



Artigo/Article

Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas

Hemolysis produced by *Candida tropicalis* isolates from clinical samples

Emanuele Júlio Galvão de França¹, Daniel Fávero¹, Henrique Scremin¹, Marcelo Tempesta de Oliveira¹, Luciana Furlaneto-Maia², Regina Mariuza Borsato Quesada³ e Márcia Cristina Furlaneto¹

RESUMO

Introdução: Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em humanos. *Candida tropicalis* tem sido uma das mais comumente isoladas dentre as espécies não-*albicans*. O objetivo foi analisar a hemólise *in vitro* promovida por isolados clínicos de *C. tropicalis* provenientes de sangue e outras amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Universitário da UEL, PR-Brasil. **Métodos:** Foi avaliada a hemólise promovida por 28 isolados clínicos de *C. tropicalis*, sendo os isolados agrupados em classes de acordo com os níveis de hemólise. **Resultados:** A maioria dos isolados de sangue apresentou hemólise fraca (+), enquanto as classes de hemólise forte (+++) e muito forte (++++) foram as predominantes nos isolados de outras amostras clínicas como urina, lesão de unha e secreção traqueal, embora não tenham sido detectadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$). **Conclusões:** Isolados de *C. tropicalis*, obtidos de diferentes amostras clínicas, apresentam capacidade de promover hemólise *in vitro*.

Palavras-chaves: *Candida tropicalis*. Hemólise. Amostras clínicas. Sangue.

ABSTRACT

Introduction: Yeasts belonging to the genus *Candida* are responsible for the majority of fungal infections in humans. *Candida tropicalis* has been one of most commonly isolated non-*albicans* species. To analyze *in vitro* hemolysis promoted by clinical isolates of *C. tropicalis* obtained from blood and other clinical samples from hospitalized patients at the University Hospital of Londrina State University, Paraná, Brazil. **Methods:** The hemolysis promoted by 28 clinical isolates of *C. tropicalis* was evaluated, and the isolates were grouped into classes according to the hemolysis levels. **Results:** The majority of the blood isolates showed weak hemolysis (+), while the classes of strong hemolysis (+++) and very strong hemolysis (++++) predominated among isolates from other clinical samples such as urine, nail lesions and tracheal secretions. However, no statistical differences were detected ($p > 0.05$). **Conclusions:** Isolates of *C. tropicalis* obtained from different clinical samples showed a capacity to promote *in vitro* hemolysis.

Key-words: *Candida tropicalis*. Hemolysis. Clinical samples. Blood.

INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* têm sido descritas como os principais patógenos fúngicos em humanos^{1,2}. Embora *Candida albicans* seja a espécie mais amplamente diagnosticada em isolados clínicos, diversos estudos relatam um aumento significativo na frequência de isolados de outras espécies do gênero³. *C. tropicalis* possui particular importância devido ao aumento em seus índices de isolamento. Segundo Pfaller e cols⁴, os índices de isolamento desta espécie em todo o mundo aumentaram 2,9% no período de 1997 a 2003.

No Brasil, estudos realizados em diferentes períodos demonstraram que cerca de 20% dos episódios de candidemia foram causados por *C. tropicalis*^{5,6}, sendo uma das principais espécies responsáveis por este tipo de infecção em hospitais públicos do país⁶⁻⁸. *C. tropicalis* também tem sido amplamente relacionada a episódios de candidúria, sendo a terceira espécie mais frequentemente isolada de culturas de urina⁹⁻¹⁰, além de infecções do trato respiratório¹¹ e de oncomicoses^{12,13}.

A habilidade de um microrganismo em adquirir ferro elementar é fundamental para a sobrevivência e o estabelecimento da infecção¹⁴. Muitos patógenos secretam fatores hemolíticos com o objetivo de obter hemoglobina ou o grupo prostético heme como fontes de ferro, a partir da lise de eritrócitos¹⁵.

Manns e cols¹⁶ foram os primeiros autores a descrever que *C. albicans* é capaz de induzir hemólise em sangue de carneiro. Posteriormente, Watanabe e cols¹⁷⁻¹⁸ demonstraram que o fator hemolítico secretado por *C. albicans* é uma manoproteína que provoca a lise de eritrócitos, em decorrência de sua ligação à proteína Banda 3. Segundo esses autores, a ocorrência de hemólise nos sítios de infecção pode favorecer a proliferação da levedura.

Dados relativos à produção de fator hemolítico por *C. tropicalis* são escassos¹⁹⁻²¹. O presente estudo

1. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2. Departamento de Ensino, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR. 3. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

Endereço para correspondência: Dra. Márcia C. Furlaneto. Depto. de Microbiologia/CCB/UEL. Caixa Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR.

Tel: 55 43 3371-5736.

e-mail: furlaneto@uel.br

Recebido para publicação em 13/10/2009

Aceito em 05/03/2010

teve por objetivos avaliar a atividade hemolítica *in vitro* de isolados clínicos de *C. tropicalis* e comparar a hemólise promovida por isolados provenientes de sangue e de outras amostras clínicas (urina, secreção traqueal e lesões superficiais).

MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 28 isolados de *C. tropicalis*, provenientes de diferentes amostras clínicas de pacientes atendidos e internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Os isolados foram obtidos de estudo relativo à frequência de espécies de *Candida* realizado no período de 2005 a 2007²². Destes, 10 foram isolados de sangue (grupo 1) e 18 de amostras clínicas distintas (8 urina, 6 secreção traqueal e 4 lesão de unha), sendo agrupados como não-sangue (grupo 2). 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 congeladas 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* e confirmada por PCR, conforme Furlaneto-Maia e cols¹⁹.

A atividade hemolítica *in vitro* dos isolados foi avaliada utilizando o ensaio descrito por Furlaneto-Maia e cols¹⁹, com modificações. Os isolados foram inoculados em 3mL de meio Sabouraud e incubados por 18 horas a 37°C, sob agitação. As células foram lavadas e 2x10⁵ células foram inoculadas em gota sobre a superfície de meio Sabouraud solidificado, suplementado com 7% de sangue fresco de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas e o perfil de hemólise analisado. O experimento foi repetido três vezes.

A hemólise obtida foi classificada em fraca (+), média (++) , forte (+++) ou muito forte (++++), de acordo com a quantificação dada pela fórmula $(H - C)/2$, sendo H a medida, em mm, do halo interno translúcido somado ao do halo externo marrom-esverdeado (Figura 1) e C o diâmetro da colônia.

As análises estatísticas foram realizadas aplicando-se o teste t de Student (BioStat versão 5.4.0). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

Do total de 28 isolados de *C. tropicalis* analisados, 100% promoveram hemólise em meio Sabouraud suplementado com 7% de sangue de carneiro, como ilustrado na Figura 1. Deste total, 40% dos isolados do grupo 1 (sangue) e 16,7% do grupo 2 (não-sangue) apresentaram hemólise fraca (+). Dentre os isolados do grupo 2, os de urina e de lesão de unha apresentaram predominantemente hemólise forte (+++), enquanto os isolados de secreção traqueal apresentaram os maiores níveis de hemólise (++++) (Tabela 1).

Entre os isolados de sangue a hemólise variou de 3,19 a 5,25mm, já os isolados do grupo 2 apresentaram amplitude de distribuição que variou de 1,5 a 6,33mm. Não foi observada diferença significativa nos níveis de hemólise entre estes grupos ($p > 0,05$).

Como observado na Figura 2, dentre os isolados do grupo 2, os provenientes de urina apresentaram hemólise variando de 1,5 a 5,31mm. Destes, 50% foram classificados como de hemólise forte (+++), não diferindo estatisticamente do grupo 1 (sangue) ($p > 0,05$).

Os valores de hemólise dos isolados de secreção traqueal variaram de 2,58 a 6,33mm, sendo que 50% desses apresentaram hemólise muito forte (++++) (Figura 2). Já os isolados de lesão de unha apresentaram valores de hemólise entre 3,0 a 5,17mm, com 50% de hemólise forte (+++) (Figura 2). A hemólise promovida

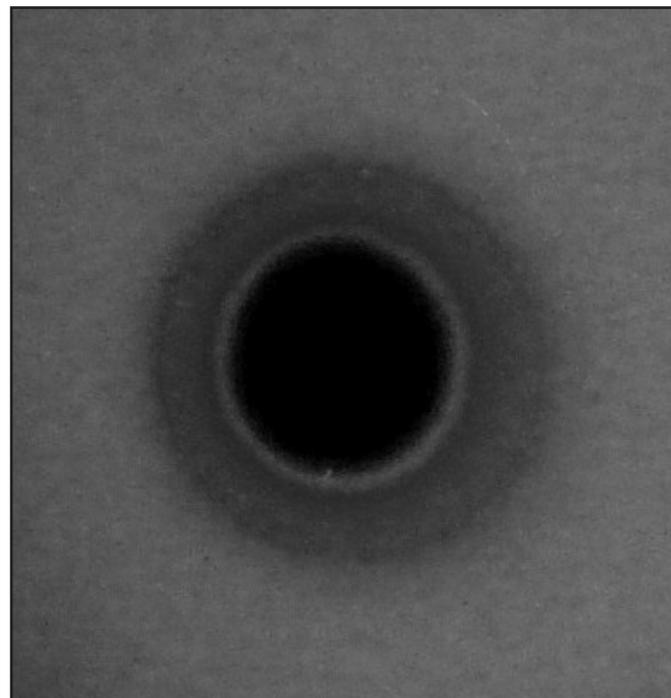


FIGURA 1 - Hemólise promovida por *Candida tropicalis* em meio Sabouraud suplementado com sangue de carneiro, após 48h de cultivo.

TABELA 1 - Distribuição dos isolados de *Candida tropicalis* de diferentes sítios anatómicos em função da classe de hemólise.

| Origem | Número | Classe de hemólise (%) | | | |
|-------------------|--------|------------------------|------|------|------|
| | | + | ++ | +++ | ++++ |
| Sangue | 10 | 40,0 | 30,0 | 10,0 | 20,0 |
| Não-sangue | 18 | 16,7 | 16,7 | 44,4 | 22,2 |
| Urina | 8 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 12,5 |
| Secreção traqueal | 6 | 16,7 | - | 33,3 | 50,0 |
| Lesão de unha | 4 | 25,0 | 25,0 | 50,0 | 0 |

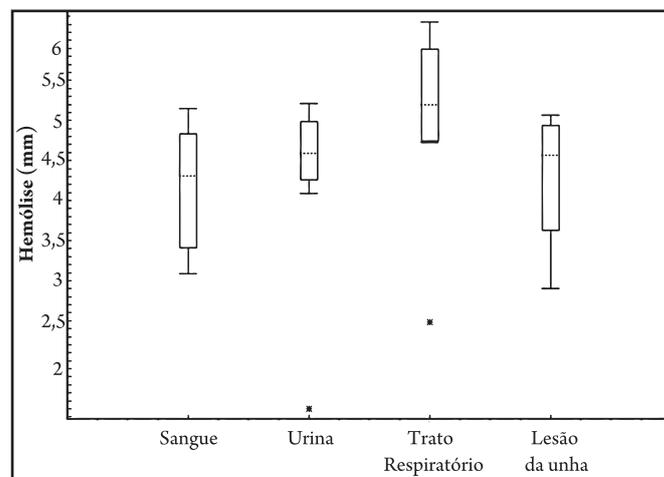


FIGURA 2 - Gráfico-caixa de distribuições da hemólise entre os isolados. O retângulo representa distribuição dos valores de hemólise produzidos pelos isolados (25% acima e abaixo do valor mediano de hemólise). A linha pontilhada representa o valor mediano de hemólise.

pelos isolados obtidos de amostras clínicas distintas (urina, secreção traqueal e de lesão de unha) não foi significativamente diferente ($p>0,05$) dos obtidos para isolados de sangue (Figura 2).

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade hemolítica promovida por *C. tropicalis* empregando isolados clínicos obtidos de estudo realizado no HU da Universidade Estadual de Londrina no período de 2005 a 2007. Todos os isolados de *C. tropicalis*, independente da origem, foram capazes de promover hemólise, concordando com dados da literatura¹⁹⁻²¹ indicando a habilidade desta espécie em disponibilizar potenciais fontes de ferro. Segundo Manns e cols¹⁶, *C. albicans* possui a capacidade de utilizar ferro derivado de hemoglobina, por meio da produção de um fator responsável pela lise dos eritrócitos, uma habilidade que pode ser compartilhada por *C. tropicalis* e representar uma vantagem adaptativa para o estabelecimento de infecções em seus hospedeiros.

A partir da quantificação da hemólise, os isolados foram agrupados em diferentes classes, refletindo uma capacidade diferencial, entre isolados, de gerar lise nos eritrócitos. Para evitar o efeito de repicagens sucessivas na produção de fator hemolítico, os isolados foram mantidos sob refrigeração (-20°C) e após descongelamento foram imediatamente cultivados para avaliação da atividade hemolítica.

Neste estudo, a maioria dos isolados de sangue foi agrupada na classe representativa de hemólise fraca (+), enquanto a maioria dos isolados obtidos de outras amostras clínicas (grupo 2) demonstrou maior nível de hemólise. Dentre estes, destacam-se os provenientes de secreção traqueal, já que em sua maioria foram agrupados na classe de hemólise muito forte.

Considerando que estudos relativos a produção de hemólise por espécies de *Candida* são escassos e que o presente trabalho representa o primeiro estudo de avaliação de hemólise promovida por isolados de *Candida* provenientes de sangue comparativamente a de isolados provenientes de amostras clínicas distintas (urina, secreção traqueal e lesão superficial), estudos posteriores deverão ser conduzidos com o objetivo de elucidar o significado da ocorrência de diferentes capacidades hemolíticas observadas para isolados obtidos de amostras clínicas distintas e seu eventual papel na patogenia. Estudos comparativos semelhantes foram realizados para a produção de outros fatores de virulência em *Candida* sp. Kumar e cols²³ demonstraram que isolados de diferentes espécies de *Candida* não-*albicans*, incluindo *C. tropicalis*, provenientes de amostras clínicas distintas apresentaram diferentes potenciais de produção de enzimas hidrolíticas. Segundo estes autores, a maioria dos isolados provenientes de sangue foi agrupada na classe referente aos menores valores de atividade proteolítica e fosfolipásica. Da mesma forma, isolados de *Candida parapsilosis* obtidos de sangue apresentaram menores atividades proteolíticas comparativamente aos isolados obtidos de outras amostras clínicas^{24,25}. Até o momento, não existem dados na literatura que demonstrem as bases moleculares relacionadas a expressão diferencial destes fatores de virulência por amostras de sangue.

Embora, neste estudo, a produção de hemólise por isolados distintos, independente da origem de isolamento, não tenha sido significativamente diferente ($p>0,05$), os níveis de hemólise promovidos pelos diferentes isolados foram variáveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores Emanuele Julio Galvão de França, Daniel Favero e Marcelo Tempesta de Oliveira agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior pela concessão de bolsas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária/SETI/Governo do Paraná/Brazil, Ministério da Saúde/DECIT, MCT/CNPq e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.

REFERÊNCIAS

- Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* 2005; 6:863-874.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:400-428.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:133-163.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, et al. 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. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5848-5859.
- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 599-607.
- Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007; 58:77-82.
- Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, Monfardini LPA, Cunha AKB, Rady P, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28:570-576.
- França JCB, Ribeiro CEL, Queiroz-Telles F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes species, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:23-28.
- Álvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, Leon C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *J Intens Care Med* 2003; 29:1069-1076.
- Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Galis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, et al. National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. Prospective Multicenter Surveillance Study of Funguria in Hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000; 30:14-18.
- Dorko E, Pilipèinec E, Tkàèiková L. Fungal diseases of the respiratory tract. *Folia Microbiol* 2002; 47:302-304.
- Flores JM, Castillo VB, Franco FC, Huata AB. Superficial fungal infections: clinical and epidemiological study in adolescents from marginal districts of Lima and Callao, Peru. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3:313-317.
- Meirelles TEF, Rocha MFG, Brilhante RSN, Cordeiro RD, Sidrim JJC. Successive mycological nail tests for onychomycosis: a strategy to improve diagnosis efficiency. *Braz J Infect Dis* 2008; 12:333-337.

14. Bullen J. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 1981; 3:1127-138.
15. Belanger M, Begin C, Jacques M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immunol* 1995; 63:656-662.
16. Manns JA, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; 62:5154-5156.
17. Watanabe TH, Tanaka N, Nakao T, Mikami T, Matsumoto T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 323:350-353.
18. Watanabe TH, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, et al. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 1999; 145:689-694.
19. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, Oliveira MT, Furlaneto MC. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathol* 2008; 166:209-217.
20. Luo G, Samaranyake LP, Yau JYY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2971-2974.
21. Rörig KCO, Colacite J, Abegg MA. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:225-227.
22. Rota JF. Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitário de Londrina. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR; 2009.
23. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathol* 2006; 161:213-218.
24. Cassone A. Biotype diversity of *C. parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis* 1995; 171:967-975.
25. Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. *Mycoses* 2005; 48:321-326.