction of two different morphotypes of *C. parapsilosis* with the surface of human hair and nail by the use of scanning electron microscopy (SEM) and the evaluation of *SAPs* gene expression of 15 clinical isolates of *C. tropicalis* in response to BSA and hemoglobin substrates by real time PCR. A total of 157 *Candida* isolates were obtained, including *C. albicans* (n = 72), *C. tropicalis* (n = 54), *C. glabrata* (n = 20), *C. parapsilosis* (n = 8), *C. krusei* (n = 2) and *C. dubliniensis* (n = 1). The extent of candiduria was classified into three different levels: Level 1 (light candiduria), level 2 (risk candiduria) and Level 3 (heavy candiduria). There was a significant difference between the frequency of isolation of *C. albicans* and non-*albicans* species in relation to different levels of candiduria established in this study, showing candiduria level 3 (heavy candidúria) as an independent risk factor for the isolation of non-*albicans* species. The electron micrographs revealed that cells of the "smooth" phenotype of *C. parapsilosis* adhered in greater numbers in both areas compared to those observed for the phenotype "crepe." Different profiles in quality and quantity of extracellular matrix production between the two morphotypes of *C. parapsilosis* was also observed. The assessment of the *SAPs* genes expression in *C. tropicalis* showed that growing conditions tested resulted in significant induction of genes *SAPT1*, *SAPT2* and *SAPT3* in relation to the control situation (absence of substrate), whose expression profiles varied qualitatively and quantitatively according to the substrate and the different isolates. It can be concluded that the number of CFU mL⁻¹ of urine and subsequent classification of the extent of candiduria at different levels can be used as an isolation marker of *Candida non-albicans* species. We also conclude that different substrates influence the differential expression of genes related to morphology, adhesion and extracellular matrix production of *C. parapsilosis*, as well as virulence genes (*SAPs*) of *C. tropicalis*, and that these responses were also strain dependent, not related to the anatomic site of isolation.

Keywords: *Candida non-albicans*. Epidemiology. Candiduria. Phenotypic switching. *SAP*. Real time PCR.

LISTA DE TABELAS

Parte I

- Tabela 1** – Distribuição das espécies de *Candida* relacionadas a episódios de candidúria no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007..... 47
- Tabela 2** – Características clínicas dos pacientes candidúria positivos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007 51
- Tabela 3** – Avaliação do nível de candidúria e fatores de risco associados ao isolamento de espécies não-*albicans* em pacientes candidúria positivos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007..... 54
- Tabela 4** – Distribuição das espécies de *Candida* em relação a diferentes faixas de UFC mL⁻¹ de urina em 25 pacientes candidúria positivos atendidos a nível ambulatorial no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007..... 54

Parte III

- Tabela 1** – Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores correspondentes aos genes *SAP* (*SAPT1-4*) e ao gene da β -Actina (*tACT*) de *Candida tropicalis* utilizados nas análises de RT-PCR em tempo real..... 80
- Tabela 2** – Padrão da expressão diferencial *in vitro* dos genes *SAPT1-4* (proteases aspárticas secretadas) por isolados clínicos de *Candida tropicalis*, obtidos de sítios anatômicos distintos, após cultivo em presença de soro albumina bovino e hemoglobina como fonte de nitrogênio 82

LISTA DE FIGURAS

Parte II

- Figure 1** – Micrographs showing the crepe and smooth phenotypes of *Candida parapsilosis* cultured on Sabouraud dextrose agar at 30°C for 24 h. (A) Crepe colonies. (B) Smooth colonies. Light micrograph (x100) of *C. parapsilosis* cells from the crepe phenotype (C) and smooth phenotype (D) after staining with 2% crystal violet solution 67
- Figure 2** – Electron micrographs showing the *in vitro* adherence to human hair surface. (A, B) Adherence pattern of the “smooth” phenotype of *C. parapsilosis* showing grouped cells of uniform morphology (blastoconidia). (B) Insert shows detail of clustered cells embedded in a flocculent extracellular material at higher magnification (3000x). (C, D) Adherence pattern of the “crepe” phenotype of *C. parapsilosis* showing elongated cells and pseudohyphae. (D) The extracellular material is seen in a less extension in the “crepe” phenotype isolate (white arrow) 68
- Figure 3** – *In vitro* adherence to human nail surface. (A) Adherence pattern of the “smooth” phenotype of *C. parapsilosis* showing clustered cells of yeast-shaped morphology. (B) Show fibrillar extracellular material connecting neighbouring cells as well as nail surface. (C, D) Adherence pattern of the “crepe” phenotype of *C. parapsilosis* showing elongated cells and pseudohyphae. Fibrillar extracellular material is also seen (D)..... 69

Parte III

- Figura 1** – Curva de fusão (*melting curve*) dos amplicons referentes aos genes *SAP* (*SAPT* 1-4) e ao gene da β -Actina (*tACT*) de *Candida tropicalis* empregados neste estudo. A ocorrência de um único pico de fusão para cada gene indica amplificação específica e ausência de dímeros de oligonucleotídeos 80
- Figura 2** – Expressão diferencial dos genes *SAPTs* (proteases aspárticas secretadas) por isolados clínicos de *Candida tropicalis* após 24 horas de cultivo em presença de soro albumina bovino (BSA) como fonte de nitrogênio.

*Expressão diferencial de *SAPT3* significativamente superior ($p < 0,05$) do isolado 182.06 em relação ao isolado 138.06. As unidades de medidas do eixo vertical representam a proporção (X) de cada expressão diferencial 83

Figura 3 – Expressão diferencial dos genes *SAPTs* (proteases aspárticas secretadas) por isolados clínicos de *C. tropicalis* após 24 horas de cultivo em presença de hemoglobina como fonte de nitrogênio. *Expressão diferencial de *SAPT2* significativamente superior ($p < 0,001$) do isolado 136.06 em relação aos demais isolados. As unidades de medidas do eixo vertical representam a proporção (X) de cada expressão diferencial 83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	<i>CANDIDA</i> SPP – DE COMENSAL A PATÓGENO	16
3.2	EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> – EMERGÊNCIA DE ESPÉCIES NÃO- <i>ALBICANS</i>	17
3.3	FATORES DE VIRULÊNCIA EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i>	24
3.4	<i>PHENOTYPIC SWITCHING</i> E BIOFILME	24
3.5	PROTEASES ASPÁRTICAS SECRETADAS (SAPS).....	26
	REFERÊNCIAS	29
	PARTE I – CANDIDÚRIA PESADA COMO UM FATOR DE RISCO PARA O ISOLAMENTO DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> NÃO- <i>ALBICANS</i>: UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE DOIS ANOS E A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE UFC ML⁻¹ DE URINA	41
	PARTE II – INTERACTION OF <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> ISOLATES WITH HUMAN HAIR AND NAIL SURFACES REVEALED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS	62
	PARTE III – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES)	74
	CONCLUSÕES	91

1 INTRODUÇÃO

Candida spp está entre os principais patógenos causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo, e sua incidência continua crescendo significativamente. A epidemiologia de espécies do gênero *Candida* é uma questão multifatorial que ainda precisa ser bem esclarecida. A inversão do perfil tradicional, de prevalência de *C. albicans* sobre as demais espécies, tem sido cada vez mais observada, e relatos da igualdade e até superação na frequência de isolamento de espécies não-*albicans* sobre *C. albicans* atualmente são comuns.

A importância desta inversão está no fato das espécies de *Candida* não-*albicans* estarem relacionadas aos maiores índices de tolerância às dosagens de antifúngicos rotineiramente utilizadas na prática clínica, assim como ao alto índice de resistência intrínseca. Também é relatado um pior prognóstico clínico em pacientes acometidos por infecções causadas por espécies não-*albicans* quando comparado a pacientes com infecção por *C. albicans*, apesar das altas taxas de mortalidade serem atribuídas ao gênero *Candida* como um todo.

Devido à distribuição das espécies do gênero *Candida* estar relacionada a variáveis clínicas decorrentes de peculiaridades de cada região demográfica e respectivas populações de estudo, particularmente quando se refere a espécies de *Candida* não-*albicans*, estudos para a caracterização do perfil epidemiológico deste gênero, discriminando cada espécie, devem ser estimulados.

Desta forma, problemas referentes a cada local podem ser identificados e ações específicas e mais eficazes de profilaxia, controle e combate a estas infecções possam ser providenciadas.

Outro aspecto variável entre as espécies do gênero *Candida* são os fatores de virulência. Sabe-se que as espécies deste gênero diferem tanto pela presença quanto pela ausência de genes relacionados à virulência, em termos de quantidade e qualidade, assim como na regulação da expressão dos mesmos. Estes fatores envolvem variações morfofisiológicas promovidas pela célula fúngica e produção de enzimas de ação intracelular, na superfície extracelular e secretadas.

As espécies de *Candida* modulam diferencialmente sua maquinaria genética considerando o potencial de virulência presente em cada célula/linhagem de acordo com a necessidade do fungo. Desta forma, estes microrganismos podem causar diversos tipos de infecções em humanos e também se adaptar rapidamente ao microambiente em que se encontram, possibilitando a sobrevivência nos mais variados habitats.

Por isso, além da importância epidemiológica da discriminação das espécies de *Candida*, estudos de caracterização para a descoberta e elucidação de eventos biológicos referentes a fatores de virulência peculiares a cada espécie de *Candida* são necessários, especialmente para espécies não-*albicans*, visto que a grande maioria dos estudos utiliza *C. albicans* como modelo.

2 OBJETIVOS

- Determinar o perfil epidemiológico da candidúria e identificar fatores de risco para o isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*;
- Classificar a extensão da candidúria em diferentes níveis e avaliar a relação do número de UFC mL⁻¹ de urina com a distribuição das espécies de *Candida* e fatores de risco;
- Realizar a análise ultraestrutural da interação de diferentes morfotipos (*smooth* e *crepe*) de *C. parapsilosis* com a superfície de unha e cabelo humanos pelo emprego da microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a expressão de genes *SAPs* de 15 isolados clínicos de *C. tropicalis* em resposta aos substratos BSA e hemoglobina pela técnica de PCR em tempo real.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *CANDIDA* SPP – DE COMENSAL A PATÓGENO

Espécies de leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas como comensais na cavidade bucal, nos tratos gastro-intestinal e vaginal de indivíduos saudáveis, estando desta forma em equilíbrio com a microbiota normal e o sistema imune do hospedeiro. Entretanto, determinados fatores predisponentes podem favorecer a mudança do estado comensal destes fungos para um estado de patogenia, tornando-os capazes de causar infecções superficiais, de mucosas e sistêmicas (BARNS et al., 1991; ABI-SAID et al., 1997, HAYNES, 2001; AKPAN e MORGAN, 2002; SEAGAL et al., 2005; PFALLER e DIEKEMA, 2007; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HUBE, 2009; HA et al., 2010).

O número de indivíduos predispostos a sofrer infecções por microrganismos oportunistas, como é o caso de espécies do gênero *Candida*, tem aumentado significativamente nas últimas décadas devido a doenças que causam direta ou indiretamente imunossupressão, ao aumento de procedimentos médicos invasivos, ou ainda por outros fatores predisponentes que desencadeiem desequilíbrios fisiológicos favoráveis à proliferação deste fungo (BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGUE et al., 1993; HAJJEH et al., 2004; KOJIC e DAROUICHE, 2004; PFALLER et al., 2005, 2006a; ALMIRANTE et al., 2005, 2006; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; SALOMAO et al., 2008; HUBE, 2009; HA et al., 2010).

Os fatores que geram um estado de predisposição a infecções oportunistas por este gênero compreendem tanto aqueles considerados amenos, que causam desequilíbrios fisiológicos leves, quanto os que debilitam mais severamente o organismo do hospedeiro. Dentre estes se destacam doenças como AIDS, o imunocomprometimento de pacientes provocado pela quimioterapia no combate ao câncer, terapias imunossupressoras devido a transplantes de órgãos, o uso de antibióticos de amplo espectro, extremos de idade, diabetes mellitus, nutrição parenteral, entre muitos outros casos. A má higiene e alimentação (dieta rica em açúcares e carboidratos), consumo excessivo de bebidas alcoólicas, deficiência de ferro e vitaminas, o uso de contraceptivos orais, fumo e estresse também são considerados importantes fatores predisponentes (SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2001; AKPAN e MORGAN, 2002; DE LEON et al., 2002; DIEKEMA et al., 2002; NAGLIK et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; KOJIC et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005, 2006; CHENG et

al., 2005; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HUBE, 2009; HA et al., 2010).

Deve-se considerar também o avanço da medicina, que proporcionou o aumento da expectativa do tempo de vida, aumentando desta forma o número de indivíduos idosos na população, que são mais suscetíveis a este tipo de infecções. Este avanço contribuiu também para o aumento do tempo de sobrevivência de pacientes com doenças graves e potencialmente fatais em ambientes hospitalares, aumentando o número de indivíduos vulneráveis a infecções oportunistas (BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HA et al., 2010).

Conseqüentemente, as espécies de *Candida* estão entre os principais agentes causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo e sua ocorrência vem aumentando significativamente, muitas vezes em proporções superiores à dos demais patógenos. (PFALLER et al., 2005, 2006a, 2007, 2008; ALMIRANTE et al., 2005, 2006; SENDID et al., 2006; TORTORANO et al., 2006; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA* – EMERGÊNCIA DE ESPÉCIES NÃO-*ALBICANS*.

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae (*National Center for Biotechnology Information* - www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy). São fungos ubíquos na natureza e podem ser encontrados em solos, em plantas, em ambientes aquáticos e em animais. Existem mais de 200 espécies de *Candida*, das quais cerca de 20 já foram relatadas como agentes etiológicos de um amplo espectro de infecções em humanos (NGUYEN et al., 2007; WANG et al., 2008; PFALLER et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Destas, 05 espécies são responsáveis por mais de 95% dos casos de infecções provocadas pelo gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo as demais espécies, no momento, consideradas como espécies de *Candida* incomuns, das quais se destacam *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (TORTORANO et al., 2006; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007,

2008; PFALLER et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

O perfil epidemiológico de espécies do gênero *Candida* até a década de 90 era de prevalência de *C. albicans*, com índices superiores a 80% do total, sendo as demais espécies não identificadas e apenas designadas como *Candida* não-*albicans* (WEY et al., 1988; BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGUE et al., 1993; FRIDKIN e JARVIS, 1996). Porém, o desenvolvimento de novas metodologias de identificação e diagnóstico microbiológico possibilitando a discriminação das espécies de forma acurada, assim como a emergência de infecções causadas pelas demais espécies do gênero *Candida*, tem revelado nas últimas décadas uma mudança deste perfil (BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010).

Estudos recentes confirmam *C. albicans* como a espécie mais encontrada entre os isolados clínicos do gênero, mas também indicam um aumento significativo na incidência de outras espécies, tanto que, atualmente, é comum observar a igualdade dos índices de isolamento e até a superação das espécies não-*albicans* quando comparada à *C. albicans* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; TORTORANO et al., 2006; SANDVEN et al., 2006; SENDID et al., 2006; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; PFALLER et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; CHEN et al., 2009; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010; MALACARNE et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

A epidemiologia de espécies do gênero *Candida* é uma questão multifatorial que ainda não está completamente elucidada. Sabe-se que a distribuição das espécies de *Candida* varia de acordo com as características da região demográfica e do grupo de indivíduos estudado, tanto coletivamente quanto individual. Características particulares referentes a cada espécie e linhagem em questão também estão intimamente relacionadas a variações de perfis epidemiológicos deste gênero.

Por exemplo, infecções causadas por *C. parapsilosis* estão associadas a cateteres vasculares e à nutrição parenteral, já infecções por *C. tropicalis* estão associadas com câncer e neutropenia, enquanto a prévia exposição a antifúngicos da classe dos azoles está relacionada a casos de *C. krusei* e *C. glabrata*. A faixa etária dos pacientes também é um dos fatores que influenciam a distribuição das espécies deste gênero, onde se observa altas taxas de isolamento de *C. parapsilosis* em neonatos e principalmente de *C. glabrata* e *C. tropicalis* em pacientes adultos e de idades mais avançadas (BASSETTI et al., 2006, 2007; NUCCI e COLOMBO, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; PFALLER et al., 2007,

2008, 2009; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; FALAGAS et al., 2010; HA et al., 2010;; TROFA et al., 2008; KOTHAVADE et al., 2010).

Estudos mostram um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata*, principalmente nos EUA e países como França, Suíça, Noruega, Dinamarca, Islândia e Reino Unido (Inglaterra) (ÁSMUNDSÓTTIR et al., 2002; DIEKEMA et al., 2002; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; MARCHETTI et al., 2004; ARENDRUP et al., 2005; PFALLER et al., 2007, 2008, 2009; SANDVEN et al., 2006; SENDID et al., 2006; HACHEM et al., 2008). No Canadá, América Latina, regiões da Ásia e Pacífico, Espanha, Portugal e Itália, as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* têm sido as mais frequentemente isoladas após *C. albicans* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; PFALLER et al., 2005; BASSETTI et al., 2006; COLOMBO et al., 2006; CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; MESSER et al., 2006; PFALLER et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; PLAYFORD et al., 2010).

Particularmente no Brasil, são de grande importância as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, cujas frequências de isolamento no geral são bem próximas, apesar de relatos de variações entre os estudos realizados em diferentes regiões do país. Ambas as espécies disputam a colocação de 2ª espécie mais comumente isolada, sendo que em alguns casos, mesmo individualmente, se equiparam e até ultrapassam a frequência de isolamento de *C. albicans* (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008; ROTA, 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

C. parapsilosis é reconhecida pela grande capacidade de formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos intravasculares e por sua persistência no ambiente hospitalar. Além disso, esta espécie é comumente encontrada colonizando a pele de indivíduos saudáveis, o que facilita sua propagação nosocomial por meio das mãos de profissionais da área da saúde. Estas características fazem com que *C. parapsilosis* seja cada vez mais relacionada a surtos hospitalares, originando infecções principalmente em neonatos prematuros (ALMIRANTE, et al., 2006; BONASSOLI et al., 2005; SEAGAL et al., 2005; PFALLER et al., 2008; TROFA et al., 2008).

Nos Estados Unidos foi observado que *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais comumente encontrada na corrente sanguínea de neonatos, sendo predominante em algumas UTIs neonatais. O fato poderia ser explicado pela presença do patógeno nas mãos dos profissionais de saúde (TROFA et al., 2008). Almirante *et al.* (2005 e 2006), em estudos realizados na Espanha, também encontraram *C. parapsilosis* como a espécie mais

frequentemente isolada de neonatos, além de estar associada com a presença de cateter venoso central.

Pfaller *et al.* (2005, 2006a, 2006b, 2008, 2009) concluíram por vários estudos aliados ao programa SENTRY de vigilância internacional de candidemia, que *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais frequentemente isoladas na América Latina, Canadá e Europa. Salientaram, ainda, que esta alta frequência de isolamento provavelmente seja pelo manuseio inadequado de utilitários médicos e falhas nas medidas de controle de infecção hospitalar.

No Brasil, Pasqualotto *et al.* (2005) identificaram *C. parapsilosis* como a principal causa de candidemia em pacientes pediátricos, com 38,5% dos casos. Em outro estudo, realizado no nordeste do Brasil, foi evidenciada a importância desta espécie em episódios de candidemia, uma vez que foi o principal patógeno isolado durante dois anos de pesquisa, e apresentou a segunda maior taxa de mortalidade (MEDRANO *et al.*, 2006).

Diferentemente de *C. parapsilosis*, que é disseminada predominantemente por via exógena, a maioria das infecções causadas por *C. tropicalis* são de origem endógena. Desta forma, esta espécie possui considerável potencial biológico como agente oportunista em pacientes acometidos por câncer, doenças hematológicas e quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos ou danos em mucosas (SEAGAL *et al.*, 2005; NUCCI e COLOMBO, 2007; RICHARDSON e LASS-FLORL, 2008).

Em artigo de revisão realizado por Pfaller e Diekema em 2007, foi citado que *C. tropicalis* é a segunda espécie mais comumente isolada na América Latina, junto com *C. parapsilosis*, praticamente com percentagens de isolamento similares. Dados parecidos também foram encontrados anteriormente por estudo conduzido por Godoy e colaboradores em 2003, e por Nucci e Colombo em 2007.

Em estudo realizado entre os anos de 2001 e 2004 no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, *C. tropicalis* foi identificada como a segunda espécie causadora de candidemia, predominantemente em adultos (FRANÇA *et al.*, 2008). Já a epidemiologia de *C. tropicalis* em neonatos não é clara, mas o seu potencial de transmissão nosocomial não pode ser negligenciado, visto que em estudo realizado por Roilides *et al.* (2003) em UTI neonatal da Grécia foram encontrados 17 neonatos acometidos por esta espécie por motivo de infecção cruzada.

Em estudo epidemiológico conduzido no Hospital Universitário de Londrina/PR pelo nosso grupo de pesquisa, foi observado que 32,5% dos casos de candidemia foram provocados por *C. tropicalis*, enquanto apenas 25% o foram por *C. albicans*. Neste

mesmo estudo, dos isolados obtidos de mucosa, a espécie prevalente foi *C. parapsilosis*, com 52% dos casos, e dos isolados obtidos de sítios superficiais, a espécie prevalente foi *C. parapsilosis* (45%), seguida de *C. tropicalis* (30%). Em relação aos casos de candidúria, este estudo evidenciou que espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 64% dos isolados, destacando-se *C. tropicalis* que foi identificada em 53 de 101 isolados (ROTA, 2009). Em estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2001), os dados mostraram que, de 166 isolados de amostras de urina, 53% corresponderam a *C. tropicalis*, e somente 36% a *C. albicans*.

Cada vez mais, estudos epidemiológicos evidenciam as características clínicas dos pacientes e as condutas médicas da região em questão como os principais motivos de variação na distribuição de espécies de *Candida* em ambientes hospitalares e, por de análises comparativas entre os estudos citados até o momento neste trabalho, é possível propor que a combinação entre estes fatores seja a principal responsável por tais variações.

Pelo fato da distribuição das espécies do gênero *Candida* estar relacionada a variáveis clínicas decorrentes de peculiaridades de cada região demográfica e respectivas populações de estudo, particularmente quando se refere a espécies de *Candida* não-*albicans*, estudos para a caracterização do perfil epidemiológico deste gênero devem ser estimulados e desenvolvidos de uma forma global, para que problemas referentes a cada local possam ser identificados e ações específicas de profilaxia, controle e combate a estas infecções possam ser providenciadas.

Infecções do trato urinário causadas por *Candida* spp, candidiases invasivas, e principalmente candidemia prolongam o tempo de permanência dos pacientes em hospitais e conseqüentemente aumentam os gastos financeiros com o tratamento e a manutenção dos estados de morbidez destes pacientes. Além disso, altas taxas de mortalidade bruta (13% a 90%) e atribuída (24% a 60%) associadas a infecções nosocomiais por espécies de *Candida* são relatadas, o que faz com que espécies deste gênero sejam consideradas microrganismos de grande importância clínica (PAPPAS et al., 2003; OLAECHEA et al, 2004; ALMIRANTE et al., 2005, 2006; MORRELL et al., 2005; TORTORANO et al., 2006; PFALLER et al., 2005, 2006a, 2007, 2008; BOUGNOUX et al., 2008; MEÁN et al.,2008; RICHARDSON e LASS-FLÖRL, 2008; VANDIJCK et al., 2008; HASSAN et al., 2009; MORAN et al., 2009; FALAGAS et al., 2006, 2010; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Grande parte destas infecções nosocomiais é originalmente endógena, geralmente adquirida pela colonização prévia de sítios anatômicos, tais como a cavidade oral, os tratos gastrointestinal e urinário e a pele. Também há fortes indícios da ocorrência de

infecções cruzadas e exógenas decorrentes tanto da má-higienização das mãos de profissionais da área da saúde quanto da inadequada desinfecção e esterilização de utilitários médicos (VINCENT, 2003; KOJIC et al., 2004; TORTORANO et al., 2006; BASSETTI et al., 2006, 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; SALOMAO et al., 2008; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Este fato sugere que a detecção de espécies de *Candida* em pacientes hospitalizados, mesmo que apenas colonizando estes indivíduos, seja um fator de risco para infecções por este gênero. Ou seja, sítios anatômicos como a região orofaríngea e genital, assim como regiões mucosas colonizadas por *Candida* spp. são importantes reservatórios e fontes potenciais destes agentes etiológicos para a ocorrência de candidiases invasivas e candidemia (PITTET et al., 1994; CHARLES et al., 2005; MORRELL et al., 2005; GAREY et al., 2006; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2007; DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; LEÓN et al., 2009; PLAYFORD et al., 2009; SHORR et al., 2009; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HA et al., 2010).

Entretanto, o achado laboratorial de sítios colonizados/infectados por espécies de *Candida* ainda é muitas vezes subestimado em centros hospitalares, sendo tratado apenas como consequência secundária de doenças e situações de base pelas quais o paciente está sendo acometido. Doenças e situações estas que, segundo alguns clínicos, se tratadas ou retiradas implicam na erradicação da colonização, não sendo necessárias maiores atenções ou tratamento para *Candida* spp., mesmo com toda a problemática exposta anteriormente (DIMOPOULOS et al., 2007, 2008; LEÓN et al., 2009; PLAYFORD et al., 2009; SHORR et al., 2009; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HA et al., 2010).

É válido ressaltar que as taxas de mortalidade de pacientes que adquirem infecções por espécies de *Candida* permanecem bem mais elevadas em relação ao que se poderia estimar caso somente a doença de base dos mesmos fosse considerada (GUDLAUGSSON et al., 2003; PFALLER e DIEKEMA, 2007; MEÁN et al., 2008; VANDIJCK et al., 2008; HASSAN et al., 2009; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010).

Neste contexto, encontra-se o achado laboratorial de candidúria. Embora existam controvérsias relativas ao significado clínico de candidúria (colonização ou infecção), a detecção de *Candida* spp em amostras de urina de indivíduos saudáveis, coletadas por técnicas adequadas, e a ocorrência de infecções urinárias adquiridas em comunidade provocadas por este gênero são incomuns. A candidúria geralmente é observada em pacientes hospitalizados, particularmente naqueles em unidades de terapia intensiva, desenvolvendo-se no decorrer da internação, sendo ainda considerada por muitos autores como um fator de risco

para candidíases invasivas e candidemia (LUNDSTROM e SOBEL, 2001; KAUFFMAN, 2005; MAGILL et al., 2006; COLOMBO e GUIMARÃES, 2007; TOYA et al., 2007; BUKHARY, 2008; HOLLENBACH, 2008; VIDIGAL e SVIDZINSKI, 2009).

O atraso no início da terapia antifúngica está associado ao aumento na taxa de mortalidade em pacientes com candidíase invasiva e candidemia. Por isso, estratégias de intervenções antifúngicas profiláticas precoces (preventivas ou empíricas) têm sido cada vez mais recomendadas, antes da detecção de *Candida* spp. Tais estratégias seguem modelos de risco preditivos baseados em fatores clínicos e/ou parâmetros de colonização por espécies de *Candida*, sendo a candidúria um dos itens considerados e calculados para o estabelecimento do risco preditivo (PITTET et al., 1994; CHARLES et al., 2005; MORRELL et al., 2005; GAREY et al., 2006; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2007; LEÓN et al., 2009; PLAYFORD et al., 2009; SHORR et al., 2009).

Entretanto, estes modelos estão em processo de validação, devido a diferenças referentes à aplicabilidade, sensibilidade e especificidade destes entre diferentes regiões demográficas e populações de estudo. Além disso, o emprego destes modelos com vistas ao início precoce de terapia antifúngica tem contribuído apenas com a prevenção de candidíases invasivas e candidemia, não apresentando impacto sobre as taxas de mortalidade. Este fato pode estar associado à escolha inadequada do antifúngico a ser utilizado para a terapia profilática, devido a diferentes perfis de resistência encontrados entre as espécies de *Candida*.

Nas últimas décadas observa-se um aumento progressivo no isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans* em ambientes hospitalares, sendo que a este grupo têm sido atribuídas as maiores taxas de mortalidade, tolerância a altas doses de antifúngicos e resistência intrínseca a estas drogas (DA MATTA et al., 2007; PFALLER e DIEKEMA, 2007; CHOW et al., 2008a, 2008b; MÉAN et al., 2008; HASSAN et al., 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; CONDE-ROSA et al., 2010; HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; TAN et al., 2010). Entretanto, a maioria dos modelos preditivos para infecções invasivas não distingue fatores de risco específicos para espécies de *Candida* não-*albicans*. Além disso, dados epidemiológicos referentes à candidúria ainda são escassos no Brasil, se restringindo a estudos conduzidos em poucas regiões do Centro-Oeste (Goiânia) e Sudeste (São Paulo e Ribeirão Preto) (OLIVEIRA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2004; PASSOS et al., 2005; BINELLI et al., 2006; SILVA et al., 2007).

3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA*.

O estado fisiológico do hospedeiro é o primeiro fator que influencia a etiologia de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, contribuindo para o desencadeamento de um extenso repertório gênico de determinantes de virulência seletivamente expressos de acordo com o tipo, estágio e sítio anatômico da infecção, com a resposta natural do organismo, assim como os fatores de predisposição pelos quais o indivíduo está sendo afetado. Ou seja, de acordo com a necessidade do fungo no curso da infecção (STAIB et al., 2000; HAYNES, 2001; HUBE e NAGLIK, 2001; KANTARCIOGLU e YÜCEL, 2002; NAGLIK et al., 2003; TAVANTI et al., 2004).

Dentre os principais determinantes de virulência atribuídos às espécies do gênero *Candida*, destacam-se a habilidade de produzir e secretar enzimas hidrolíticas (proteases e fosfolipases), a capacidade de variação da morfologia celular (formação de hifas, pseudo-hifas e variações fenotípicas), formação de biofilme e a expressão de fatores de adesão (GHANNOUN, 2000; HAYNES, 2001; HUBE e NAGLIK, 2001; NAGLIK et al., 2003; HUBE, 2004, 2009; SCHALLER et al., 2005; GOKCE et al., 2007; NAGLIK et al., 2008). O fator hemolítico também tem sido reconhecido como um possível atributo de patogenicidade nas espécies de *Candida* (LUO et al., 2001, 2004; FURLANETO-MAIA et al., 2008; FRANÇA et al., 2010a, 2010b).

A grande maioria dos estudos de caracterização destes fatores de virulência foi realizada empregando-se a espécie *C. albicans* como modelo, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, com a emergência de espécies de *Candida* não-*albicans* e conseqüente importância clínica que elas adquiriram, estudos comparativos relacionados a estas espécies começaram a ser explorados. A evidência inicial de que a manifestação destes fatores ocorre de forma diferenciada entre as espécies despertou o interesse da comunidade científica, que atualmente está na corrida para a descoberta e elucidação de eventos biológicos referentes a fatores de virulência peculiares a cada espécie de *Candida*.

3.4 PHENOTYPIC SWITCHING

A mudança fenotípica (*phenotypic switching*) é um evento cuja as colônias de uma mesma linhagem de *Candida* podem assumir formas diferentes (morfotipos distintos), em uma frequência relativamente elevada, de aproximadamente uma colônia modificada para cada 100 a 10000 colônias originais. O evento pode ocorrer tanto independentemente de

estímulos ambientais quanto em resposta a eles (BISWAS et al., 2007; MIRANDA et al., 2007; JAIN et al, 2008; JAIN e FRIES, 2009; KARKOWSKA-KULETA, et al., 2009; MOURA et al., 2010).

Uma das principais causas destas alterações morfológicas é atribuída a alterações na decodificação do código genético de *Candida* spp., particularmente ao evento de redesignação do códon CUG, traduzido como serina ao invés de leucina em algumas espécies do gênero (GOMES et al., 2007; MIRANDA et al., 2007; MOURA et al., 2010).

Espécies do gênero *Candida* também possuem mecanismos sofisticados de detecção e resposta a estímulos ambientais, ativando interruptores de desenvolvimento que resultam em mudanças coordenadas na fisiologia celular, morfologia e aderência (BISWAS et al., 2007; GOMES et al., 2007; MOURA et al., 2010).

A mudança fenotípica é um evento reversível, podendo variar entre diferentes morfotipos na frequência descrita anteriormente, mas a morfologia colonial pode se manter estável e passar por várias gerações após o evento de “switch” inicial (JAIN et al, 2008; JAIN e FRIES, 2009; KARKOWSKA-KULETA, et al., 2009).

Este evento promove mudanças nas propriedades da superfície celular das células componentes do novo variante morfológico e mudanças de suas propriedades bioquímicas e metabólicas, conferindo a este gênero uma grande versatilidade para adaptação e sobrevivência à variações ambientais, o que capacita espécies deste gênero a habitar os mais variados ecossistemas (BISWAS et al., 2007; GOMES et al., 2007; MOURA et al., 2010).

Esta mudança fenotípica está relacionada também a diferentes potenciais de virulência e perfis de suscetibilidade a antifúngicos, podendo capacitar e tornar mais eficaz o estabelecimento e desenvolvimento de uma infecção por determinado morfotipo de uma linhagem de *Candida* (JAIN et al, 2008; JAIN e FRIES, 2009; KARKOWSKA-KULETA, et al., 2009).

Apesar deste evento já ser bem caracterizado em *C. albicans* e demonstrado ocorrer em outras espécies de *Candida*, ainda são escassos estudos de “phenotypic switching” referentes a espécies não-*albicans*. Destaca-se dentro deste contexto, a espécie *C. parapsilosis*, cujo estudo realizado por Laffey e Butler (2005) demonstrou o potencial diferenciado de variantes fenotípicos de *C. parapsilosis* quanto à velocidade de multiplicação celular, diferenciação dos blastoconídeos em hifas e pseudohifas, penetrabilidade em ágar e formação de biofilme em superfície abiótica.

Sabe-se que *C. parapsilosis* é comumente encontrada na pele e mãos de profissionais da área da saúde, que servem de reservatório e fonte de contaminação para infecções por esta espécie. Práticas de higiene inadequadas possibilitam a disseminação de microrganismos pelo ambiente hospitalar, podendo ocasionar surtos de infecções, que são comumente relacionados a esta espécie (ALMIRANTE, et al., 2006; BONASSOLI et al., 2005; SEAGAL et al., 2005; PFALLER et al., 2008; TROFA et al., 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HA et al., 2010).

A habilidade de *C. parapsilosis* quanto à produção de matriz extracelular e formação de biofilmes em superfícies abióticas, além da resistência a drogas antifúngicas, contribui com a persistência deste patógeno no ambiente hospitalar (ALMIRANTE, et al., 2006; BONASSOLI et al., 2005; SEAGAL et al., 2005; PFALLER et al., 2008; TROFA et al., 2008; BOUZA e MUNOZ, 2008; MEAN et al., 2008; HA et al., 2010).

3.5 PROTEASES ASPÁRTICAS SECRETADAS (SAPS)

As enzimas hidrolíticas extracelulares estão entre os principais determinantes de virulência do gênero *Candida*, sendo fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção. Dentre estas, destacam-se as aspartil proteases secretadas (SAPS). Estudos referentes à *C. albicans* constataram a existência de 10 genes *SAP* (*SAP1-SAP10*), que estão associados com outros determinantes de virulência como fatores de adesão, formação de hifas e alteração fenotípica.

Estudos empregando mutantes *SAP*-deficientes demonstram que *SAP1*, *SAP2* e *SAP3* estão relacionados a infecções de mucosas e, *SAP4*, *SAP5* e *SAP6* a infecções sistêmicas. Dependendo da combinação de genes mutados pode-se observar uma diminuição significativa da virulência e dos danos causados aos tecidos, assim como uma resposta imunológica mais eficiente por parte do hospedeiro, tanto em infecções sistêmicas como de mucosas. No entanto, a disrupção de genes *SAP* pode ser compensada pela expressão dos outros genes desta família que permanecem inalterados (HUBE e NAGLIK, 2001; NAGLIK et al., 2003).

Estudos recentes de expressão de genes *SAPs* por *C. albicans* evidenciaram a ocorrência de variação nos perfis de expressão destes genes em resposta a diferentes condições, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NAGLIK et al., 2003, 2008; TAYLOR et al., 2005; BROWN et al., 2007; KUMAMOTO, 2008). Por exemplo, a expressão do gene *SAP7* não foi

encontrada em condições testadas *in vitro*, mas foi observada em isolados clínicos de *C. albicans* retirados diretamente de pacientes infectados.

Há genes, como *SAP5*, cuja expressão diferencial é evidenciada em isolados provenientes de múltiplos sítios de infecção. Em contraste, a indução da expressão de *SAP2* por *C. albicans* foi observada em infecções hepáticas, mas não em infecções do esôfago e vagina. Da mesma forma, *SAP6* tem sua expressão induzida em células fúngicas que invadem modelos reconstituídos de epitélio humano e em células fúngicas provenientes de lesões orais, mas não em células fúngicas provenientes de infecções renais (NAGLIK et al., 2003, 2008; TAYLOR et al., 2005; BROWN et al., 2007; KUMAMOTO, 2008).

A expressão dos genes *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP8* de *C. albicans* está correlacionada a infecção de epitélio oral, enquanto a expressão dos genes *SAP1*, *SAP3* e *SAP6-8* a infecções de epitélio vaginal. Em contrapartida, há estudos relatam apenas a expressão diferencial de *SAP4* e *SAP5* em modelos de infecções vaginais. Isto mostra o grau de variabilidade do perfil de expressão dos genes *SAP* de *C. albicans* (NAGLIK et al., 2003, 2008; TAYLOR et al., 2005; BROWN et al., 2007; KUMAMOTO, 2008).

Determinantes de virulência em *Candida* spp é um campo de estudo complexo devido à diversidade de fatores que atuam nas diferentes espécies. Muito ainda precisa ser elucidado, sendo evidente a necessidade de estudos visando à caracterização destes determinantes nas diferentes espécies do gênero.

Dentro deste contexto, destaca-se *C. tropicalis*, que além de sua tolerância a altas doses e propensão à resistência aos antifúngicos comumente empregados, tem sido encontrada com alta frequência, sendo a segunda espécie mais isolada em várias regiões demográficas, incluindo o Brasil, como descrito anteriormente.

Zaugg e colaboradores (2001) evidenciaram que *C. tropicalis* possui quatro genes que codificam para proteases aspárticas secretadas (SAPs), denominados *SAPT1* a 4. No entanto são poucos os estudos relativos à expressão desses genes, sendo que até o momento apenas a expressão diferencial (indução em relação a situação controle) do gene *SAPT1* foi demonstrada.

Recentemente, metodologias moleculares de diagnóstico e análise quantitativa da expressão de genes representam ferramentas importantes na pesquisa básica, medicina molecular e biotecnologia. Neste contexto, a metodologia de PCR em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa uma importante ferramenta devido à capacidade de gerar resultados quantitativos, permitindo a caracterização e confirmação de

padrões de expressão gênica, além da comparação dos níveis de RNAm em diferentes amostras (BUSTIN, 2002; JUNG et al., 2000).

REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZON, O. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p.1122-1128, 1997.
- AKPAN, A.; MORGAN, R.; Oral candidiasis. **Postgraduate Medicine Journal**, v. 78, p. 455-459, 2002.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 999-1008, 2006.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829-1835, 2005.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A.; AND THE BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (5), p. 1681-1685, 2006.
- ARENDRUP, M.C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; JENSEN, I. M.; KNUDSEN, J. D.; LUNDGREN, B.; SCHØNHEYDER, H. C.; TVEDE, M. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43 (9), p. 4434-4440, 2005.
- ASMUNSDOTTIR, L.R.; ERLENDSDOTTIR, H.; GOTTFREDSSON, M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3489-3492, 2002.
- BACHMANN, S.P.; RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; PATTERSON, T.F.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p.3657-3659, 2003.
- BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, T.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 86S-89S, 1991.
- BARBERINO, M.G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A.P.; NETTO, E.M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 36-40, 2006.

BARNS, S.M.; LANE, D.J.; SOGIN, M.L.; BIBEAU, C.; WEISBURG, W.G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2250-2255, 1991.

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. **BMC Infectious Diseases**, 6 (21), 2006.

BASSETTI, M.; TRECARCHIB, E.M.; RIGHIA, E.; SANGUINETTIC, M.; BISIOA, F.; POSTERAROC, B.; SOROD, O.; CAUDAB, R.; VISCOLIA, C.; TUMBARELLOB, M. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 325-331, 2007.

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal of Infection Disease**, v. 167, p. 1247-1251, 1993.

BINELLI, C. A.; MORETTI, M. L.; ASSIS, R. S.; SAUAIA, N.; MENEZES, P. R.; RIBEIRO, E.; GEIGER, D. C. P.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; OLIVEIRA, M. S.; BARONE, A. A.; LEVIN, A. S. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, p. 538-543, 2006.

BISWAS, S.; Van DIJCK, P., DATTA, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71 (2), p. 348-376, 2007.

BONASSOLI, I.A.; BERTOLI, M.; SVINDZINSKI, T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 159-162, 2005.

BOUGNOUX, M. E.; KAC, G.; AEGERTER, P.; D'ENFERT, C.; FAGON, J. Y. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. **Intensive Care Medicine**, v. 34, p. 292-299, 2008.

BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32 (2), p. 87-91, 2008.

BROWN, A. J. P.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. R. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 307-313, 2007.

BRUDER-NASCIMENTO, A; CAMARGO, C.H.; SUGIZAKI, M.F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, C.A.; MONDELLI, A.L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, doi:10.1186/1756-0500-3-1, 2010.

BUKHARY, Z. A. Candiduria: a review of clinical significance and management. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 19 (3), p. 350-360, 2008.

CHARLES, P. E.; DALLE, F.; AUBE, H.; DOISE, J. M.; QUENOT, J. P.; AHO, L. S.; CHAVANET, P.; BLETTERY, B. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. **Intensive Care Medicine**, v. 31, p. 393-400, 2005.

CHEN, S. C. A.; MARRIOTT, D.; PLAYFORD, E. G.; NGUYEN, Q.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T. C.; SLAVIN, M. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 662-669, 2009.

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

CHOW, J.K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.A.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.A. HADLEY, S. Risk factors for *albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 36, p. 1993-1998, 2008a.

CHOW, J.K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A.W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.; HADLEY, S. Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.1206-1213, 2008b.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: a clinical and therapeutic approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40 (3), p. 332-337, 2007.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. for the Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (8), p. 2816-2823, 2006.

CONDE-ROSA, A.; AMADOR, R.; PEREZ-TORRES, D.; COLÓN, E.; SÁNCHEZ-RIVERA, C.; NIEVES-PLAZA, M; GONZÁLEZ-RAMOS, M.; BERTRÁN-PASARELL, J. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical Center. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 29 (1), p. 26-29, 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50 (3), p. 917-921, 2006.

DA MATTA, D.A.; ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; AZEVEDO, A.C.; KUSANO, E.J.U.; TRAVASSOS, N.F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A.L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: result of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995 – 2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 399-404, 2007.

DE LEON, E.M.; JACOBBER, S.J.; SOBEL, J.D.; FOXMAN, B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 1-5, 2002.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1298-1302, 2002.

DIEKEMA, D. J.; BEEKMANN, S. E.; CHAPIN, K. C.; MOREL, K. A.; MUNSON, E.; DOERN, G. V. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41 (80), p. 3655-3660, 2003.

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

DIMOPOULOS, G.; NTZIORA, F.; RACHIOTIS, G. ARMAGANIDIS, A.; FALAGAS, M. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. **Critical Care and Trauma**, v. 106, p. 523-529, 2008.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.167–193, 2002

FALAGAS, M. E.; APOSTOLOU, K. E.; PAPPAS, V. D. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 25, p. 419-425, 2006.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infection Disease**, 2010, doi:10.1016/j.ijid.2010.04.006.

FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. B. M.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses*, 2010a, doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01825.x.

FRANÇA, E. J. G.; FAVERO, D; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43 (3), p. 318-321, 2010b.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, (1), p. 23-28, 2008.

FRIDKIN, S. K., JARVIS W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9 (4), p. 499-511, 1996.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of

Candida spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 66, p. 209-217, 2008.

GAREY, K. W.; REGE, M.; PAI, M. P.; MINGO, D. E.; SUDA, K. J.; TURPIN, R. S.; BEARDEN, D. T. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clinical Infectious Disease**, v. 43, p. 25-31, 2006.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; da MATTA, D. A.; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 401-405, 2003.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p.265-269, 2007.

GOMES, A. C.; MIRANDA, I.; SILVA, R. M.; MOURA, G. R.; THOMAS, B.; AKOULITCHEV, A.; SANTOS, M. A. S. A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biology*, v. 8 (10), R206, 2007.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; BERG, J. V.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37 (9), p. 1172-1177, 2003.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, 2010. doi:10.1016/j.burns.2010.01.005.

HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. **Cancer**, v.112, p. 2493-99, 2008.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M. E.; AND WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519-1527, 2004.

HASSAN I, POWELL G, SIDHU M, HART WM, DENNING DW. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidemia. **Journal of Infection**, v. 59, p. 360-365, 2009.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, p. 591-596, 2001.

HAZEN, K.C.; BARON, E. J.; COLOMBO, A. L.; GIRMENIA, C.; SANCHEZ-SOUSA, A.; DEL PALACIO, A.; DE BEDOUT, C.; GIBBS, D. L.; AND THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41 (12), p. 5623-5632, 2003.

- HOLLENBACH, E. To treat or not to treat – critically ill patients with candidúria. **Mycoses**, v. 51 (2), p. 12-24, 2008.
- HUBE, B. Fungal adaptation to the host environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 347-349, 2009.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.
- HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 336-341, 2004.
- HINRICHSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T.A.S.; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.
- JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. Phenotypic switching in fungi, **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180-188, 2008.
- JAIN, N.; FRIES, B. C. Antigenic and phenotypic variations in fungi. **Cellular Microbiology**, v. 11 (12), p. 1716-1723, 2009.
- JUNG, R; SOONDRUM, K; NEUMALER, M. Quantitative PCR. **Clinical Chemistry Laboratorial Medicine** v. 38(9), p. 833-836, 2000.
- KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p. 160-165, 2002.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56 (2), p. 211-224, 2009.
- KAUFFMAN, C.A. Candiduria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41 (6), p. 371-376, 2005.
- KOBAYASHI, C. C.; FERNANDES, O. F.; MIRANDA, K. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. Candidúria in hospital patients: a study prospective. **Mycopathologia**, v. 158, p. 49-52, 2004.
- KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873-880, 2010.
- KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255-267, 2004.
- KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v.70, p.878-888, 2002.
- KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v 5, p.608-611, 2002.

KUMAMOTO, C. A. Niche-specific gene expression during *Candida albicans* infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p 325-330, 2008.

LEÓN, C.; RUIZ-SANTANA, S.; SAAVEDRA, P.; GALVÁN, B.; BLANCO, A.; CASTRO, C.; BALASINI, C.; UNTADE-VÁSQUEZ, A.; MOLINA, F. J. G.; BLANCO-NAVALPROTO, M. A.; LÓPEZ, M. J.; CHARLES, P. E.; MARTÍN, E.; HERNÁNDEZ-VIERA, M. A. Usefulness of the —Candida Score[®] for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. **Critical Care Medicine**, v. 37 (5), p. 1624-1633, 2009.

LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. **Current Biology**, v.15, p. 453-455, 2005.

LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial candiduria. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 1602-1607, 2001.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 2971-2974, 2001.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; CHEUNG, B.P.K.; TANG, G.; Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *HLP* gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in *in vitro* haemolysin production. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 112, p. 283-290, 2004.

LYON, G. M.; KARATELA, S.; SUNAY, S.; ADIRI, Y. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48 (4), p. 1270-1275, 2010.

MAGILL, S. S.; SWOBODA, S. M.; JOHNSON, E. A.; MERZ, W. G.; PELZ, R. K.; LIPSETT, P. A.; HENDRIX, C. W. The association between anatomic site of *Candida* colonization, invasive candidiasis, and mortality in critically ill patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, p. 293-301, 2006.

MAH, T.F.C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 34-39, 2001.

MALACARNE, P.; BOCCALATTE, D.; ACQUAROLO, A.; AGOSTINI, F.; ANGHILERI, A.; GIARDINO, M.; GIUDICI, D.; LANGER, M.; LIVIGNI, S.; NASCIMBEN, E.; ROSSI, C.; BERTOLINI, G. Epidemiology of nosocomial infection in 125 Italian intensive care units. **Minerva Anestesiologica**, v. 76, p. 13-23, 2010.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA T.; GLAUSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET, D. Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in Swiss tertiary care Hospitals: secular trends 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 311-320, 2004.

MÉAN M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 12:204, 2008.

MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO RDE, A.; ROCHA, M.F.; RABENHORST, S.H.; SIDRIM, J.J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MESSER, S. A.; JONES, R. N.; FRITSCH, T. R. International Surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44 (5), p. 1782-1787, 2006.

MIRANDA, I.; ROCHA, R.; SANTOS, M. C.; MATEUS, D. D.; MOURA, G. R.; CARRETO, L.; SANTOS, M. A. S. A Genetic Code Alteration Is a Phenotype Diversity Generator in the Human Pathogen *Candida albicans*. **PLoS ONE**, v. 2(10), e996, 2007.

MORAN, C.; GRUSSEMEUER, C. A.; SPALDING, J. R.; BENJAMIN Jr, D. K.; REED, S. D. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. **The Pediatric Infection Disease Journal**, v. 28 (5), p. 433-435, 2009.

MORRELL, M., FRASER, V. J., AND KOLLEF, M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49 (9), p. 3640-3645, 2005.

MOURA, G. R.; PAREDES, J. A.; SANTOS, M. A. S. Development of the genetic code: Insights from a fungal codon reassignment. **FEBS Letters**, v. 584, p. 334-341, 2010.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400-428, 2003.

NAGLIK, J.R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A.R.; RODGERS, C.A.; WOODMAN, A.J.; CHALLACOMBE, S.J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**, v. 154, p. 3266–3280, 2008.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77-82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51 (5), p. 561-570, 2010.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O; BLACKWELL, M. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. **Mycologia**, v. 99 (6), p. 842-858, 2007.

OLAECHEA, P. M.; PALOMAR, M.; LEON-GIL, C.; ALVAREZ-LERMA, F.; JORDÁ, R.; OLLA-SALAS, J.; LEON-REGIDOR, M.A.; EPCAN Study Group . Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, p. 323-30, 2004.

OLIVEIRA, R. D.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ, R. Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 231-235, 2001.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H.W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MANGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47 (10), p. 3149-3154, 2003.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SABLE, C.; SOBEL, J.; ALEXANDER, B. D.; DONOWITZ, G.; KAN, V.; KAUFFMAN, C. A.; KETT, D.; LARSEN, R. A.; MORRISON, V.; NUCCI, M.; PAPPAS, P. G.; BRADLEY, M. E.; MAJOR, S.; ZIMMER, L.; WALLACE, D.; DISMUKES, W. E.; REX, J. H. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, p. 271-276, 2007.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; FOR THE NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A Prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37 (5), p. 634-643, 2003.

PASQUALOTTO, A. C.; NEDEL, W. L.; MACHADO, T. S.; SEVERO, L. C. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatrics and adults with nosocomial candidaemia. **Mycopathologia**, v. 160, p. 111-116, 2005.

PASSOS, X. S.; SALES, W. S.; MACIEL, P. J.; COSTA, C. R.; MIRANDA, K. C.; BATISTA, M. A.; SILVA, M. R. R. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p.925-928, 2005.

PEREIRA, G. H.; MÜLLER, P. R.; SZESZS, M. W.; LEVIN, A. S.; MELHEM, M. S. C. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48 (6), p. 839-842, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L.; and GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43 (12), p. 5848-5859, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibilities of *candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44 (3), p. 760-763, 2006a.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P.G.; WING, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 3-14, 2006b

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

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; NG, K.P.; COLOMBO, A.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; WADULA, J.; GLOBAL ANTIFUNGAL

SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 842-849, 2008.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; BOYKEN, L. TENDOLKAR, S.; KROEGER, J. DIEKEMA, D. J. Variation in Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole According to Patient Age and Geographic Location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47 (10), p. 3185-3190, 2009.

PITTET, D.; MONOD, M.; SUTER, P. M.; FRENK, E.; AUCKENTHALER, R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. **Annals of Surgery**, v. 220, p. 751-758, 1994.

PLAYFORD, E. G.; LIPMAN, J.; KABIR, M.; MCBRYDE, E. S.; NIMMO, G. R.; LAU, A.; SORRELL, T. C. Assessment of clinical risk predictive rules for invasive candidiasis in a prospective multicentre cohort of ICU patients. **Intensive Care Medicine**, v. 35, p. 2141-2145, 2009.

PLAYFORD, E. G.; NIMMO, G. R.; TILSE, M.; SORRELL, T. C. Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999-2008. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, p. 46-51, 2010.

RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; BACHMANN, S.P.; WICKES, B.L.; LOPEZ- RIBOT, J.L. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 3634-3636, 2002.

RICHARDSON M, LASS-FLÖRL C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14(4), p. 5-24, 2008.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; FILIOTI, J.; TSIVITANIDOU, M.; SOFIANOU, D.; KREMENOPOULOS, G.; WALSH, T. J. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(2), p. 735-741, 2003.

ROTA, J.F. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia), Londrina – PR, 2009, 95p.

SAFDAR, A.; CHATURVEDI, V.; CROSS, E.W.; PARK, S.; BERNARD, E.M.; ARMSTRONG, D.; PERLIN, D.S. Prospective Study of *Candida* Species in Patients at a Comprehensive Cancer Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2129-2133, 2001.

SALOMAO, R. V.; ROSENTHAL, V. D.; GRIMBERG, G; NOUER, S.; BLECHER, S.; BUCHNER-FERREIRA, S.; VIANNA, R.; MARETTI-da-SILVA, M. A. Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **Pan American Journal of Public Health**, v. 24 (3), p. 195-202, 2008.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14 (2), p. 398-429, 2001.

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRANES, A.; HAUKLAND, H. H.; MANNSÅKER, T.; GAUSTAD, P.; AND THE NORWEGIAN YEAST STUDY GROUP. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a Nationwide Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (6), p. 1977-1981, 2006.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-377, 2005.

SEAGAL, E. *Candida*, still number one – what do we know and where are we going from there? **Mycoses**, v. 48 (1), p. 3-11, 2005.

SENDID, B.; COTTEAU, A.; FRANÇOIS, N.; D'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. **BMC Infectious Diseases**, v. 6:80, 2006.

SHIN, J.H.; KEE, S.J, SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S. K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.1244-1248, 2002.

SHORR, A. F.; TABAK, Y. P.; JOHANNES, R. S.; SUN, X.; APALDING, J.; KOLLEF, M. H. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. **Critical Care**, v. 13:R15, 2009.

SILVA, E. H. S.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; AULER, M. E.; GIUDICE, M. C.; MOREIRA, D.; SZEZS, W.; PAULA, C. R. Candidúria in a public hospital of são paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 49 (6), p. 349-353, 2007.

SOBEL, J. D. The emergence of non-*albicans Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. **Current Fungal Infection Report**, v. 1, p. 42-48, 2007.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 6102-6107, 2000.

TAN, T. Y; TAN, A. L.; TEE, N. W. S; NG, L. S. Y.; CHEE, C. W. J. The increased role of non-*albicans* species in candidaemia: results from a 3-year surveillance study. **Mycoses**, v. 53 (6), p. 515-521, 2010.

TAVANTI, A.; PARDINI, G.; CAMPA, D.; DAVINI, P.; LUPETTI, A.; SENESI, S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (*sap1-10*) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, 4726-4734, 2004.

TAYLOR, B. N.; STAIB, P.; BINDER, A.; BIESEMEIER, A.; SEHNAL, M.; RÖLLINGHOFF, M.; MORSCHHÄUSER, J.; SCHRÖPPEL, K. Profile of *Candida*

albicans-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1828-1835, 2005.

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

TOYA, S. P.; SCHRAUFNAGEL, D.E.; TZELEPIS, G. E. Candiduria in intensive care units: association with heavy colonization and candidemia. **Journal of Hospital Infection**, v. 66, p. 201-206, 2007.

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21 (4), p. 606-625, 2008.

VANDIJCK D, BLOT S, LABEAU S, BUYLE F, DEPAEMELAERE M, VANDEWOUDE K, DECRUYENAERE J. Candidemia in critically ill patient: An analysis of daily antifungal therapy related costs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 96-99, 2008.

VIDIGAL, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Yeasts in the urinary and respiratory tracts: is it a fungal infection or not? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45 (1), p. 55-64, 2009.

VINCENT, J. L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **Lancet**, v. 361, p. 2068-2077, 2003.

WANG, L.; CHI, Z.; YUE, L.; CHI, Z. and ZHANG, D. Occurrence and diversity of *Candida* genus in marine environments. *Journal of Ocean University of China (English Edition)*, v. 7 (4), p. 416-420, 2008.

WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F. AND WENZEL, R. P. Hospital acquired candidemia: attributable mortality and excess length of stay. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, p. 2642-2645, 1988.

ZAUGG, C.; ZEPELIN, M. B. V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 405-412, 2001.

PARTE I

CORRELAÇÕES ENTRE DIFERENTES NÍVEIS DE CANDIDÚRIA COM FATORES DE RISCO E ESPÉCIES DE *CANDIDA NÃO-ALBICANS*: UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE DOIS ANOS E A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE UFC ML⁻¹ DE URINA.

Marcelo Tempesta de Oliveir; Juliana Frasnelli Rota; Julie Massayo; Regina Mariuza Borsato Quesada; Luciana Furlaneto-Maia; Márcia Cristina Furlaneto

**CORRELAÇÕES ENTRE DIFERENTES NÍVEIS DE CANDIDÚRIA COM
FATORES DE RISCO E ESPÉCIES DE *CANDIDA* NÃO-*ALBICANS*: UM ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO DE DOIS ANOS E A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE
UFC mL⁻¹ DE URINA.**

**Marcelo Tempesta de Oliveir; Juliana Frasnelli Rota; Julie Massayo; Regina Mariuza
Borsato Quesada; Luciana Furlaneto-Maia; Márcia Cristina Furlaneto¹**

Resumo

A candidúria tem sido relatada como um fator de risco para infecções invasivas e candidemia, fazendo parte da base de cálculo de muitos modelos preditivos para o início precoce de intervenções antifúngicas profiláticas. Entretanto, dados referentes à epidemiologia da candidúria são escassos e a maioria dos modelos preditivos para infecções invasivas não distinguem fatores de risco específicos para espécies de *Candida* não-*albicans*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil epidemiológico da candidúria no HU de Londrina/PR entre os anos de 2006 e 2007, classificar a extensão da candidúria em diferentes níveis e identificar fatores de risco específicos para o isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*. Neste estudo foram incluídos isolados clínicos de *Candida* spp obtidos de uroculturas positivas de indivíduos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 a 2007, cuja detecção foi $\geq 10^2$ UFC mL⁻¹. Um total de 157 isolados de *Candida* foi obtido, incluindo *C. albicans* (n=72), *C. tropicalis* (n=54), *C. glabrata* (n=20), *C. parapsilosis* (n=8), *C. krusei* (n=2) e *C. dubliniensis* (n=1). A extensão da candidúria foi classificada em tres diferentes níveis: nível 1 (candidúria leve), nível 2 (candidúria de risco) e nível 3 (candidúria pesada). Houve diferença significativa entre a frequência de isolamento de *C. albicans* e espécies não-*albicans* em relação aos diferentes níveis de candidúria estabelecidos neste estudo, evidenciando a candidúria nível 3 (candidúria pesada) como um fator de risco independente para o isolamento de espécies não-*albicans*. Desta forma, além de dados epidemiológicos referentes à candidúria, este estudo também evidenciou fatores de risco específicos para o isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans* provenientes de candidúria, podendo auxiliar tanto no tratamento da própria candidúria quanto na otimização dos modelos preditivos de infecções invasivas já existentes, contribuindo para a escolha de terapias profiláticas mais adequadas e eficazes. Pode-se concluir que a contagem de UFC mL⁻¹ de urina e subseqüente classificação da extensão da candidúria em diferentes níveis pode ser utilizada como marcador de isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*.

Palavras-chave: *Candida*. Candidúria. Epidemiologia. Espécies não-*albicans*. Candidemia. contagem de UFC.

¹ Endereço para correspondência: Dra. Márcia C. Furlaneto. Tel: 55 43 3371-5736. e-mail: furlaneto@uel.br
Depto. de Microbiologia/CCB/UEL. Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina,PR.

Abstract

Candiduria has been reported as a risk factor for invasive infections and candidaemia, being part of the calculation basis of many predictive models to early initiation of antifungal prophylactic interventions. However, data regarding the epidemiology of candiduria are scarce and most predictive models for invasive infections do not distinguish specific risk factors for species of *Candida non-albicans*. Thus, this study aimed to establish the epidemiological profile of candiduria at UH of Londrina/PR between the years 2006 and 2007, to classify the extent of candiduria at different levels and to identify specific risk factors for the isolation of *Candida non-albicans* species. The study included clinical isolates of *Candida* obtained from patients positive urine cultures whose detection was $\geq 10^2$ CFU mL⁻¹. A total of 157 *Candida* isolates were obtained, including *C. albicans* (n = 72), *C. tropicalis* (n = 54), *C. glabrata* (n = 20), *C. parapsilosis* (n = 8), *C. krusei* (n = 2) and *C. dubliniensis* (n = 1). The extent of candiduria was classified into three different levels: Level 1 (light candiduria), level 2 (risk candiduria) and Level 3 (heavy candiduria). There was a significant difference between the frequency of isolation of *C. albicans* and non-*albicans* species in relation to different levels of candiduria established in this study, showing candiduria level 3 (heavy candiduria) as an independent risk factor for the isolation of non-*albicans* species. Thus, in addition to epidemiological data of candiduria, this study also showed specific risk factors for the isolation of non-*albicans* *Candida* species from candiduria, which can help in both the treatment of candiduria itself as the optimization of predictive models of invasive infections that already exist, contributing to the most appropriate and efficient choice of prophylactic therapy. It can be concluded that the number of CFU mL⁻¹ of urine and subsequent classification of the extent of candiduria at different levels can be used as an isolation marker of *Candida non-albicans* species.

Keywords: *Candida*. Candidúria. Epidemiology. Non-*albicans* species. Candidaemia. CFU count.

INTRODUÇÃO

Atualmente, espécies de *Candida* estão entre os principais agentes causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo e sua ocorrência vem aumentando significativamente, muitas vezes em proporções superiores às dos demais patógenos¹⁻¹¹.

Infecções do trato urinário causadas por *Candida* spp, as candidíases invasivas e principalmente candidemia prolongam o tempo de permanência dos pacientes em hospitais e conseqüentemente aumentam os gastos financeiros referentes ao tratamento e manutenção dos estados de morbidez destes pacientes. Além disso, altas taxas de mortalidade bruta (13% a 90%) e atribuída (24% a 60%) associadas a infecções nosocomiais por espécies de *Candida* são relatadas^{1,2,4,5,6,7,12,13}.

Embora existam controvérsias relativas ao significado clínico de candidúria, a detecção de *Candida* spp em amostras de urina de indivíduos saudáveis, coletadas por técnicas adequadas, e a ocorrência de infecções urinárias adquiridas em comunidade

provocadas por este gênero são incomuns. A candidúria geralmente é observada em pacientes hospitalizados, particularmente naqueles em unidades de terapia intensiva, desenvolvendo-se no decorrer da internação, sendo ainda considerada por muitos autores como um fator de risco para candidiases invasivas e candidemia¹⁴⁻²¹.

O atraso no início da terapia antifúngica está associado ao aumento na taxa de mortalidade em pacientes com candidíase invasiva e candidemia. Por isso, estratégias precoces de intervenções antifúngicas profiláticas (preventivas e empíricas) têm sido cada vez mais recomendadas, mesmo antes da detecção de infecções sistêmicas. Tais estratégias seguem modelos de risco preditivos baseados em fatores clínicos e/ou parâmetros de colonização por espécies de *Candida*, muitos dos quais a candidúria faz parte da base de cálculo²²⁻³³. Entretanto, estes modelos estão em processo de validação, devido a diferenças referentes à aplicabilidade, sensibilidade e especificidade destes entre diferentes regiões demográficas e populações de estudo. Além disso, o emprego destes modelos com vistas ao início precoce de terapia antifúngica tem contribuído apenas com a prevenção de candidiases invasivas e candidemia, não apresentando impacto sobre as taxas de mortalidade. Este fato pode estar associado à escolha inadequada do antifúngico a ser utilizado para a terapia profilática, devido a diferentes perfis de resistência encontrados entre as espécies de *Candida*.

Nas últimas décadas observa-se um aumento progressivo no isolamento de espécies de *Candida não-albicans* em ambientes hospitalares, sendo que a este grupo têm sido atribuídas as maiores taxas de mortalidade, tolerância a altas doses de antifúngicos e resistência intrínseca a estas drogas^{1-4,6,8,34-37}. Entretanto, a maioria dos modelos preditivos para infecções invasivas não distingue fatores de risco específicos para espécies de *Candida não-albicans*. Além disso, dados epidemiológicos referentes à candidúria ainda são escassos no Brasil, se restringindo a estudos conduzidos nas regiões Centro-Oeste (Goiânia) e Sudeste (São Paulo e Ribeirão Preto)³⁸⁻⁴². Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer o perfil epidemiológico da candidúria no HU de Londrina/PR entre os anos de 2006 e 2007, classificar a extensão da candidúria em diferentes níveis e identificar fatores de risco específicos para o isolamento de espécies de *Candida não-albicans*.

METODOLOGIA

Delineamento e população do estudo

Neste estudo foram incluídos 157 isolados clínicos de *Candida* spp obtidos de uroculturas positivas, cuja detecção de *Candida* spp foi igual ou superior a 10^2 unidades formadoras de colônias por mililitro de urina (UFC mL⁻¹), de indivíduos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU) no período de 2006 a 2007. Foi utilizado o método da diluição seriada em placa para a quantificação das UFC mL⁻¹ de urina. Após quantificação, as amostras foram classificadas em faixas que abrangem 10^2 a 10^7 UFC mL⁻¹ de urina. Dois grupos de pacientes foram considerados: pacientes atendidos em ambulatórios (externos) e pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs). Informações relativas a sexo e idade de cada paciente, bem como dados referentes a fatores de risco pelos quais estavam sendo acometidos no momento da detecção da candidúria (uso de antibiótico, nutrição parenteral, presença de cateter urinário, processos cirúrgicos, diabetes mellitus, câncer e HIV) foram avaliados. Apenas a primeira detecção de candidúria de cada paciente foi considerada.

Identificação dos isolados clínicos de *Candida* spp.

Os isolados foram presuntivamente identificados em CHROMagar[®] *Candida* Agar (CA; CHROMagar, France) de acordo com instruções do fabricante. A identificação molecular foi realizada pela técnica da PCR com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos correspondentes a regiões intergênicas (ITS1 e ITS2), descritos por Li e colaboradores⁴³, como segue: CA (*Candida albicans*, 5'-TCA ACT TGT CAC ACC AGA TTA TT-3'), CT (*Candida tropicalis*, 5'-AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A-3'), CGL (*Candida glabrata*, 5'-CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T-3'), CP (complexo *Candida parapsilosis*, 5'-GGC GGA GTA TAA ACT AAT GGA TAG-3'), CK (*Candida krusei*, 5'-GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTG A-3') e o oligonucleotídeo universal ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') localizado no DNAr 26S descrito por Willians e colaboradores⁴⁴.

Para tal, células provenientes de uma única colônia isolada após cultivo de 18 horas a 28° C em meio Sabouraud (4% dextrose, 1% peptona, 1% extrato de levedura, 1.5% agar), de cada isolado de *Candida* spp., foram diretamente adicionadas à mistura de

reação de volume final de 20 µL contendo: 25 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato; 1,5 mM de cloreto de Magnésio; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador; 2 µl (10% do volume final) de 10X Taq Buffer (INVITROGEN); 0,1 U de Taq polymerase (INVITROGEN). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycle gradiente (Eppendorf) com as seguintes condições de reação: desnaturação inicial de 10 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (annealing) e 72°C por 1 minuto (extensão), e, extensão final a 72°C por 2 minutos.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS Statistics 17.0 (SPSS inc. Chicago, Illinois, EUA). Para a análise de variáveis categóricas e variáveis contínuas foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2 test) e o teste *t* (*t* student test), respectivamente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil epidemiológico de candidúria

Durante o período de estudo, um total de 157 isolados de *Candida* foram obtidos de episódios de candidúria em pacientes atendidos no HU, incluindo *C. albicans* (n=72), *C. tropicalis* (n=54), *C. glabrata* (n=20), *C. parapsilosis* (n=8), *C. krusei* (n=2) e *C. dubliniensis* (n=1) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das espécies de *Candida* relacionadas a episódios de candidúria no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007.

Ano	Nº de isolados	<i>C. albicans</i>	<i>não- albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. dubliniensis</i>
2006	85	45 (53)*	40 (47)	27 (32)	12 (14)	01 (1.0)	-	-
2007	72	27 (37.5)	45 (62.5)	27 (37.5)	08 (11)	07 (10)	02 (3.0)	01 (1.0)
Total	157	72 (46)	85 (54)	54 (34)	20 (13)	08 (5.0)	02 (1.0)	01 (1.0)

*Valores em parênteses correspondem a percentagens em relação ao número total de isolados.

A metodologia de PCR empregada propiciou a identificação dos isolados obtidos. Um isolado apresentou características morfológicas em meio CHROMagar *Candida* sugestivo para *C. albicans* (colônias verdes), mas não foi confirmado molecularmente pelo emprego de oligonucleotídeos iniciadores específicos para esta espécie. Também não foram observados produtos de amplificação quando empregado para a identificação deste isolado os oligonucleotídeos descritos anteriormente para outras espécies. Este isolado foi então identificado pela técnica descrita por Khan e colaboradores (2004)⁴⁵ que se baseia no emprego do meio “tobacco Agar” que possibilita a diferenciação de *C. albicans* (colônias lisas de coloração branca-creme) e *C. dubliniensis* (colônias com hifas nas bordas e coloração amarelo-marrom). *C. dubliniensis* é um patógeno emergente que partilha muitas características fenotípicas com *C. albicans*. Estas similaridades têm resultado em identificação errônea destas espécies⁴⁶.

A distribuição das espécies variou no período avaliado. Em 2006, *C. albicans* foi a espécie mais isolada, sendo responsável por 53% dos episódios de candidúria, seguida de *C. tropicalis* (32%), *C. glabrata* (14%) e *C. parapsilosis* (1%). Já em 2007, ocorreu a diminuição da frequência de isolamento de *C. albicans* (37,5%), equiparando-se com a frequência de isolamento de *C. tropicalis*. A frequência de *C. glabrata* foi de 11%, semelhante ao observado para *C. parapsilosis* (10%) que foi a espécie que apresentou maior aumento quanto à frequência de isolamento em relação ao ano anterior. Neste ano, foram também isoladas *C. krusei* e *C. dubliniensis*, diferentemente do observado em 2006.

Como observado na Tabela 1, em 2006 ocorreu um maior número de casos de *C. albicans* (n=45) em relação às espécies de *Candida* não-*albicans* (n=40), enquanto que, em 2007 houve inversão deste perfil, com as espécies não-*albicans* ocorrendo em 62,5% dos episódios de candidúria. Embora não tenha havido diferença significativa (p=0,053) entre as frequências de isolamento de *C. albicans* e do grupo de *Candida* não-*albicans* quando comparado os anos de 2006 e 2007, observa-se a tendência para prevalência das espécies não-*albicans*, evidenciando-as como o grupo responsável pelo maior número de casos de candidúria encontrados no período estudado.

C. tropicalis foi a espécie mais isolada do grupo das não-*albicans*, corroborando com o perfil epidemiológico de candidúria encontrado por outros estudos, que também constataram *C. tropicalis* como a segunda espécie mais comumente isolada³⁸⁻⁴⁰. Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores em 2001⁴¹, *C. tropicalis* foi a espécie de *Candida* mais isolada, sendo responsável por 52,5% dos casos de candidúria, seguido por *C. albicans* e *C. glabrata*, com 35,5% e 8%, respectivamente. Em nosso estudo, foi observada a

equiparação entre a frequência de isolamento de *C. albicans* e *C. tropicalis* de 2006 para 2007, mostrando não apenas a já constatada prevalência de espécies não-*albicans*, mas também a diminuição de casos por *C. albicans* e a tendência desta espécie a ser superada por *C. tropicalis*, fato já encontrado por Oliveira e colaboradores⁴¹ como descrito anteriormente. *C. tropicalis* está entre as quatro espécies de *Candida* mais isoladas de infecções sanguíneas em todo o mundo e está sendo considerado um patógeno emergente devido ao aumento em escala global da proporção em que vem sendo encontrada. Na Ásia e América Latina já é a espécie mais isolada do grupo das *Candida* não-*albicans*, chegando a sobrepor a frequência de isolamento de *C. albicans* em alguns estudos epidemiológicos de candidemia^{1-11,34-37,47-54}.

Importante destacar também os casos de *C. glabrata*, terceira espécie mais isolada em nosso estudo. Em regiões da América do Norte (principalmente nos EUA) e Europa esta espécie é a segunda mais comumente isolada, seguida por *C. parapsilosis*.¹⁻¹¹ Entre as espécies não-*albicans*, *C. glabrata* e principalmente *C. krusei* estão associadas aos mais elevados índices de resistência, fato este que preocupa a comunidade científica destas regiões e desperta a atenção na região Sul do Brasil devido à frequência com que vem sendo encontrada. Foi observado em 2007 o aparecimento de dois casos de *C. krusei*, que apesar de não ser numericamente significativo, reforça o fato de espécies intrinsecamente resistentes estarem sendo cada vez mais isoladas.

No geral, o perfil epidemiológico de candidúria acompanha as mesmas tendências observadas em estudos de candidemia no que se refere à distribuição das espécies entre as diferentes regiões demográficas e população de estudo^{1-11,34-41,55-57}. Cinco espécies são responsáveis por mais de 95% dos casos de infecções provocadas pelo gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo as demais espécies, no momento, consideradas como espécies de *Candida* incomuns^{1-11,58}. Em nosso estudo foi confirmado um caso de candidúria por *C. dubliniensis*, que dentre as espécies incomuns é a mais frequentemente encontrada⁵⁸.

Características clínicas dos pacientes candidúria positivos

A maioria dos estudos relaciona as características clínicas dos pacientes apenas a fatores de risco para a ocorrência de candidúria, não distinguindo fatores específicos para o isolamento de espécies não-*albicans*^{9,18-21,55-57,60,61}. Diferentemente, em nosso estudo foram avaliados os principais fatores de risco à candidúria já descritos na literatura, em busca de condições específicas que favoreçam o isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*.

Apenas a utilização prévia de antifúngicos tem sido relatada como fator de risco para o isolamento de espécies não-*albicans* em urina⁵⁶, enfatizando ainda mais a necessidade da definição de melhores parâmetros para a escolha de terapias profiláticas.

A maioria dos episódios de candidúria (84%) ocorreu em pacientes internados em UTIs, cuja frequência de isolamento das espécies não-*albicans* (57%) foi superior a de *C. albicans* (Tabela 2). Em contrapartida, *C. albicans* foi a espécie mais isolada (60%) em pacientes ambulatoriais (Tabela 4), sendo que o estado de gestação nestas pacientes influenciou significativamente ($p=0,008$) o isolamento desta espécie em relação ao grupo não-*albicans* (dados não mostrados). Desta forma, a gestação foi considerada como um fator de risco independente para o isolamento de *C. albicans* em relação a espécies não-*albicans* em pacientes ambulatoriais.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes candidúria positivos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007.

Variáveis	Número total de isolados <i>n</i> = 157	Espécies de <i>Candida</i>						
		<i>C. albicans</i> <i>n</i> = 72	não- <i>albicans</i> <i>n</i> = 85	<i>C. tropicalis</i> <i>n</i> = 54	<i>C. glabrata</i> <i>n</i> = 20	<i>C. parapsilosis</i> <i>n</i> = 08	<i>C. krusei</i> <i>n</i> = 02	<i>C. dubliniensis</i> <i>n</i> = 01
Sexo								
Masculino	85 (54)*	37 (51)	48 (56)	36 (67)	05 (25)	05 (62)	01	01
Feminino	72 (46)	35 (49)	37 (44)	18 (33)	15 (75)	03 (38)	01	-
Idade (anos)								
≤ 1	11 (07)	07 (10)	04 (05)	02 (04)	02 (10)	-	-	-
02 - 15	05 (03)	04 (05)	01 (01)	-	01 (5,0)	-	-	-
16 - 35	32 (20)	13 (18)	19 (22)	10 (18)	06 (30)	03 (37)	-	-
36 - 60	40 (25)	20 (28)	20 (23)	14 (26)	03 (15)	01 (12)	02	-
≥ 61	69 (44)	28 (39)	41 (48)	28 (52)	08 (40)	04 (50)	-	01
Condições de base								
Pacientes ambulatoriais	25 (16)	15 (21)	10 (12)	07 (13)	03 (15)	-	-	-
Pacientes em UTI	132 (84)	57 (79)	75 (88)	47 (87)	17 (85)	08 (100)	02	01
Uso de antibiótico	110 (70)	45 (63)	65 (76)	42 (78)	16 (80)	06 (75)	01	-
Nutrição parenteral	85 (54)	34 (47)	51 (60)	35 (65)	12 (60)	03 (37)	-	01
Cateter urinário	74 (47)	31 (43)	43 (50)	29 (54)	08 (40)	05 (62)	-	01
Processo Cirúrgico	65 (41)	28 (39)	37 (44)	25 (46)	07 (35)	04 (50)	-	01
Diabetes	26 (17)	11 (15)	15 (17)	12 (22)	01 (5,0)	01 (12)	-	01
Câncer	14 (09)	04 (05)	10 (12)	08 (15)	02 (10)	-	-	-
HIV	08 (05)	03 (04)	05 (06)	01 (02)	-	03 (37)	01	-

*Valor em parênteses corresponde a percentagem em relação ao *n* de cada coluna.

Nenhuma outra condição de base foi considerada como um fator de risco independente significativo para o isolamento de espécies não-*albicans*. Entretanto, é nítida a influência positiva destas condições de base para o isolamento de espécies não-*albicans*, visto que as frequências de isolamento de *Candida* spp em relação ao número de pacientes acometidos por cada condição de base foram superiores no grupo das não-*albicans* em todos os casos, exceto em pacientes ambulatoriais (Tabela 2).

A maioria dos estudos referentes a fatores de risco para o desenvolvimento de candidúria é baseada em pacientes em UTIs^{9,18-21,55,56,60,61}, e dados relativos a fatores de risco à candidúria adquiridas fora do ambiente hospitalar são escassos⁵⁷. Nosso estudo proporciona dados referentes à candidúria em pacientes externos e corrobora com o relatado por Colodner e colaboradores em 2008⁵⁷, mostrando uma maior frequência do sexo feminino e faixas etárias mais baixas em pacientes atendidos em ambulatórios quando comparado a pacientes em UTIs (dados não mostrados). Entretanto, Colodner e colaboradores não encontraram diferenças significativas referentes à distribuição de espécies de *Candida* entre pacientes ambulatoriais e em UTIs, como evidenciado em nosso estudo.

Do total de pacientes candidúria positivos detectados no período de estudo, 85 eram do sexo masculino e 72 do sexo feminino. Ambos os sexos apresentaram uma maior frequência de isolamento das espécies de *Candida* não-*albicans*, sendo esta diferença mais expressiva para o sexo masculino. Foi encontrada diferença significativa entre os sexos masculino e feminino para os fatores de risco UTI ($p=0,0001$), nutrição parenteral ($p=0,01$), cateter urinário ($p=0,026$) e HIV ($p=0,041$). Dos homens, apenas 3 (3,5%) não estavam em UTIs. Das mulheres, 50 (69,5%) estavam em UTIs e 22 (30,5%) foram atendidas em ambulatórios (dados não mostrados). Dos pacientes homens em UTIs, 54 (63,5%) estavam recebendo nutrição parenteral e 47 (55%) estavam com cateter urinário, contra 31 (43%) e 27 (37,5%) dos pacientes do sexo feminino, respectivamente (dados não mostrados). Todos os pacientes HIV positivos estavam em UTIs, eram do sexo masculino e apresentaram candidúria provocadas por espécies não-*albicans*, exceto uma paciente gestante HIV positiva atendida no ambulatório, que apresentou candidúria por *C. albicans* (dados não mostrados). Desta forma, pode-se constatar que pacientes do sexo masculino em UTIs, com os fatores de risco descritos anteriormente têm uma maior predisposição para o isolamento de espécies não-*albicans*. Isto pode explicar a maior frequência de isolamento de espécies não-*albicans* em pacientes do sexo masculino (56%) quando comparados a pacientes do sexo feminino (44%) e também, da maior diferença no percentual de isolamento entre espécies não-*albicans* e *C.*

albicans em homens quando comparado a diferença percentual entre estes dois grupos observada em mulheres (Tabela 2).

Não houve diferença significativa quanto ao isolamento de *C. albicans* e espécies não-*albicans* em relação às faixas etárias estabelecidas em nosso estudo. Entretanto, pode-se observar uma maior frequência de isolamento de *C. albicans* em pacientes com idade inferior a 15 anos e de espécies do grupo não-*albicans* em pacientes acima de 60 anos de idade. A maioria dos estudos relata o sexo feminino e idade avançada como um fator de risco para a candidúria^{9,18-21,55,56,60,61}. Em nosso estudo, foi observado um maior número de casos de candidúria em pacientes do gênero masculino, relacionando-os a condições que predispõem significativamente ao isolamento de espécies não-*albicans*. Além disso, a idade avançada mostrou influenciar a candidúria provocada por espécies não-*albicans* em nosso estudo, similarmente ao relatado em estudos de candidemia, que consideram a idade avançada um fator de risco para infecção por espécies não-*albicans*^{1-9,34-37}. De acordo com os resultados descritos, pode-se concluir que as condições de base, quando analisadas coletivamente, se tornam fatores de risco para candidúria provocada por espécies não-*albicans*.

Classificação da candidúria quanto ao número de UFC mL⁻¹ de urina e sua relação com fatores de risco e espécies de *Candida* não-*albicans*.

O achado laboratorial de candidúria traz controvérsias na sua interpretação, uma vez que ela pode representar diferentes significados clínicos, não existindo consenso na sua caracterização como colonização ou infecção. É fato que, qualquer crescimento de *Candida* spp. em amostras de urina coletadas por técnicas adequadas é definido como candidúria¹⁴⁻²¹. Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo não definir o significado clínico de candidúria, mas sim classificar a extensão da candidúria em diferentes níveis e estabelecer pela primeira vez a sua relação com fatores de risco e espécies de *Candida* não-*albicans*.

Os pacientes candidúria positivos, tanto em UTIs quanto ambulatoriais, foram classificados em 3 diferentes níveis de candidúria: nível 1 - candidúria leve (10² a 10³ UFC mL⁻¹ de urina), nível 2 – candidúria de risco (10⁴ a 10⁵ UFC mL⁻¹) e nível 3 – candidúria pesada (10⁶ a 10⁷ UFC mL⁻¹). A Tabela 3 apresenta as diferentes faixas de UFC estabelecidas em nosso estudo e suas relações com os fatores de risco e espécies de *Candida*.

Tabela 3 – Avaliação do nível de candidúria e fatores de risco associados ao isolamento de espécies não-*albicans* em pacientes candidúria positivos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007.

UFC/mL ⁻¹	n = 157	<i>Candida albicans</i>	não- <i>albicans</i>	UTI	Uso de antibióticos	Nutrição parenteral	Cateter urinário	Processo cirúrgico	Nº de fatores de risco		
									0	1 - 3	≥ 4
10 ⁶ - 10 ⁷	65 (41) ^a	22 (34) ^b	43 (66)	62 (95)	54 (83)	46 (71)	40 (62)	33 (51)	02 (03)	24 (37)	39 (60)
10 ⁴ - 10 ⁵	48 (31) ^a	21 (44)	27 (56)	39 (81)	30 (63)	25 (52)	20 (42)	20 (42)	06 (13)	24 (50)	18 (48)
10 ² - 10 ³	44 (28) ^a	29 (66)	15 (34)	31 (70)	26 (59)	14 (32)	14 (32)	12 (27)	11 (25)	20 (45)	13 (30)

^aValor em parênteses corresponde a percentagem em relação ao número total de pacientes.

^bValor em parênteses corresponde a percentagem em relação ao número total de isolados em cada faixa de UFC.

Tabela 4 – Distribuição das espécies de *Candida* em relação a diferentes faixas de UFC mL⁻¹ de urina em 25 pacientes candidúria positivos atendidos a nível ambulatorial no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina no período de 2006 e 2007.

UFC/mL	Nº de isolados n = 25	<i>C. albicans</i> n = 15	não- <i>albicans</i> n = 10	<i>C. tropicalis</i> n = 07	<i>C. glabrata</i> n = 03
≥ 10 ⁴	12 (48)*	05 (33)	07 (70)	05 (71.5)	02 (67)
10 ³	13 (52)	10 (67)	03 (30)	02 (28.5)	01 (33)

*Valor em parênteses corresponde à percentagem em relação ao *n* de cada coluna.

Do total, foi observado que 72% dos pacientes apresentaram candidúria com altas concentrações celulares ($\geq 10^4$ UFC mL⁻¹ de urina), sendo o grupo das espécies não-*albicans* responsável pela maioria (62%) destes casos. Contagens na faixa de 10^6 a 10^7 UFC mL⁻¹, representando o nível 3 de candidúria (candidúria pesada) foram as mais encontradas nesta população de estudo (41%), seguido por contagens de nível 2 (candidúria de risco) e nível 1 (candidúria leve), com respectivamente 31% e 28% dos casos.

Foi observada a prevalência de pacientes do sexo masculino (60%) sobre o sexo feminino em episódios de candidúria nível 3 – candidúria pesada (10^6 a 10^7 UFC mL⁻¹) (dados não mostrados), mais uma vez evidenciando a maior predisposição do sexo masculino para o isolamento de espécies não-*albicans*.

É notável o aumento gradual tanto no número de pacientes acometidos por cada fator de risco quanto da frequência de isolamento de *Candida* não-*albicans* de acordo com o aumento da contagem de UFC mL⁻¹ de urina. Em contrapartida, a frequência de isolamento de *C. albicans* diminui com o aumento das UFCs. Houve diferença significativa ($p=0,04$) entre a frequência de isolamento de *C. albicans* e espécies não-*albicans* em relação às diferentes faixas de UFC mL⁻¹ de urina. Em pacientes com candidúria nível 1 - candidúria leve (10^2 a 10^3 UFC mL⁻¹) constata-se a maior frequência de isolamento de *C. albicans*, enquanto em pacientes com candidúria nível 3 – candidúria pesada (10^6 a 10^7 UFC mL⁻¹) houve maior frequência de isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*. Desta forma, evidencia-se a candidúria nível 3 (candidúria pesada) como um fator de risco independente para o isolamento de espécies não-*albicans*, enfatizando a importância da determinação de UFC mL⁻¹ de urina em pacientes candidúria positivo.

Quando comparadas as diferentes faixas de UFC mL⁻¹ de urina com os fatores de risco, foi encontrada diferença significativa para os fatores UTI ($p=0,002$), uso de antibióticos ($p=0,011$), nutrição parenteral ($p=0,0001$), cateter urinário ($p=0,006$) e diabetes mellitus ($p=0,001$), que prevaleceram em pacientes com candidúria nível 3 – candidúria pesada (10^6 a 10^7 UFC mL⁻¹). O fator de risco processo cirúrgico, apesar de não ter apresentado diferença significativa ($p=0,05$), também prevaleceu em pacientes com candidúria nível 3.

Anteriormente, a condição paciente externo gestante foi considerada um fator de risco independente para o isolamento de *C. albicans*. Esta mesma condição apresentou diferença significativa ($p=0,011$) quando comparada entre os diferentes níveis de candidúria, prevalecendo em pacientes com candidúria nível 1 – candidúria leve (10^2 a 10^3 UFC mL⁻¹). Isto mostra que, mesmo acometido por um fator de risco (gestação) para o

isolamento de *C. albicans*, o paciente externo (ambulatorial) geralmente não desenvolve altos níveis de candidúria quando confirmada esta espécie, reforçando a relação da candidúria nível 1 (candidúria leve) com o isolamento de *C. albicans* (Tabela 4).

Não diferentemente, quando altas contagens de UFC foram detectadas, mesmo em pacientes externos sem fatores de risco, observou-se a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans*, reforçando da mesma forma a relação da candidúria de risco (nível 2) e principalmente da candidúria pesada (nível 3) com o isolamento de espécies não-*albicans*. É nítido também o aumento do número total de fatores de risco pelos quais os pacientes estão sendo acometidos de acordo com o aumento da contagem de UFC mL⁻¹ de urina (Tabela 3). Ou seja, em pacientes internados, altas concentrações celulares estão associadas ao maior grau de acometimento do paciente, favorecendo o isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*.

De uma perspectiva prática, a candidúria aparece como um dos parâmetros mais promissores no que diz respeito à avaliação de um único sítio colonizado, devido ao fácil processo de amostragem. Evidências definitivas de uma correlação entre a candidúria e candidiases invasivas ainda está faltando, mas cada vez mais estudos evidenciam confiavelmente a utilização da candidúria como um fator de risco e marcador de alta densidade de colonização para estas infecções^{20-33,55,56,59-61}. Alguns estudos ainda evidenciam a relação de contagens celulares acima de 10⁴ UFC mL⁻¹ de urina com modelos preditivos baseados em parâmetros de colonização, especulando a substituição destes modelos pela determinação de contagens de UFC^{59,60,61}.

Pode-se concluir que a prática clínica de determinação de UFC mL⁻¹ de urina junto a outros fatores de risco analisados neste estudo podem auxiliar na definição de terapias profiláticas mais adequadas e eficientes, tanto da candidúria quanto de candidiases invasivas, por direcionar a escolha dos antifúngicos a serem empregados, considerando o risco de isolamento de espécies não-*albicans*. A contagem de UFC mL⁻¹ de urina e subsequente classificação da extensão da candidúria em diferentes níveis pode ser utilizada como marcador de isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*. Desta forma, estes achados podem ser incluídos como novos parâmetros de risco a infecção por espécies não-*albicans* aos modelos preditivos a candidiases invasivas já existentes e, em uma segunda instância, estar sendo avaliado como possível alternativa de substituição a estes modelos.

Referências

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20:133-163.
2. Pfaller MA, Pappas PG, Wing JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 2006; 43:3-14.
3. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010, 51(5):561-570.
4. Bouza E, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Ag* 2008, 32(2):87-91.
5. Ha JF, Italiano CM, Heath CH, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. *Burns* 2010. doi:10.1016/j.burns.2010.01.005.
6. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Ag* 2006, 27:359-366.
7. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 2003, 361: 2068-2077.
8. Méan M, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 2008, 12(1):204.
9. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon JY. Candidemia and candidúria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intens Care Med* 2008, 34:292-299.
10. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14(4):5-24.
11. Malacarne P, Boccalatte D, Acquarolo A, Agostini F, Anghileri A, Giardino M, Giudici D, Langer M, Livigni S, Nascimben E, Rossi C, Bertolini G. Epidemiology of nosocomial infection in 125 Italian intensive care units. *Minerva Anestesiol* 2010, 76:13-23.
12. Hassan I, Powell G, Sidhu M, Hart WM, Denning DW. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidemia. *J. Infect* 2009, 59:360-365.
13. Vandijck D, Blot S, Labeau S, Buyle F, Depaemelaere M, Vandewoude K, Decruyenaere J. Candidemia in critically ill patient: An analysis of daily antifungal therapy related costs. *J Mycol Med* 2008, 18:96-99.
14. Bukhary ZA. Candidúria: a review of clinical significance and management. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2008, 19(3):350-360.
15. Colombo AL, Guimarães T. Candidúria: a clinical and therapeutic approach. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007, 40(3):332-337.

16. Kauffman CA. Candidúria. Clin Infect Dis 2005, 41(6):371-376.
17. Vidigal PG, Svidzinski TIE. Yeasts in the urinary and respiratory tracts: is it a fungal infection or not? J Bras Patol Med Lab 2009, 45(1):55-64.
18. Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial candidúria. Clin Infect Dis 2001, 32:1602-1607.
19. Hollenbach E. To treat or not to treat – critically ill patients with candidúria. Mycoses 2008, 51(2): 12-24.
20. Toya SP, Schraufnagel DE, Tzelepis GE. Candidúria in intensive care units: association with heavy colonization and candidemia. J Hosp Infect 2007, 66:201-206.
21. Magill SS, Swoboda SM, Johnson EA, Merz WG, Pelz RK, Lipsett PA, Hendrix CW. The association between anatomic site of *Candida* colonization, invasive candidiasis, and mortality in critically ill patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2006, 55:293-301.
22. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Álvarez-Lerma F, Garnacho-Monteiro J, León MA. A bedside scoring system (“Candida Score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. Crit Care Med 2006, 34(3):730-737.
23. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, Balasini C, Untade-Vásquez A, Molina FJG, Blanco-Navalproto MA, López MJ, Charles PE, Martín E, Hernández-Viera MA. Usefulness of the “Candida Score” for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. Crit Care Med 2009, 37(5):1624-1633.
24. León C, Álvarez-Lerma F, Ruiz-Santana S, León MA, Nolla J, Jordá R, Saavedra P, Palomar M. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009, 28:233-242.
25. Playford EG, Lipman J, Kabir M, McBryde ES, Nimmo GR, Lau A, Sorrell TC. Assessment of clinical risk predictive rules for invasive candidiasis in a prospective multicentre cohort of ICU patients. Intens Care Med 2009, 35:2141-2145.
26. Playford EG, Eggimann P, Calandra T. Antifungals in the ICU. Curr Opin Infect Dis 2008, 21:610–619.
27. Playford EG, Webster AC, Sorrell TC, Craig JC. Antifungal agents for preventing fungal infections in nonneutropenic critically ill and surgical patients: systematic review and metaanalysis of randomized clinical trials. J Antimicrob Chemother 2006, 57:628–638.
28. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, Bearden DT. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. Clin Infect Dis 2006, 43:25–31.
29. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49:3640–3645.

30. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, Kauffman CA, Kett D, Larsen RA, Morrison V, Nucci M, Pappas PG, Bradley ME, Major S, Zimmer L, Wallace D, Dismukes WE, Rex JH. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, 26:271-276.
31. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994, 220:751-758.
32. Charles, PE, Dalle F, Aube H, Doise JM, Quenot JP, Aho LS, Chavanet P, Blettery B. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intens Care Med* 2005, 31:393-400.
33. Shorr AF, Tabak YP, Johannes RS, Sun X, Apalding J, Kollef MH. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. *Crit Care* 2009, 13:R15.
34. Sobel JD. The emergence of non-*albicans* *Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Curr Fung Infect Rep* 2007, 1:42-48.
35. Pereira, GH, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MSC. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Med Mycol* 2010, 48(6):839-842.
36. Tan TY, Tan AL, Tee NWS, Ng LSY, Chee CWJ. The increased role of non-*albicans* species in candidaemia: results from a 3-year surveillance study. *Mycoses* 2010, 53(6):515-521.
37. Falagas ME, Roussos N, Vardakas Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010, doi:10.1016/j.ijid.2010.04.006.
38. Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DCP, Mikami Y, Miyaji M, Oliveira MS, Barone AA, Levin AS. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12:538-543.
39. Silva, EHS, Ruiz LS, Matsumoto FE, Auler ME, Giudice MC, Moreira D, Szeszs W, Paula CR. Candiduria in a public hospital of são paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2007, 49(6):349-353.
40. Kobayashi CC, Fernandes OF, Miranda KC, Sousa ED, Silva MR. Candiduria in hospital patients: a study prospective. *Mycopathologia* 2004; 158: 49-52.
41. Oliveira RD, Maffei CM, Martinez R. Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species. *Rev Ass Med Brasil* 2001; 47: 231-235.
42. Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Batista MA, Silva MRR. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 925-928.

43. Li YL, Leaw SN, Chen J-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. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:693-696.
44. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey AV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990, 18: 6531-6535.
45. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Clin Microbiol* 2004; 42: 4796-4798.
46. Ells R, Kock JLF, Pohl CH. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? *Mycoses* 2009, 54: 1-16.
47. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* 2010, 59:873-880.
48. Colombo AL, Nucci M, Park B J, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA.; Warnock D, Morgan J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J Clin Microbiol* 2006, 44 (8):2816-2823.
49. Xess I, Jain N, Hasan F, Mandal P, Banerjee U. Epidemiology of Candidemia in a Tertiary Care Centre of North India: 5-Year Study. *Infection* 2007, 35(4):256-259.
50. Kalkanci A, Berk B, Aykan B, Caglar K, Hizel K, Arman D, Kustimur S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from hospitalized patients. *J Mycol Med* 2007, 17:16-20.
51. Al-Tawfiq JA. Distribution and epidemiology of *Candida* species causing fungemia at a Saudi Arabian hospital, 1996-2004. *Int J Infect Dis* 2007, 11:239-244.
52. Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Micr Infect Dis* 2007, 58:77-82.
53. Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Rêgo L, Lira C, Almeida L, Martins M, Araújo C, Duarte M, Lopes G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. *Braz J Microbiol* 2009, 40:325-328.
54. Kim TH, Lee YS, Lee MK, Lee KM. Species Distribution and Susceptibilities to Azoles of *Candida* Species Including *C. tropicalis* in a Tertiary Burn Center. *Korean J Clin Microbiol* 2010, 13(2):79-84.
55. Paul N, Mathai E, Abraham OC, Michael JS, Mathai D. Factors associated with candiduria and related mortality. *J Infect* 2007, 55:450-455.
56. Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, Bolbillo F. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intens Care Med* 2003, 29:1069-1076.

57. Colodner R, Nuri Y, Chazan B, Raz R. Community-acquired and hospital-acquired candiduria: comparison of prevalence and clinical characteristics. *Eur J Clin Infect Dis* 2008, 27:301-305.
58. Chen SCA, Marriott D, Playfors EG, Nguyen Q, Ellis D, Meyer W, Sorrell TC, Slavin M. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15:662-669.
59. Pierluigi V. *Candida* colonization and candiduria in critically III patients in intensive care unit. *Drugs* 2009, 69(1):51-57.
60. Sellami A, Sellami H, Makni F, Bahloul M, Cheikn-Rouhou F, Bouaziz M, Ayadi A. Candiduria in intensive care unit: significance and value of yeast numeration in urine. *Ann Fr Anesth* 2006, 25:584-588.
61. Chabasse D. Interest of yeast numeration in urine. Review of literature and preliminary results of a multicentric prospective study carried out in 15 hospital centers. *Ann Fr Anesth Reanim* 2001; 20: 400-406.

PARTE II**INTERACTION OF *CANDIDA* PARAPSILOSIS ISOLATES WITH HUMAN HAIR
AND NAIL SURFACES REVEALED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY
ANALYSIS.**

**Marcelo T. Oliveira; Ana Flávia L. Specian; Célia G.T.J. Andrade; Emanuele J.G.
França, Luciana Furlaneto-Maia; Marcia C. Furlaneto**

INTERACTION OF *CANDIDA PARAPSILOSIS* ISOLATES WITH HUMAN HAIR AND NAIL SURFACES REVEALED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS

Ref. No. JMIC-D-10-00033

Marcelo T. Oliveira^a; Ana Flávia L. Specian^a; Célia G.T.J. Andrade^b; Emanuele J.G. França^a, Luciana Furlaneto-Maia^c; Marcia C. Furlaneto^{a*}

Abstract

Candida parapsilosis is found frequently as commensal organism on epithelial tissues, and is also an increasing cause of nosocomial infection. Scanning electron microscope (SEM) observations were used to analyse the capability of *C. parapsilosis* cells to adhere and grow as biofilm on human natural substrates and to compare the adherence pattern of isolates exhibiting distinct phenotypes. Cells from the crepe phenotype are predominantly elongated and form pseudohyphae whereas cells from the smooth phenotype are yeast-shaped, either in liquid cultures or on human nail and hair surfaces. The electron micrographs revealed that *C. parapsilosis* cells from the smooth phenotype adhered in higher number to both surfaces compared to the observed for the crepe phenotype. SEM analysis of human hair surface revealed that cells from the smooth phenotype appear as clumped blastoconidia of uniform morphology embedded in a flocculent extracellular material forming biofilm. The extracellular material and biofilm were seen in a less extension in the crepe phenotype. A distinct adherence pattern was observed when human nail was used as substrate. Here *C. parapsilosis* cells seem to be linked to surface structures of human nail plate. Fibrillar extracellular material was observed connecting neighbouring cells as well as nail surface.

Keywords: *Candida parapsilosis*. SEM. Smooth phenotype. Crepe phenotype. Adhesion.

^a Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina -PR, Brazil

^b Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina -PR, Brazil

^c Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina-PR, Brazil. * Corresponding author: Márcia C. Furlaneto. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina. P.O. Box. 6001, Londrina-PR, 86051990, Brazil. Phone: ++ 55 43 33715736. E-mail furlaneto@uel.br

1 INTRODUCTION

Candida species are frequently found in the normal microbiota of humans. High rate of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy individuals has been reported (Huang et al., 1998; Bonassoli et al., 2005). This species may be found on skin rather than mucosal surfaces and is notorious for nosocomial spread by hand carriage. The hands of healthcare workers are considered to be important source for colonization and infection with *C. parapsilosis* (Lunel et al., 1999; Saiman et al., 2001).

Over the past 2 decades *C. parapsilosis* has dramatically increased in significance and prevalence as an emerging major human pathogen, such that *C. parapsilosis* is among the commonest species of *Candida* responsible for nosocomial blood infection worldwide, particularly affecting critically ill neonates and surgical intensive care unit patients (Clark et al., 2004; Almirante et al., 2006). Besides, *C. parapsilosis* is also emerging as an important cause of onychomycosis, a fungal infection whose incidence has been increasing all over the world, with the majority of cases affecting mainly the fingers nails (Gautret et al., 2000; Brilhante et al., 2005).

It has been showed that adhesion (Kuhn et al., 2004) and ability to grow as biofilms (Kuhn et al., 2002) formed through the production of extracellular slime (Branchini et al., 1994) on abiotic surfaces are especially important for outbreaks of *C. parapsilosis* infections (reviewed in Trofa et al., 2008).

More recently, Lattif et al. (2009) compared the biofilm forming ability among clinical isolates of *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* (formely *C. parapsilosis* groups II and III, respectively) on abiotic surface (silicone discs). According to these authors, all three species formed biofilm with similar surface topography and architecture.

It has recently been showed that biofilm extracellular matrix composition is highly species dependent, and that matrices isolated from *C. parapsilosis* biofilms consisted mainly of carbohydrates (Silva et al., 2009). Ciok-Pater et al. (2009) reported that biofilm forming ability is also species dependent, and showed that biofilm was most frequently produced by the strains of *C. albicans* than by *C. parapsilosis* strains.

Furthermore, it has been demonstrated that in *C. parapsilosis* some phenotypes form biofilm differentially on polystyrene surfaces (Laffey and Butler, 2005).

Although it has been established that *C. parapsilosis* is an opportunistic pathogen related to the skin surface, as far we know, there are not data regarding the interaction of *C. parapsilosis* with human hair and nail surfaces.

In this study, we employed SEM analysis to verify the interaction of *C. parapsilosis* with these substrates and to compare the adherence pattern of isolates exhibiting distinct colony phenotypes, e.g., smooth phenotype and crepe phenotype. SEM analysis allowed us to observe for the first time extracellular material and biofilm at ultrastructural level.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 CANDIDA ISOLATES

C. parapsilosis isolates included in this study were recovered from fingernails specimens and belong to *Candida* culture collection of the Fungal Genetics Laboratory, The University of Londrina-Brazil.

Isolates were chosen on the basis of colony morphology, e.g., crepe phenotype and smooth phenotype that resemble those described by Laffey and Butler (2005). The identity of isolates was determined by the PCR technique as described by Furlaneto-Maia et al. (2008) using primers for *URA3* gene (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) which amplicon product is obtained only from *C. parapsilosis* (formely *C. parapsilosis* group I) as described by Tavanti et al. (2005).

2.2 STABILITY ANALYSIS AND GROWTH RATE

To assess the stability of the phenotypes, approximately 1×10^3 cells from random single colony of representative isolates of two colony phenotypes, smooth (isolate 11) and crepe (isolate 34) were plated (up to 300 CFU/plate) onto YPD agar (0.5% Bacto yeast extract; 1% dextrose; 0.5% Bacto peptone; 1.5% bacteriological agar). These colonies phenotypes were characterized previously as described by Enger et al. (2001) (data not shown).

For the purpose of growth rate assessment, we prepared yeast cell suspensions (10^4 cells/ml) in basal minimal medium (MM) containing (g/l): K_2HPO_4 - 1.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.025g; $CaCl_2$ - 0.025g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.015g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.005g and 1%

glucose, pH 8 as described by El-Naghy *et al.* (1998). Each suspension was inoculated in polystyrene microtubes and incubated at 30°C for 48 and 120 h. The growth rate was determined by optical density at 600 nm (OD₆₀₀) and by colony-forming units (c.f.u.) counting. The cultures were analysed in triplicate.

2.3 SUBSTRATES PREPARATION

Human's hair and nail from healthy volunteer were cut to obtain small fragments ranging from 0.5 to 1 cm of size. The fragments were submitted to the following treatment: 1) washes with sterilized distilled water until a clean solution is obtained; 2) three washes of 10 minutes under constant agitation with an ethanol 70% solution, and a final overnight incubation at 8°C in ethanol 70% solution; 3) three washes of 30 minutes with acetone under constant agitation; and 4) three washes of 5 minutes with ethanol absolute under constant agitation. Thereafter, the fragments were dried under aseptic conditions at 25°C and immediately used for the scanning electron microscope experiment.

2.4 CANDIDA PARAPSILOSIS CULTURES

Isolates were growth overnight onto autoclaved and filtered liquid minimal medium (MM), pH 8 at 30°C under agitation of 180 rpm. The cells were washed with filtered MM, and resuspended in 100 µl of the same medium to a final concentration of 10⁴ cells on polystyrene microtubes.

2.5 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Firstly, fragments of the respective natural substrates (hair and nail) were aseptically added to the microtubes containing 100 µl (10⁴ cells), determined by haemocytometer counting, of each *C. parapsilosis* chosen isolates. The cultures were homogenized and statically incubated at 30°C for 5 days. Negative controls were done as described, in minimal medium without *C. parapsilosis* isolates. After the incubation period, a fixation solution of 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, were added directly to the 100 µl cultures and negative controls, followed incubation at 8°C for 18 h. Then, the substrates were carefully washed with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. Post-fixation was carried out for 1h at 25°C with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer.

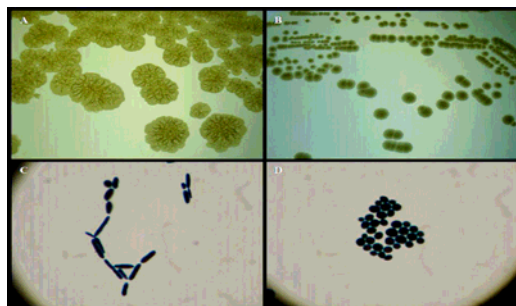
Subsequently, the substrates were gently washed with filtered 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, recovered and deposited on cover glasses (13-mm diameter) previously treated with poly-L-lysine. The samples were gently dehydrated in graded ethanol, critical point-dried in CO₂ (BALTEC DCP 030 Critical Point Dryer), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and viewed in a FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope.

3 RESULTS

Colonies morphology of crepe phenotype and smooth phenotype are shown in Figures 1A and 1B, respectively. Cell morphology of the two phenotypes varied. Cells from the crepe phenotype are predominantly elongated, with sizes that vary from 1 to 5 μm (Figure 1C). Cells from the smooth phenotype are small and yeast-shaped, ranging from 0.5 to 3 μm of size (Figure 1D).

The stability analysis of the phenotypes (smooth and crepe) revealed no differences in colony morphologies, e.g., progeny colonies maintained their original colony phenotype under the conditions tested. Furthermore, the isolates exhibiting smooth and crepe had similar growth rate in minimal medium at 120 h incubation. The growth rates were 5.6×10^5 c.f.u./ml ($\text{OD}_{600} = 0.02$) and 4.8×10^5 c.f.u./ml ($\text{OD}_{600} = 0.016$) for smooth and crepe phenotypes, respectively.

Figure 1 – Micrographs showing the crepe and smooth phenotypes of *Candida parapsilosis* cultured on Sabouraud dextrose agar at 30°C for 24 h. (A) Crepe colonies. (B) Smooth colonies. Light micrograph (x100) of *C. parapsilosis* cells from the crepe phenotype (C) and smooth phenotype (D) after staining with 2% crystal violet solution.

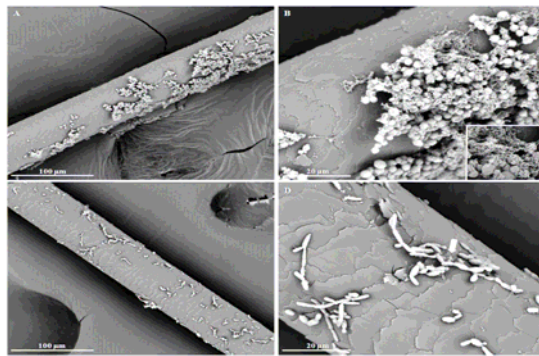


The scanning electron microscopy analyses show that the smooth phenotype grew as yeast-shaped cells (blastospores), whereas the crepe phenotype present elongated cells and pseudohyphae under conditions tested (Figures 2 and 3). Furthermore, the electron

micrographs revealed that *C. parapsilosis* cells of the smooth phenotype adhered in higher number to both surfaces (hair and nail) compared to the observed for the crepe phenotype.

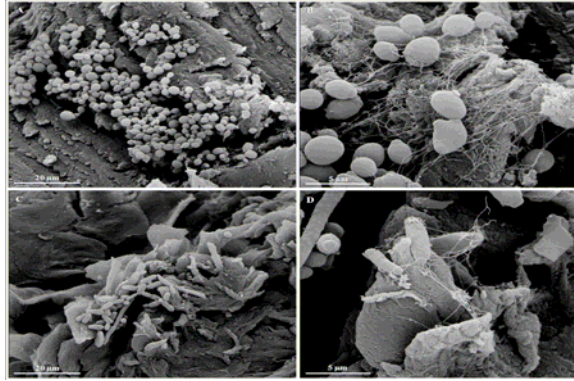
SEM analysis of human hair surface revealed that the smooth phenotype of *C. parapsilosis* appears as clustered cells of uniform morphology embedded in a flocculent extracellular material forming biofilm (Figure 2B). The extracellular material and biofilm are seen in a much less extension in the crepe phenotype (Figure 2D).

Figure 2 – Electron micrographs showing the *in vitro* adherence to human hair surface. (A, B) Adherence pattern of the “smooth” phenotype of *C. parapsilosis* showing grouped cells of uniform morphology (blastospores). (B) Insert shows detail of clustered cells embedded in a flocculent extracellular material at higher magnification (3000x). (C, D) Adherence pattern of the “crepe” phenotype of *C. parapsilosis* showing elongated cells and pseudohyphae. (D) The extracellular material is seen in a less extension in the “crepe” phenotype isolate (white arrow).



A distinct adherence pattern was observed when human nail was used as substrate (Figure 3). SEM analysis revealed that *C. parapsilosis* cells seem to be linked to surface structures of human nail plate. Fibrillar extracellular material is observed connecting neighbouring cells as well as nail surface (Figures 3B and D). Negative control experiments revealed no visual alterations on the architecture of the nail and hair structures that are essentially made up of an insoluble sulphur-containing fibrous protein (hard keratin).

Figure 3 – *In vitro* adherence to human nail surface. (A) Adherence pattern of the “smooth” phenotype of *C. parapsilosis* showing clustered cells of yeast-shaped morphology. (B) Show fibrillar extracellular material connecting neighbouring cells as well as nail surface. (C, D) Adherence pattern of the “crepe” phenotype of *C. parapsilosis* showing elongated cells and pseudohyphae. Fibrillar extracellular material is also seeing (D).



4 DISCUSSION

C. parapsilosis has been shown to grow as biofilm on abiotic surfaces (Kuhn et al., 2002; Kuhn et al., 2004; Laffey et al., 2005). This feature is particularly important for *C. parapsilosis* colonization and infection (Diekema et al., 1997; Kaitwatcharachai et al., 2002).

In this study, the employment of SEM analysis allowed us to verify the capability of *C. parapsilosis* cells to adhere and grow as biofilm on human natural substrates and to compare the adherence pattern at ultrastructural level of isolates exhibiting smooth and crepe phenotypes.

Phenotypic analysis of the smooth and crepe phenotypes revealed that differences in colony morphologies were associated with differences in cell morphology as described previously (Laffey and Butler, 2005). Cells from the crepe phenotype isolate are predominantly elongated and form pseudohyphae whereas cells from the smooth phenotype isolate are yeast-shaped, either in liquid cultures (Figure 1) or on human nail and hair surfaces (Figures 2 and 3). In *C. albicans* (Soll et al., 1993) and *Candida glabrata* (Lachke et al., 2002) switching between colony phenotypes also involves change in cellular morphology.

In this study, both isolates exhibiting smooth and crepe phenotypes had similar rate of growth under the growth conditions employed in the scanning electron microscopy analyses. According to the literature, growth rates may vary among different *Candida* switch phenotypes. For instance, Laffey and Butler (2005) found that smooth

phenotype of *C. parapsilosis* grew more rapidly in YPD medium compared to other phenotypes. For *C. albicans*, Jin et al. (2005) observed that smooth variants exhibited lower growth rates than the other phenotypes. Besides, we observed no reversion of the smooth and crepe phenotypes. The occurrence of isolates that exhibits only the crepe phenotype was previously described (Laffey and Butler 2005).

On microscopy, the *C. parapsilosis* isolates exhibiting distinct phenotypes showed different adherence and biofilm patterns on keratinised natural substrates. The adhesion of smooth cells to human hair and nail was greater than adhesion of crepe cells (Figures 2 and 3, respectively). On the other hand, on polystyrene surfaces the *C. parapsilosis* smooth phenotype was less adherent than crepe phenotype (Laffey and Butler, 2005). Phenotypic variants have also been associated with differences in adhesion of *C. albicans* to mammalian cells (Kennedy et al., 1988; Vargas et al., 1994).

SEM analysis also revealed that the two phenotypes present different profiles of extracellular slime production and biofilm formation according to the substrate that they were in contact. In human hair both strains produced thin amorphous flocculent extracellular material, occurring in a higher extension in the smooth phenotype (Figure 2). Similar slime pattern was observed in previous studies of *Candida* adhesion on distinct substrates, such as, murine epidermis (Ray and Payne, 1988) and bioprosthetic valves (Marrie et al., 1984). When nail was used as substrate both strains produced a fibrillar extracellular material linking adjacent cells and cells with the nail surface (Figure 3). Here, the cells seem to be linked to the surface structures. Biofilm formation was also more evident from smooth cells on both substrates used. Currently, the production of biofilm by *C. parapsilosis* exhibiting smooth phenotype was analysed only on abiotic material (Laffey and Butler, 2005). It is well known that *Candida* biofilms are influenced by environmental factors and the physiochemical nature of the contact surface (Chandra et al., 2001; Nett and Andes, 2006). Although both substrates used in this study (hair and nail) are predominantly epithelial structures derived from primitive epidermis and made up of keratinous fibrils embedded in a sulphur-rich matrix (hard keratin), they present different types of differentiation, e.g., hair shaft and nail plate (Knapp et al., 1986). Besides, nail plate differ from hair due to the presence of 10-20% of soft keratins (Lynch et al., 1986). Our study extends the observation that distinct phenotypes in *C. parapsilosis* are correlated with changes in the properties of adherence and biofilm production.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Araucária – Paraná–Brazil and PROPPG/UEL-Brazil. M.T.O. and A.F.L.S. are fellowship-holders of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) –Brazil.

Referentes

Almirante, B., Rodríguez, D., Cuenca-Estrella, M., 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1681-1685.

Bonassoli, L.A., Bertoli, M., Svidzinski, T.I.E., 2005. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of health hosts. *J Hosp Infect.* 59, 159-162.

Branchini, M.L., Pfaller, M.A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T., Isenberg, H.D. 1994. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 32, 452–456.

Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Medrano, D.J.A., 2005. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 131-135.

Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., Ghannoum, M.A., 2001. Biofilm formation by the pathogen *C. albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385–5394.

Ciok-Pater, E., Gospodarek, E., Prazynska, M., Bogiel, T., 2009. The evaluation of relationship between the origin of *Candida* sp and the ability of biofilm formation on surface of different biomaterials. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 61, 273-280.

Clark, T.A., Slavinski, S.A., Morgan, J., 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4468-4472.

Douglas, L.J., 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11, 30-36.

Diekema, D.J., Messer, S.A., Hollis, R.J., Wenzel, R.P., Pfaller, M.A., 1997. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 147-153.

El-Naghy, M.A., El-Ktatny, M.S., Fadel-Allah, E.M., Nazeer, W., 1998. Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. *Mycopathologia* 143, 77–84.

- Enger, L., Joly, S., Pujol, C., Pfaller, P.M., Soll, D.R., 2001. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 658-669.
- Furlaneto-Maia, L., Specian, A.F., Bizerra, F.C., Oliveira, M.T., Furlaneto, M.C., 2008. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* 166, 209-217.
- Gautret, P., Rodier, M.H., Lacroix, K.C., Jacquemin, J.L., 2000. Case report and review. Onychomycosis due to *C. parapsilosis*. *Mycoses* 43, 433-435.
- Gupta, A.K., Ryder, J.E., Baran, R., Summerbell, R.C., 2003. Nondermatophyte onychomycosis. *Dermatol. Clin.* 21, 257-268.
- Huang, Y.C., Lin, T.Y., Leu, H.S., Wu, J.L., Wu, J.H., 1998. Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. *J. Hosp. Infect.* 39, 47-51.
- Jin, Y., Samaranayake, Y.H., Yip, H.K., Samaranayake, L.P., 2005. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 160, 191-200.
- Kaitwatcharachai, C., 2002. *Candida parapsilosis* peritonitis in patients on CAPD. *Mycopathologia* 254, 181-184.
- Kennedy, M.J., Rogers, A.L., Hanselmen, L.R., Soll, D.R., Yancey, R.J., 1988. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia* 102, 149-156.
- Knapp, A.C., Franke, W.W., Herd, H., Hatzfield, M., Jorcano, J.L., Moll, R., 1986. Cytokeratin No.9 an epidermal type I keration characteristic of a special program of keratinocyte differentiation displaying body site specificity. *J. Cell. Biol.* 103, 657-667.
- Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Clark, T.A., 2004. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1074 – 1081.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A., 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 70, 878-888.
- Lachke, S.A., Joly, S., Daniels, K., Soll, D.R., 2002. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology* 148, 2661-2674.
- Laffey, S.F., Butler, G., 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. *Microbiology* 151, 1073-1081.
- Lattif, A.A., Mukherjee, P.K., Chandra, J., Swindell, K., Lockhart, S.R., Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Ghannoum, M.A., 2009. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. *Int. J. Med. Microbiol.* Doi: 1016/j.ijmm.2009.09.001.
- Lunel, F.M.V., Meis, J.F.G.M., Voss, A., 1999. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 213-220.

- Lynch, M.H., O'Guin, W.M., Hardy, C., Mak, L., Sun, T-T., 1986. Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins: their colonization in upper cortical and cuticle cells of human hair follicle and their relationship to "soft" keratins. *J. Cell. Biol.* 103, 2593-2606.
- Marrie, T.J., Cooper, J.H., Costerton, J.W., 1984. Ultrastructure of *Candida parapsilosis* endocarditis. *Infect. Immun.* 45, 390-398.
- Nett, J., Andes, D., 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host –pathogen interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 340-345.
- Ray, T.L., Payne, C.D., 1988. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a Role for *Candida* Acid Proteinase. *Infect. Immun.* 56, 1942-1949.
- Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J., 2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20, 1119-1124.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J., 2009. Biofilma of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med. Mycol.* 46, 681-689.
- Soll, D.R., Morrow, B., Srikantha, T., 1993. High- frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* 9, 61-65.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A.R., Maiden, M.C.J., Odds, F.C., 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43, 284-292.
- Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D., 2008. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 606-625.
- Vargas, K., Wertz, P.W., Drake, D., Morrow, B., Soll, D.R., 1994. Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153A cells exhibiting switch phenotypes to buccal epithelium and stratum corneum. *Infect. Immun.* 62, 1328-1335.

PARTE III

**AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GENES DA FAMÍLIA SAPTS
(*SECRETED ASPARTYL PROTEASES*) EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA
TROPICALIS* PELO EMPREGO DO RT-PCR EM TEMPO REAL.**

**AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GENES DA FAMÍLIA SAPTS
(SECRETED ASPARTYL PROTEASES) EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA
TROPICALIS* PELO EMPREGO DO RT-PCR EM TEMPO REAL.**

**Marcelo Tempesta de Oliveira¹; Daniel Favero¹ Emanuele Júlio Galvão de França¹
Luciana Furlaneto-Maia²; Márcia Cristina Furlaneto¹**

Resumo

Leveduras do gênero *Candida* estão entre os 10 principais patógenos causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo. No geral, *Candida tropicalis* está entre as 4 espécies de *Candida* mais isolada e tem sido considerado um patógeno emergente, devido principalmente ao seu índice de isolamento em regiões da Ásia e América Latina, incluindo o Brasil, onde é a espécie mais isolada do grupo das *Candida* não-*albicans*, chegando até prevalecer sobre *C. albicans* em alguns casos. Esta espécie possui uma família de genes (*SAPT1-4*) que codifica proteases aspárticas secretadas, fatores de virulência essenciais relacionados ao estabelecimento de infecções, além de outras funções celulares. Entretanto, até o momento apenas o gene *SAPT1* teve a expressão diferencial constatada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão dos genes *SAPT* (*SAPT1-4*) em 15 isolados clínicos de *C. tropicalis* provenientes de diferentes sítios anatômicos (raspado de unha, sangue e secreção traqueal) em resposta aos substratos BSA (soro albumina bovina) e hemoglobina, pelo emprego da metodologia de PCR em tempo real. As condições de cultivo testadas proporcionaram a expressão diferencial (indução significativa) dos genes *SAPT1*, *SAPT2* e *SAPT3* em relação à situação controle (ausência de substrato), cujo perfil de expressão variou qualitativa e quantitativamente de acordo com o substrato utilizado e os diferentes isolados. Os dados obtidos sugerem que a expressão diferencial dos genes *SAPTs* é linhagem específica, não estando relacionado ao sítio anatômico de isolamento. Este trabalho representa o primeiro relato de expressão diferencial dos genes *SAPT2* e *SAPT3* de *C. tropicalis*.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Proteases aspárticas. *SAP*. PCR em tempo real. Expressão diferencial.

Abstract

Yeast species belonging to the genus *Candida* are among the top 10 pathogens causative of nosocomial infections worldwide. Overall, *Candida tropicalis* is among the four major isolated *Candida* species and has been considered an emerging pathogen, particularly because of their isolation rates in Asia and Latin America, including Brazil, where it is the most frequent species of the *Candida* non-*albicans* group, down to prevail over *C. albicans* in some

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR. Endereço para correspondência: Dra. Márcia C. Furlaneto. Tel: 55 43 3371-5736. e-mail: furlaneto@uel.br Depto. de Microbiologia/CCB/UEL. Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, PR.

cases. This species has a gene family (*SAPT1-4*) that encodes secreted aspartic proteases, virulence factors essential to the establishment of related infections, and other cellular functions. However, until now only the *SAPT1* gene had the differential expression detected. Thus, the aim of this study was to analyze the *SAPT* genes expression (*SAPT1-4*) in 15 clinical isolates of *C. tropicalis* obtained from different anatomical sites (nail scraping, blood and tracheal aspirates) in response to the substrates BSA (bovine serum albumin) and hemoglobin, employing the real time PCR methodology. The conditions tested resulted in differential expression (significant induction) of *SAPT1*, *SAPT2* and *SAPT3* genes compared to the control situation (absence of substrate), whose expression profiles varied qualitatively and quantitatively according to the substrate and the different isolates. The data suggest that the differential expression of *SAPTs* genes is strain-specific, not being related to anatomic site of isolation. This work represents the first report of differential expression of *C. tropicalis* *SAPT2* and *SAPT3* genes.

Keywords: *Candida tropicalis*. Aspartic proteases. *SAP*. Real time PCR. Differential expression.

INTRODUÇÃO

Espécies patogênicas de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* apresentam uma ampla variedade de fatores de virulência, codificados por genes que são seletivamente expressos de acordo com a necessidade do fungo, seja em resposta a diferentes condições ambientais ou no decorrer de infecções¹⁻⁹. Dentre os principais fatores de virulência estão as proteases aspárticas secretadas (*Sap* – *Secreted Aspartic Proteases*), codificadas por dez genes *SAP*, já caracterizados e alvo de inúmeros estudos empregando-se a espécie *Candida albicans* como modelo^{2,6-9}. Entretanto, existem diferenças significativas quanto à presença e número dos genes *SAP* entre as demais espécies de *Candida*, bem como da regulação da expressão dos mesmos^{3,4,5,10}.

Candida tropicalis está entre as 4 espécies de *Candida* mais isolada em todo o mundo e tem sido considerado um patógeno emergente^{11,12}. Na Ásia e América Latina, *C. tropicalis* tem sido a espécie mais isolada do grupo das *Candida* não-*albicans*, chegando a prevalecer até sobre *C. albicans* em alguns casos¹¹⁻²³.

C. tropicalis possui quatro genes que codificam proteases aspárticas secretadas (*Saps*), denominados *SAPT1* a 4⁵. No entanto, são escassos os estudos relativos à regulação da expressão desses genes. Zaugg et al.⁵ detectaram a expressão diferencial somente do gene *SAPT1* após cultivo de *C. tropicalis* em presença de soro albumina bovino (BSA), sendo que os demais genes da família foram expressos em níveis basais.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a regulação da expressão de genes da família *SAPT* em isolados clínicos de *C. tropicalis*, provenientes de diferentes sítios anatômicos, em diferentes condições de cultivo.

METODOLOGIA

Isolados de *Candida tropicalis*

Um total de 15 isolados clínicos de *C. tropicalis* provenientes de diferentes amostras clínicas de pacientes atendidos e internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Destes, 05 (08.05, 35.06, 151.06, 182.06, 219.07) foram isolados de infecções superficiais (raspado de unha), 05 (136.06, 138.06, 144.06, 189.06 e 301.07) foram provenientes de infecções sanguíneas e 05 (197.06, 201.06, 254.07, 335.07 e 344.07) foram isolados de secreções traqueais. Os isolados fazem parte da coleção de leveduras do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. As leveduras foram mantidas em meio Sabouraud (4% glicose; 1% peptona; 0,25% extrato de levedura) com 20% de glicerol e armazenadas a -20°C.

A identificação dos isolados foi realizada utilizando o meio cromogênico CHROMagar[®] *Candida* (CA; CHROMagar, France) e confirmada por PCR, com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos segundo descrito por Li e colaboradores²⁴, com algumas modificações. Para tal, células provenientes de uma única colônia isolada após cultivo de 18 horas a 28° C em meio Sabouraud solidificado, de cada isolado de *C. tropicalis* selecionado, foram diretamente adicionadas a mistura de reação de volume final de 20 µL contendo: 25 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato; 1,5 mM de cloreto de Magnésio; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador; 2 µl (10% do volume final) de 10X Taq Buffer (INVITROGEN); 0,1 U de Taq polymerase (INVITROGEN). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycle gradiente (Eppendorf) com as seguintes condições de reação: desnaturação inicial de 10 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (annealing) e 72°C por 1 minuto (extensão), e extensão final a 72°C por 2 minutos.

Análise de transcritos dos genes *SAPT 1 – 4* e *tACT* de *C. tropicalis*

A avaliação da expressão diferencial dos genes *SAPTs* foi realizada após cultivo nos substratos soro albumina bovino (BSA) e hemoglobina bovina (Hb). Primeiramente, foram realizados três pré-cultivos consecutivos de 12 horas em meio *Candida* ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%; $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ 0,25%; NaCl 0,5%; extrato de levedura 0,1%; glicose 20%; pH=4,5), nas condições de incubação de 37°C em 180 rpm, para o estabelecimento de um sincronismo do cultivo, com a finalidade de minimizar alterações no nível de transcrição referentes a diferentes estados metabólicos entre as células de cada cultura. Posteriormente, o número celular foi estimado pela contagem em câmara hemocitométrica e a concentração celular ajustada para 10^6 células/mL. Uma alíquota de 10 μL (10^4 células) de cada suspensão foi adicionada a 3 mL dos seguintes meios: meio *Candida* (controle) e meio *Candida* suplementado com 0,2% de BSA ou 0,2% de hemoglobina (situação teste). As culturas foram incubadas a 37° C em 180 rpm por 24 horas e alíquotas de 100 μL foram retiradas para a extração do RNA total utilizando-se o kit “TRIZOL[®] LS Reagent” (Invitrogen) e DNaseI (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante.

Todos os isolados, em cada uma das condições descritas, foram simultaneamente submetidos a uma única PCR em tempo real para avaliação dos genes *SAPTs*. Dois experimentos biológicos independentes foram realizados.

Síntese de DNA complementar (DNAc)

A transcrição reversa foi realizada em termociclador Eppendorf, Mastercycler gradient a partir do RNA total, utilizando Oligo dT (Invitrogen) e as enzimas M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) e RNaseOUT (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa, foram realizadas 3 reações distintas de síntese de cDNA para cada experimento, cujo produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada um dos 15 isolados em suas respectivas condições de cultivo.

PCR em tempo real

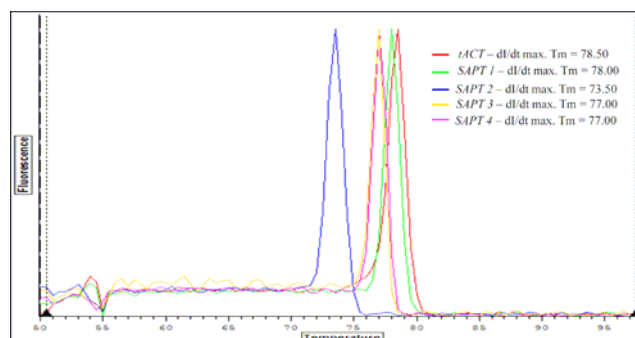
Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Tabela 1) foram desenhados empregando o software Gene Runner 3.05 ([HTTP://WWW.generunner.com](http://www.generunner.com)). As seqüências

dos genes alvo da família *SAP* de *C. tropicalis* foram obtidas a partir de regiões específicas de cada gene *SAPT* descritas e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) por Zaugg e colaboradores⁵. Todos os 5 pares de oligonucleotídeos referentes aos genes *SAPT1-4* e ao gene da β -Actina (*housekeeping gene*) foram desenhados com temperatura de melting (T_m) entre 58°C e 60°C e de forma que seus produtos de amplificação fossem de 110 e 160 pares de bases, visto que diferenças de tamanho de amplicons podem interferir nas análises quando empregado o sistema SYBR Green. Nenhum oligonucleotídeo apresentou, quando analisado com ele mesmo e seu par, *hairpin loops*, dímeros, *bulge loops* ou *internal loops* de acordo com a análise do programa. A especificidade de cada oligonucleotídeo foi avaliada com o auxílio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e posteriormente pela análise da curva de fusão (*melting curve*) de cada produto de amplificação (Figura 1). Os dados referentes à expressão dos genes *SAPT1-4* e *tACT* foram obtidos pelo emprego da técnica de PCR em tempo real, com a utilização do sistema detector de fluorescência Chromo 4™ Four-Color Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., EUA), acoplado ao termociclador PTC-200 (*MJ Research*). Para tal, foi utilizado o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UGG (Invitrogen Inc. EUA), seguindo as instruções do fabricante, utilizando como molde 6µl de uma diluição 1:20 do produto de DNAc de cada isolado em suas respectivas condições de cultivo. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 50°C por 2 minutos; 96°C por 5 minutos; 40 repetições de um ciclo de 94°C (desnaturação), 58°C (anelamento) e 72°C (extensão), por um período de 30 segundos em cada temperatura, e uma extensão adicional final de 72°C por 2 minutos. A especificidade da amplificação foi avaliada para cada amostra assegurando que apenas o produto de interesse tenha sido amplificado em cada reação, através da curva de fusão (*melting curve*), variando-se a temperatura de 50 °C a 98 °C em 0,5 °C/2 segundos. Os dados foram previamente analisados através do MJ Opticon Monitor™ Analysis Software (*MJ Research*) para determinação do CP (*crossing point*) de cada reação e suas respectivas eficiências de amplificação. Para determinação da expressão relativa dos genes *SAPTs* nas diferentes condições de cultivo avaliadas foi utilizado programa REST (Relative expression software tool), desenvolvido por Pfaffl²⁵, baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real²⁶. Os valores obtidos na situação controle (ausência de substrato) foram utilizados como referência para normalização.

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores correspondentes aos quatro genes *SAP* (*SAPT1-4*) e ao gene da β -Actina (*tACT*) de *Candida tropicalis* utilizados nas análises de RT-PCR em tempo real.

oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto amplificado
<i>SAPT1</i>		
Forward	GAAGAAACAAGGTATCATCAAC	130 pb
Reverse	AGGTAAAGCAGTCAAAGTCC	
<i>SAPT2</i>		
Forward	AGTAAGGCGATAGACAATAAC	116 pb
Reverse	CTGGTGAATAAATAGCGGATA	
<i>SAPT3</i>		
Forward	CGGACAATCTCAATGCTACT	145 pb
Reverse	TCACGGAATACCAAATCTGC	
<i>SAPT4</i>		
Forward	TTGTAGAAATCGTGGTTGGG	153 pb
Reverse	AAATCCGTCATAGTGTAAGTG	
<i>tACT</i>		
Forward	AACCTCTTCTCAATCATCTGC	129 pb
Reverse	GCTTCCAAACCTAAATCGGC	

Figura 1 – Curva de fusão (*melting curve*) dos amplicons referentes aos genes *SAP* (*SAPT1-4*) e ao gene da β -Actina (*tACT*) de *Candida tropicalis* empregados neste estudo. A ocorrência de um único pico de fusão para cada gene indica amplificação específica e ausência de dímeros de oligonucleotídeos.



Análises estatísticas

O programa REST25 foi utilizado para avaliar quais genes *SAPTs* apresentaram expressão diferencial (indução significativa). Foram considerados diferencialmente expressos pelo programa os genes cuja indução foi significativamente diferente ($p=0,001$) quando cultivados em presença de BSA ou hemoglobina em relação à situação controle (ausência de substrato). Para verificar a existência de diferenças significativas na expressão diferencial dos genes *SAPTs* entre os diferentes sítios anatômicos de isolamento e entre os diferentes isolados, utilizou-se o teste *t Student* (BioStat software) e o teste de Tukey (SISVAR software), respectivamente.

Resultados e discussão

Todos os isolados clínicos de *C. tropicalis* avaliados possuem os genes *SAPTs* (*SAPT1-4*) (dados não mostrados). As condições de cultivo testadas proporcionaram a expressão diferencial (indução significativa) ($p=0,001$) dos genes *SAPT1*, *SAPT2* e *SAPT3* em relação à situação controle (ausência de substrato), que variaram qualitativa e quantitativamente em função do substrato protéico utilizado e dos diferentes isolados. Não foi evidenciada a expressão diferencial do gene *SAPT4* em nenhum dos 15 isolados nas condições testadas (Tabela 2, Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Expressão diferencial dos genes *SAPTs* (proteases aspárticas secretadas) por isolados clínicos de *Candida tropicalis* após 24 horas de cultivo em presença de soro albumina bovino (BSA) como fonte de nitrogênio. *Expressão diferencial de *SAPT3* significativamente superior ($p<0,05$) do isolado 182.06 em relação ao isolado 138.06. As unidades de medidas do eixo vertical representam a proporção (X) de cada expressão diferencial.

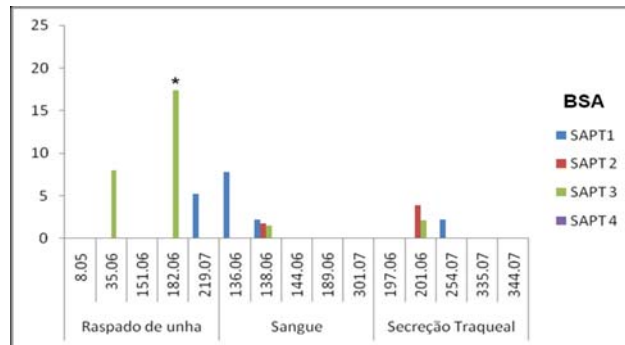
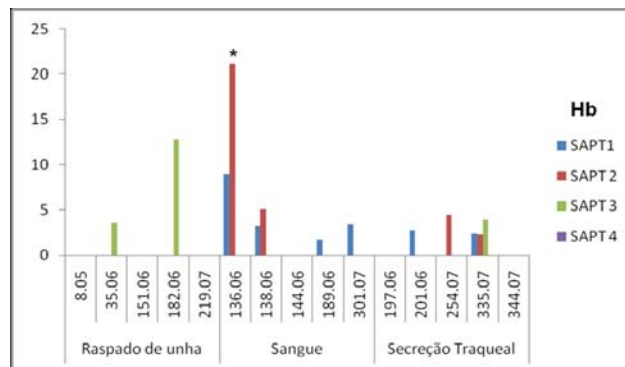


Figura 3 – Expressão diferencial dos genes *SAPTs* (proteases aspárticas secretadas) por isolados clínicos de *C. tropicalis* após 24 horas de cultivo em presença de hemoglobina como fonte de nitrogênio. *Expressão diferencial de *SAPT2* significativamente superior ($p<0,001$) do isolado 136.06 em relação aos demais isolados. As unidades de medidas do eixo vertical representam a proporção (X) de cada expressão diferencial.



Em meio de cultivo suplementado com BSA foi observada indução significativa ($p=0,001$) de pelo menos um dos genes *SAPT* em 46,5% dos isolados analisados (Figura 2). Os demais isolados não apresentaram diferenças significativas de expressão dos genes *SAPT* quando comparados com a situação controle. Apenas 02 isolados apresentaram induções significativas de mais de um gene *SAPT* concomitantemente, o isolado 138.06 com a expressão dos genes *SAPT1*, *SAPT2* e *SAPT3* e o isolado 201.06 com expressão dos genes *SAPT2* e *SAPT3*.

Em meio de cultivo suplementado com hemoglobina foi observada indução significativa ($p=0,001$) de pelo menos um dos genes *SAPT* em 60% dos isolados analisados (Figura 3). Destes, 03 isolados apresentaram induções significativas de mais de um gene

SAPT concomitantemente, os isolados 136.06 e 138.06 com a expressão diferencial dos genes *SAPT1* e *SAPT2* e o isolado 335.07 com a expressão dos genes *SAPT1*, *SAPT2* e *SAPT3*.

Pode-se observar que *SAPT1* foi o gene cuja expressão diferencial foi mais freqüente, sendo induzido significativamente em 10 casos dos 30 possíveis.

Dos isolados testados, apenas os isolados 136.06 e 138.06 (obtidos de sangue) e os isolados 201.06, 254.07 e 335.07 (obtidos de secreção traqueal) apresentaram indução significativa ($p=0,001$) do gene *SAPT2*. Nenhum dos representantes de isolados de infecções superficiais (raspado de unha) apresentou expressão diferencial do gene *SAPT2*, tanto quando cultivados em meio suplementado com BSA quanto em meio suplementado com hemoglobina.

Somente dois isolados 35.06 e 182.06 (obtidos de raspado de unha) apresentaram o mesmo perfil de indução, tanto em meio suplementado com BSA quanto em meio com hemoglobina, com expressão diferencial ($p=0,001$) para o gene *SAPT3*. Os demais isolados apresentaram perfis distintos de expressão diferencial. O isolado 219.07 (raspado de unha) expressou diferencialmente o gene *SAPT1* apenas quando cultivado em meio suplementado com BSA, sendo que em meio com hemoglobina não foi constatada expressão diferencial de nenhum gene *SAPT*. Já os isolados 189.06, 301.07 e 335.07 apresentaram expressão diferencial do gene *SAPT1* apenas quando cultivados em meio suplementado com hemoglobina, com a expressão adicional dos genes *SAPT2* e *SAPT3* pelo isolado 335.07. Em meio com BSA não houve expressão diferencial de nenhum gene *SAPT* para estes isolados.

O isolado 136.06 apresentou expressão diferencial ($p=0,001$) do gene *SAPT1* em ambos os substratos de cultivo utilizados. Entretanto, houve a indução significativa do gene *SAPT2* apenas quando cultivado em meio suplementado com hemoglobina. O isolado 138.06 manteve o perfil de expressão diferencial dos genes *SAPT1* e *SAPT2* em ambas as condições testadas, embora o gene *SAPT3* tenha sido induzido somente em presença de hemoglobina.

O isolado 201.06 apresentou expressão diferencial ($p=0,001$) dos genes *SAPT2* e *SAPT3* em presença de BSA. Já, em meio suplementado com hemoglobina somente o gene *SAPT1* foi expresso diferencialmente. Para o isolado 254.07 foi observado um padrão de expressão inversa, onde os genes *SAPT1* e *SAPT2* foram diferencialmente expressos em presença de BSA e hemoglobina, respectivamente.

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) na expressão diferencial dos genes *SAPTs* em relação aos sítios anatômicos de isolamento, para as duas condições de cultivo avaliadas (BSA e Hb). Da mesma forma, não foram encontradas

diferenças significativas ($p > 0,05$) na expressão diferencial dos genes *SAPT*s entre os isolados do mesmo sítio de isolamento quando cultivados em meio suplementado com BSA. No entanto, em meio suplementado com hemoglobina, houve diferença significativa na expressão do gene *SAPT2* entre os isolados de infecções sanguíneas 136.06 e 138.06 ($p < 0,05$), sendo a maior expressão observada para o isolado 136.06, que também diferiu significativamente dos isolados dos demais sítios anatômicos ($p < 0,001$). Além disso, a expressão diferencial do gene *SAPT2* pelo isolado 136.06 foi significativamente superior ($p < 0,001$) quando cultivado em presença de hemoglobina comparativamente ao observado no cultivo em BSA.

Foi observada também a indução significativamente maior ($p < 0,05$) da expressão do gene *SAPT3* do isolado 182.06 em relação ao isolado 138.06 quando cultivados em BSA.

Desta forma, é possível observar que a expressão diferencial de genes *SAPT* pelos diferentes isolados foi mais evidente em presença de hemoglobina comparativamente ao obtido em presença de BSA nas condições de cultivo analisadas.

Até o momento, a expressão diferencial, *in vitro*, de genes da família *SAPT* foi demonstrada somente para o gene *SAPT1* pela metodologia de RT-PCR (Zaugg e colaboradores)⁵. Estes autores utilizaram dois meios de cultivo distintos, YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) suplementado com 0,2 % de BSA e meio Lee modificado contendo 5% de soro fetal bovino.

No presente estudo, as condições de cultivo foram distintas no que se refere à composição do meio de cultivo (meio *Candida*), que não apresenta peptona como o meio YPD e nem suplementação com aminoácidos como o meio Lee modificado. Além disso, a concentração de extrato de levedura no meio *Candida* é 10 vezes inferior ao do meio YPD. Outra diferença foi a temperatura de incubação a 37°C, diferentemente do empregado por Zaugg e colaboradores⁵, além do sincronismo do cultivo. Sabe-se que microrganismos, particularmente leveduras, são capazes de mudar rapidamente seu perfil transcricional em resposta às mais sutis variações do meio em que se encontram e, principalmente, em função de seu estado metabólico²⁷⁻³². As condições de cultivo testadas propiciaram a avaliação da expressão diferencial dos genes *SAPT2* e *SAPT3* por isolados clínicos de *C. tropicalis*, diferentemente do observado por Zaugg et al. (2001)⁵.

Outro fato que sustenta as afirmações anteriores são as diferenças de redundância e posição de sítios de ligação de fatores de transcrição existentes entre as diferentes *SAPs*, relacionados à indução e repressão de genes glicolíticos e de genes induzidos por nitrogênio. Basicamente, as regiões regulatórias (*upstream regions*) da maioria dos genes

SAPs, descritos até o momento, são qualitativa e quantitativamente diferentes, o que explica a ampla variação de atividade em resposta a diferentes substratos, além de outros fatores de transcrição envolvidos na regulação de outros genes^{10,33}. É relatada também a participação indireta de outros genes no processo de regulação da atividade proteolítica das *Saps*³⁴.

Além disso, estas diferenças podem estar relacionadas aos isolados empregados em cada estudo, visto que os isolados 08.05, 151.06, 144.06, 197.06 e 344.07, distribuídos aleatoriamente entre os diferentes sítios de isolamento, não apresentaram expressão diferencial de nenhum gene *SAPT*, tanto quando cultivados em presença de BSA quanto de hemoglobina, e que 4 isolados apresentaram expressão diferencial apenas do gene *SAPT1* quando cultivado com o substrato BSA, condição numericamente próxima à utilizada por Zaugg e colaboradores⁵. Este fato reforça que expressão de genes *SAPT* por *C. tropicalis* parece ser linhagem-dependente, não estando relacionada ao sítio de isolamento.

Silva e colaboradores³⁵, avaliaram o papel das *SAPT1-4* de *C. tropicalis* na infecção epitelial, utilizando o modelo de epitélio oral humano reconstituído (RHOE). Segundo estes autores, a expressão destes genes foi linhagem-dependente sendo que não foi observada indução significativa destes genes em presença de RHOE (situação teste) quando comparado a situação controle (ausência de RHOE), sugerindo o limitado papel das *SAPTs* neste modelo de infecção. Diferentemente, Henrique e colaboradores³⁶ observaram a expressão diferencial de genes *SAP* por isolados de *C. parapsilosis* empregando o mesmo modelo de infecção (RHOE). Estes autores observaram que a expressão dos genes *SAPs* é dependente da linhagem de *C. parapsilosis*.

Em nosso estudo, assim como no de Silva e colaboradores³⁵, também foi observada uma ampla variedade de perfis de expressão dos genes da família *SAPT* em relação ao gene *tACT* nas 3 condições de cultivo analisadas (dados não mostrados). Entretanto, quando aplicado o modelo de quantificação descrito por Pfaffl^{25,26} que considera a expressão dos genes na situação controle e na situação teste, nem todos os isolados apresentaram expressão diferencial significativa, como já discutido.

Muitos estudos de expressão de genes *SAPs* por *C. albicans* evidenciaram a ocorrência de variação nos perfis de expressão destes genes em resposta a diferentes condições a qual são submetidas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*^{34,37-39}. Por exemplo, a expressão dos genes *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP7* e *SAP8* está correlacionada a infecção de epitélio oral, enquanto a expressão dos genes *SAP1*, *SAP3* e *SAP6-8* a infecções de epitélio vaginal³⁴.

Diferenças nos padrões de expressão dos genes *SAPs* de *C. dubliniensis* em resposta a diferentes condições experimentais também foram evidenciadas por Loaiza-Loeza

e colaboradores⁴². Segundo esses autores, os genes *SAPs* foram mais expressos em presença de BSA comparativamente a outras fontes de nitrogênio. Os autores relatam também diferenças de expressão diferencial (indução ou repressão) entre os genes *SAPs* em relação ao estágio de crescimento populacional (fase logarítmica, exponencial e exponencial tardia), diferentes pHs de cultivo e estados morfológicos. Além disso, somente os genes *SAP3* e *SAP4* de *C. dubliniensis* foram expressos em modelo *in vivo* de infecção.

Desta forma, pode-se constatar a existência de distintos padrões de expressão dos genes *SAPs* nas espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, tanto em hospedeiros, variando de acordo com a necessidade do fungo no decorrer da infecção, quanto em diferentes condições *in vitro*. As diferenças promovidas por linhagens fúngicas distintas devem ser consideradas, assim como as diferenças metodológicas, que muitas vezes influenciam e limitam a comparação de resultados entre diferentes estudos³⁴⁻⁴².

A grande variabilidade genética existente entre espécies patogênicas de *Candida* torna necessária a caracterização da expressão diferencial de genes relacionados a fatores de virulência referentes a cada espécie individualmente. Estudos filogenéticos demonstraram que os genes *SAPTs* de *C. tropicalis* não formam subgrupos, tais como *SAP1-3* e *SAP4-6* de *C. albicans*. Em dendrogramas, estes genes ocorrem em ramos distintos com similaridade inferior a 63% entre si¹⁰. Entretanto, *SAPT1* e *SAPT4* aparecem agrupados aos genes *SAP8* e *SAP1* de *C. albicans*, respectivamente, quando comparados filogeneticamente. Com base em percentual de similitude, sintenia e análises filogenéticas, sugere-se que o gene *SAPT4* seja ortólogo do gene *SAP1* de *C. albicans*^{5,10}.

Em síntese, no presente estudo, foi verificada pela primeira vez a expressão diferencial *in vitro* dos genes da família *SAPT*, particularmente, *SAPT2* e *SAPT3* em isolados de *C. tropicalis* com o auxílio da metodologia de RT-PCR em tempo real. Condições que proporcionem a expressão diferencial do gene *SAPT4* ainda precisam ser avaliadas e, baseado nos estudos comparativos expostos anteriormente, o parâmetro tempo de cultivo aparenta ser um ótimo fator a ser analisado em estudos futuros. Este estudo é mais uma etapa para a caracterização do perfil transcricional dos genes *SAPT*, e muito ainda precisa ser elucidado, visto que comparações entre *SAPs* de diferentes espécies não é recomendado.

Referências

1. Haynes, K. Virulence in *Candida* species. *TRENDS Microbiol* 2001, 9:591-596, 2001.
2. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005, 48:365-377.
3. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper SJ, Williams DW. Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci* 2009, 117:669-675.
4. Loaiza-Loeza S, Parra-Ortega B, Cancino-Díaz JC, Illades-Aguiar B, Hernández-Rodríguez CH, Villa-Tanaca L. Differential expression of *Candida dubliniensis*-secreted aspartyl proteinase genes (CdSAP1-4) under different physiological conditions and during infection of a keratinocyte culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, 56:212-222.
5. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 2001; 69:405-412.
6. Park H, Liu Y, Solis N, Spotkov J, Hamaker J, Jill R. Blankenship JR, Yeaman MR, Mitchell AP, Liu H, Filler SG. Transcriptional Responses of *Candida albicans* to Epithelial and Endothelial Cells. *Eukaryot Cell* 2009, 8:1498-1510.
7. Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2004, 7:336-341.
8. Kumamoto CA. Niche-specific gene expression during *Candida albicans* infection. *Curr Opin Microbiol* 2008, 11:325-330.
9. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* 2008, 154:3266–3280.
10. Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104:505-512.
11. Kothavade RJ, Kura, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol* 2010, 59:873–880.
12. Pfaller MA, Diekema, DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20: 133-163.
13. Falagas ME, Roussos N, Vardakas Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010, doi:10.1016/ j.ijid.2010.04.006

14. Colombo AL, Nucci M, Park B J, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006, 44:2816-2823.
15. Xess I, Jain N, Hasan F, Mandal P, Banerjee U. Epidemiology of candidemia in a tertiary care center of North India: 5-Year Study. *Infection* 2007, 35:256-259.
16. Kalkanci A, Berk B, Aykan B, Caglar K, Hizel K, Arman D, Kustimur S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from hospitalized patients. *J Mycol Med* 2007, 17:16-20.
17. Al-Tawfiq JA. Distribution and epidemiology of *Candida* species causing fungemia at a Saudi Arabian hospital, 1996—2004. *Int J Infect Dis* 2007, 11:239-244.
18. França JCB, Ribeiro CEL, Queiroz-Telles F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008, 41:23-28.
19. Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, 58:77-82.
20. Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Rêgo L, Lira C, Almeida L, Martins M, Araújo C, Duarte M, Lopes G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. *Braz J Microbiol* 2009, 40:325-328.
21. Tan TY, Tan AL, Tee NWS, Ng LSY, Chee CWJ. The increased role of non-albicans species in candidaemia: results from a 3-year surveillance study. *Mycoses* 2010, 53:515-521.
22. Kim TH, Lee YS, Lee MK, Lee KM. Species distribution and susceptibilities to azoles of *Candida* species including *C. tropicalis* in a tertiary burn center. *Korean J Clin Microbiol* 2010, 13(2):79-84.
23. Pereira, GH, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MSC. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Med Mycol* 2010, 48:839-842.
24. Li YL, Leaw SN, Chen J-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. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:693-696.
25. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002, 30(9):e36.
26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:2002-2007.

27. Biswas S, Dick PV, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Ver* 2007, 71:348-376.
28. Côte P, Hogues H, Whiteway M. Transcriptional analysis of the *Candida albicans* cell cycle. *Mol Biol Cell* 2009, 20:3363-3373.
29. Brock M. Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol* 2009, 12:371–376.
30. Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 2005, 8:378–384.
31. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 2009, 55:497-509.
32. Fradin C, Hube B. Transcriptional profiling of *Candida albicans* in human blood. *Microbe* 2006, 1:76-80.
33. Eckert SE, Mühlshlegel FA. Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. *FEMS Yeast Res* 2009, 9:2-15.
34. Brown AJP, Odds FC, Gow NAR. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2007, 10:307-313.
35. Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17:264-272.
36. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper SJ, Williams DW. Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an *in vitro* reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci* 2009, 117:669-675.
37. Kumamoto CA. Niche-specific gene expression during *Candida albicans* infection. *Curr Opin Microbiol*. 2008, 11:325-330.
38. Taylor BN, Staib P, Binder A, Biesecker A, Sehna M, Rölinghoff M, Morschhäuser J, Schröppel K. Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. *Infect Immun* 2005, 73:1828-1835.
39. Lian CH, Liu WD. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. *Mycoses* 2007, 50:383-390.

CONCLUSÕES'

- Espécies de *Candida* não-*albicans* estão mais frequentemente isoladas que *C. albicans* em isolados clínicos de candidúria provenientes de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR;

- Há relações clínicas significativas entre as contagens de UFC mL⁻¹ de urina e a distribuição das espécies de *Candida*;

- Há relações clínicas significativas entre o grau de acometimento do paciente (nº de fatores de risco) e as contagens de UFC mL⁻¹ de urina;

- Há relações clínicas significativas de certas combinações de fatores predisponentes com a distribuição das espécies de *Candida*;

- A classificação das contagens de UFC mL⁻¹ de urina em níveis (1, 2 e 3), aliado aos fatores clínicos e predisponentes dos pacientes podem servir de prognóstico para orientação de terapias antifúngicas mais adequadas, tanto para o tratamento da candidúria, caso necessário, quanto para a profilaxia de infecções invasivas e candidemias;

- A metodologia de MEV permitiu a observação de diferenças quanto à capacidade de adesão, produção de matriz extracelular e formação de biofilme entre os morfotipos de *C. parapsilosis* em resposta aos substratos utilizados;

- Pela primeira vez, as condições de cultivo empregadas para a avaliação da expressão dos genes *SAPT* de *C. tropicalis* pela técnica de PCR em tempo real proporcionaram a indução significativa dos genes *SAPT2* e *SAPT3* em relação à situação controle em isolados de *C. tropicalis*;

- A expressão diferencial dos genes *SAPTs* dos isolados clínicos de *C. tropicalis* analisados no estudo se mostrou ser linhagem-dependente nas condições de cultivo analisadas.