

Candidemia em Unidades de Terapia Intensiva: Diagnóstico e avaliação da capacidade de aderência e formação de biofilme

Couto F.M.M.¹, Andrade S.L.², Buonafina M.D.S.¹, Leal A.F.G.¹, Magalhães O.M.C.¹, Vasconcelos F.M.T.S.¹, Santos F.A.G.¹, Neves R.P.¹.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, ²Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM. Email: fabiolabiologa@hotmail.com

Resumo

Candidemia é a infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. A capacidade de *Candida* em aderir às células hospedeiras, infectar e causar doença é dita como potencial fenômeno de virulência sendo aderência, o evento inicial na patogênese, assim como formação de biofilmes, que podem provocar resistência terapêutica. Neste estudo foram avaliados pacientes em setores de cuidados intensivos quanto a ocorrência de candidemia e cepas de *Candida* foram testadas quanto à capacidade de adesão e formação de biofilme. Foram obtidos 11 isolados de *Candida* distribuídos entre as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Todas apresentaram capacidade de aderir-se com intensidades forte e fraca, formando biofilmes de moderado a fraco. Pode-se ressaltar que a epidemiologia fornece relevantes informações sobre incidência de agentes etiológicos. Outrossim, testes de virulência como aderência e formação de biofilme, proporciona o conhecimento do grau patogênico do agente infeccioso e condução de uma terapêutica direcionada.

Palavras-chaves: *Candida*, Candidemia, Aderência, Biofilme

Introdução

O número de casos de infecções fúngicas invasivas tem aumentado substancialmente na América Latina e no mundo, estando esse elevado número relacionado a fatores que tornam os pacientes susceptíveis a tais infecções, destacando-se as causadas por leveduras (Garnacho-Montero *et al.*, 2012).

A severidade da doença de base comumente conduz à internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) por vezes associado a um tempo prolongado, bem como uso de procedimentos invasivos. Neste sentido, as levedurosas assumem um papel de destaque como causa de infecções endógenas e exógenas por consequência da

diminuição na imunidade humoral e celular, exposição a procedimentos invasivos que medeiam a quebra das barreiras de defesas naturais, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de imunossuppressores, tempo prolongado de permanência hospitalar e outras condições que favorecem essas micoses (Monteiro *et al.*, 2011).

Nas leveduroses, espécies de *Candida* são predominantes tendo atualmente conduzido a diversos quadros clínicos, desde superficiais a invasivos, a exemplo das infecções da corrente sanguínea, sendo causa de morbidade e em muitos casos, mortalidade Garnacho-Montero *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013).

A capacidade destas leveduras, agentes etiológicos de candidemia, em se aderir às células do hospedeiro, infectar e causar doença é definida como potencial de virulência, sendo o evento inicial na patogênese destas infecções. Outra condição que facilita o estabelecimento de infecções invasivas é a formação de biofilmes, os quais são agregados celulares embebidos por uma matriz polimérica extracelular que confere elevada resistência terapêutica (Lacaz *et al.*, 2002).

Este estudo fundamenta-se em pesquisas que busquem indicar a epidemiologia para casos de candidemia em UTIs e fatores de virulência relacionados.

Material e Métodos

Coleta de amostras clínicas e obtenção dos isolados de Candida spp.

Coletas foram realizadas em pacientes internados em UTI de Hospitais do Recife-PE após aprovação pelo comitê de ética da UFPE. Amostras de sangue venoso foram coletadas, por punção e adicionadas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) para diagnóstico laboratorial micológico. Estes foram acondicionados por 72 horas a 37°C e após turvação, alíquotas foram transferidas para placas contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar (DIFCO) e mantidas em até 15 dias.

Após o surgimento das colônias estas foram identificadas através da taxonomia clássica e confirmadas pelo método automatizado, baseados nas características morfofisiológicas (Barnett, 2000).

Realização de testes de patogenicidade

Para análise da capacidade de aderência, células epiteliais foram obtidas da cavidade bucal de hospedeiro jovem livre de caries, com previa higienização oral, e mantidas em banho de gelo. Em todas as etapas sobre testes de aderência foi utilizado o tampão fosfato (PBS). Os isolados de *Candida* foram semeados no meio ágar

Sabouraud com de 0,5% extrato de levedura. Após 72h, as leveduras foram suspensas em 2ml de PBS contidos em tubos, centrifugadas três vezes a 1.580 rpm por 10 minutos e re-suspendidas para uma concentração final de 2×10^7 cels/mL. As células de leveduras e as epiteliais foram homogeneizadas e agitadas durante duas horas.

Posteriormente, foram montadas lâminas com azul de metileno e realizada a microscopia. Os resultados foram expressos pela média aritmética e de acordo com a quantidade de leveduras aderidas foram interpretados como forte aderência (F), fraca aderência (f) e sem aderência visível (0).

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada com uma suspensão salina dos isolados de *Candida* com concentração final de 10^6 UFC/mL. 20µl foram inoculados em 180µl de ágar Sabouraud líquido contido em microplacas, mantidas a 35°C por 24h. O conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada, colocando safranina para avaliação de acordo com a intensidade da coloração, interpretando como fraca coloração (1+); coloração mediana (2+ e 3+) e fortemente corados (4+), representados como fraca, mediana e forte formação de biofilme.

Resultados

Foram acompanhados 1.462 pacientes internados nas UTIs dos hospitais públicos Agamenon Magalhães e Getúlio Vargas, ambos localizados na cidade do Recife, PE. Destes, foram obtidas 1.275 amostras de sangue, das quais o diagnóstico de candidemia foi conclusivo em 11 casos.

Com base na avaliação clínica, todos pacientes com suspeita de candidemia apresentaram estados febris. Vômitos, diarreia e problemas respiratórios também foram sintomas diagnosticados em nossa pesquisa.

Quanto às doenças de base dos que apresentaram a infecção, as de origem cardiovascular, diabetes mellitus, doenças hepáticas e neoplasias até o momento foram as mais incidentes. Entre as condições de risco associadas, as mais frequentes foram idade avançada, uso de terapia profilática com antifúngicos, antibioticoterapia e corticoidoterapia por longo período, nutrição parenteral e transplantes.

Nas etapas de diagnóstico laboratorial micológico foram isoladas culturas de leveduras com coloração de branca a creme, superfície de textura lisa e bordos regulares e irregulares.

O método de taxonomia clássica permitiu a identificação dos agentes etiológicos em nível de espécie, assim como o sistema automatizado Vitek-2 (Vitek Systems Inc., Hazelwood, Mo, EUA).

Dos casos de candidemia diagnosticados quatro corresponderam a espécie *C. albicans*, três *C. parapsilosis*, duas *C. guilliermondii* e uma *C. tropicalis* (Tabela 1). Os 11 isolados de *Candida* foram analisados quanto a capacidade de aderência às células epiteliais, importante evento caracterizado como inicial para determinar a patogenicidade das cepas, sendo demonstrado de forma diversificada nesta pesquisa.

Tabela 1. Capacidade de aderência e formação de biofilme por isolados de *Candida* obtidos do sangue de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva.

Número de registro	Espécie	Capacidade de aderência	Formação de biofilme
12199	<i>Candida albicans</i>	F	3+
8338	<i>C. albicans</i>	f	1+
12680	<i>C. albicans</i>	F	1+
121	<i>C. albicans</i>	f	2+
1302092	<i>C. albicans</i>	f	1+
633	<i>C. guilliermondii</i>	f	1+
772	<i>C. guilliermondii</i>	F	3+
13477	<i>C. parapsilosis</i>	f	2+
5551	<i>C. parapsilosis</i>	F	1+
13531	<i>C. parapsilosis</i>	f	1+
269	<i>C. tropicalis</i>	f	3+

F: Forte aderência, f: fraca aderência; 1+: fraca formação, 2+ e 3+: moderada formação.

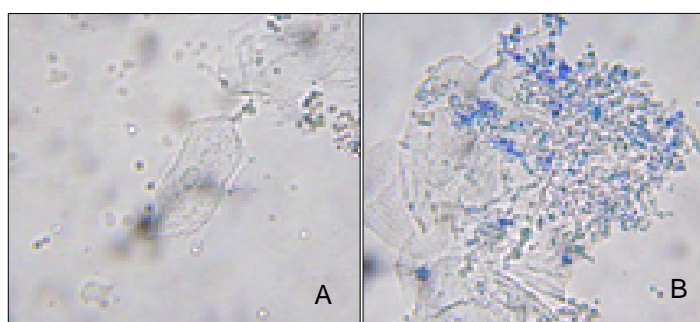


Figura 1. Células de leveduras do gênero *Candida* sp. aderidas às células do epitélio bucal. A) Fraca aderência; B) Forte aderência.

Nossos resultados apontaram forte e fraca capacidade de adesão às células epiteliais (Figura 1). Nenhum dos isolados de *Candida* avaliados apresentou incapacidade de aderir-se às células epiteliais. Todos os isolados mostraram capacidade de formação de biofilme; porém, de moderado a fraco (Figura 2). Uma cepa de *C.*

albicans (12199) e uma de *C. guiliermondii* (772) foram destaques com maiores capacidades de adesão e formação de biofilme, ou seja, maior grau de virulência.

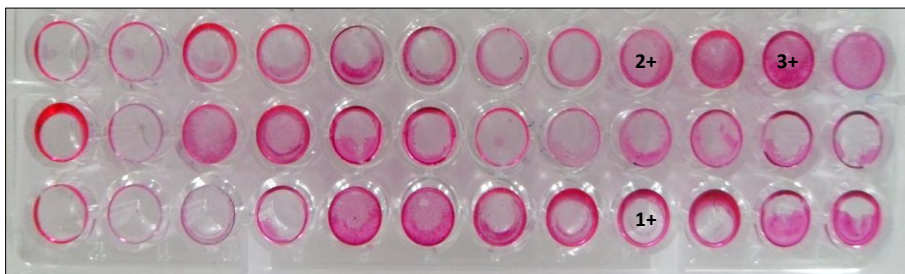


Figura 2. Placa de micro diluição demonstrando a intensidade da formação de biofilme pelos isolados de *Candida* sp. obtidas de amostras de sangue de pacientes com candidemia. 1+ (fraco); 2+ e 3+ (moderado)

Discussão

Durante as duas últimas décadas, tem ocorrido mudança no perfil epidemiológico das espécies de *Candida* isoladas em UTI. Recentemente, uma proporção crescente de episódios de candidemia tem sido causada por espécies de *Candida* não *albicans*, dado este que reflete em uma mudança epidemiológica importante (Chow et al., 2008). Contudo, *C. albicans* continua a ser a espécie predominante na maioria dos países (Calandra e Marchetti, 2002) isolada em infecções invasivas de diferentes sítios anatômicos (Leroy et al., 2009), estando também, esse dado, verificado em nossa pesquisa.

Com base no diagnóstico clínico, este é inespecífico sendo a febre o sinal mais comum, o que torna o diagnóstico de candidemia um desafio (Couto et al., 2011).

Frequentes estudos tem demonstrado importância em se investigar fatores de virulência de agentes patogênicos, sobretudo as leveduras do gênero *Candida* responsáveis por candidemia, para estabelecer estratégias de prevenção, controle e tratamento eficaz. Resultados obtidos por Tamura et al. (2007), também inferiram alto poder de aderência para isolados de *C. albicans*, conforme nossos resultados. Segundo os autores é consenso que a maior parte das candidemias seja precedida pelo evento de colonização do próprio paciente pela mesma espécie de levedura responsável pela infecção.

Biofilmes de *Candida* são difíceis de erradicar, especialmente devido a sua alta resistência a alguns antifúngicos. Consequentemente, investigações sobre a

patogenicidade de *Candida* têm sido foco na prevenção e gestão de desenvolvimento de biofilme, sua arquitetura, e resistência (Seneviratne et al., 2008). Kuhn et al. (2002), ao comparar os biofilmes formados por diferentes espécies de *Candida*, observaram que *C. albicans* produziu biofilmes mais fortes que as espécies de *Candida* não *albicans*. Contudo, conforme nossos achados, outros autores relatam que isolados de *Candida* oriundos de sangue apresentam, normalmente, biofilmes mais fracos.

Neste estudo foi observado que duas cepas se destacaram quanto a capacidade de melhor aderir-se e formar biofilme. Estes isolados podem possuir uma melhor capacidade de infecção assim como, possuir maior barreira e resistência às terapias antifúngicas devido a estes fatores. Podemos ainda salientar que todos os isolados capazes de realizar adesão às células epiteliais também apresentaram capacidade de formar biofilmes, podendo estas condições estarem correlacionadas, contudo, outros estudos precisam ser realizados para consolidar estas afirmações.

Conclusões

Espécies de *C. albicans* continuam a ser predominantes para casos de candidemia, contudo espécies não *albicans*, como *C. parapsilosis* tem também predominado.

Fatores de virulência como aderência a células epiteliais e formação de biofilme são de suma importância para avaliar o poder patogênico do agente no curso da infecção e conduzir a uma terapêutica melhor direcionada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, FACEPE, PROPESQ/UFPE pelo fomento necessário à realização das etapas inerentes a esta pesquisa.

Referências

Barnett JÁ, Payne RW, Yarrow D (2000) Yeasts: characteristics and identification. Third edition.

Calandra T, Marchetti, O (2002) Antifungal prophylaxis for intensive care unit patients: let's fine tune it. Intens Care Medic. 28.12.

Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, Karchmer AW, Carmeli Y, Lichtenberg D (2008) Factors associated with candidemia caused by non *Candida albicans* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. Clin. Infect. Dis. 46:1206-1213.

Couto FMM, Macedo DPC, Neves RP (2011) Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44 (6):745-748.

Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, Márquez-Vácaro JA (2012) Management of Invasive Candidiasis in the Critically III. Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine. 324-336.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA (2002) Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother. 46(6), 1773-1780.

Lacaz, C. S., et al. 2002. Tratado de Micologia Médica, 9 ed., São Paulo, Sarvier.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Lortholary O (2009) Epidemiology management and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter prospective observational study in France (2005-2006). Crit Care Med. 37:1612-1618.

Monteiro DU, de Brum TF, Bolson C, de Oliveira, LTO, de La Rue ML (2011) Prevalência de *Candida* e *Cryptococcus* em hemoculturas oriundas de pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria, RS (HUSM) no ano de 2006. R Saúde (Santa Maria) Vol. 37, n. 2.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranyake LP (2008) Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis. 14(7):582-590.

Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski, TIE (2007) Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. Rev Soc Bras Med Trop. 40(1):91-93.

Ye XR, Hu BJ, Gao XD, Ma J, Zhou Q, Zhou ZY, Zhou CM (2013) Analysis of clinical characteristics and risk factors associated with prognosis of patients with candidemia. Zhonghua. Oct. 93(40):3193-6.