

## ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, FATORES DE VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE IN VITRO DE LEVEDURAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

SALES, Werther Souza<sup>1</sup>; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues<sup>2</sup>

Palavras-chave: *Candida* sp. – UTI – infecções nosocomiais.

### 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

É crescente a incidência das infecções nosocomiais (CANTÓN et al., 2001; BECKER-SAGUÉ & JAVIS, 1993). As infecções fúngicas têm papel relevante nesse contexto, tendo como fatores o avanço na área médica e laboratorial, que permitem maior sobrevivência de pacientes com doenças crônico-degenerativas, neoplasias, imunodepressão, além de crianças prematuras e pacientes transplantados. Além da doença de base, diversos outros fatores relacionam com o aumento das infecções fúngicas, tais como longa internação, antibioticoterapia e corticoterapia prolongadas e procedimentos invasivos. Estes fatores estão presentes em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). No contexto de aumento de infecções nosocomiais fúngicas, espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Candida* e *Aspergillus*, bem como à classe dos *Zygomycetos* são os principais responsáveis pela maioria das infecções em hospitais (WINGARD et al., 1991). As espécies de *Candida* são indiscutivelmente as principais causas de infecções fúngicas nosocomiais. Estes fungos fazem parte da microbiota do homem, mas podem ser encontrados em diversos ambientes, inclusive hospitalares (ODDS, 1988). A forma mais grave de infecção por *Candida* ocorre quando este fungo é capaz de atingir a corrente sanguínea produzindo candidemia. Segundo CANTÓN et al., 2001; a maioria dos fatores de risco para a aquisição de candidemia são muito comuns em todos os pacientes hospitalizados. O objetivo deste trabalho foi coletar amostras de fungos do sangue, da urina e de cateteres de pacientes da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no dia da internação e a cada 7 dias após a mesma, para pesquisa de leveduras e determinar os fatores de virulência, como: proteinase, fosfolipase, produção de tubo germinativo.

### 2. METODOLOGIA

2.1. AMOSTRAS UTILIZADAS: Amostras de sangue e urina, conexões (HUB) e pontas de cateteres foram coletadas de pacientes internados da UTI do Hospital das Clínicas da UFG, durante o período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2004, na data da internação e a cada 7 dias de permanência nesta unidade.

2.1.1. SANGUE: Foram colhidos assepticamente de 15-20 mL de sangue periférico com seringa heparinizada, para semeadura em frascos de 50 mL, caldo BHI. Os isolamentos foram transferidos para tubos de ensaio, contendo agar BHI, para posterior identificação. (TELES FILHO, 1997).

2.1.2. URINA: Em pacientes cateterizados com sistema de drenagem fechada, colheu-se a urina (20mL) puncionando-se o cateter do tubo.

CULTURA SEMIQUANTITATIVA DA URINA: Cultura semiquantitativa de urina foi realizada de acordo com método descrito por ARGERI & LOPARDO, 1993.

2.1.3. CATETER E CONEXÕES: Cateteres (central, periférico e arterial) e conexões foram assepticamente lavados com água destilada. O líquido da lavagem foi centrifugado e o sedimento examinado a fresco e semeado em meio de ágar Sabouraud dextrose (TELES FILHO, 1997).

CULTURA SEMIQUANTITATIVA DE CATETERES: Cultura semiquantitativa de cateter foi realizada de acordo com método descrito por MAKI et al., 1977.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS: As colônias cremosas, úmidas características de leveduras crescidas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) foram submetidas a testes de identificação segundo KURTZMAN & FELL (1998), constando com as seguintes técnicas: PESQUISA DE TUBOS GERMINATIVOS (TESTE DE REYNOLDS-BRAUDE) e TESTE PARA ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS.

### 2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA / CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

#### 2.3.1. PROTEINASE

Foi utilizado procedimento descrito por RUCHEL (1990).

Meio Base: Ágar (Difco) – 18g; Água destilada – 1000 mL; O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Meio de Albumina: Yeast carbon base (Difco) – 11,7 g; Albumina bovina fração V (Sigma) – 2,7 g; Protovit (Roche) – 2,5mL; Água destilada – 1000,0 mL. O meio foi esterilizado por filtração através de membrana de Milipore de 0,22µm.

O meio básico esterilizado era resfriado a 50°C, adicionando-se então o meio de albumina e em seguida distribuído em placas de Petri. Após a solidificação do meio, eram semeados quatro isolados de leveduras por placa através de alça de platina. As placas foram incubadas à 37°C durante 4 dias. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo opaco de precipitação ao redor da colônia de levedura. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com a técnica de PRICE et al (1982), através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp). Os resultados de Pz foram considerados da seguinte maneira:  $Pz = 1,0$  = Ausência de atividade enzimática;  $1,0 < Pz \leq 0,64$  = Atividade enzimática positiva;  $Pz < 0,64$  = Atividade enzimática fortemente positiva.

#### 2.3.2. FOSFOLIPASE

A atividade de fosfolipase foi realizada segundo a técnica descrita por PRICE et al., (1982).

MEIO DE EMULSÃO DE OVO: Gema de ovo (80g) e 80 mL de solução fisiológica.

Os ovos eram deixados em álcool 70%, durante uma hora para serem desinfetados. Em seguida separam-se as gemas que eram colocadas em recipiente esterilizado contendo pérolas de vidro, pesadas e adicionadas de solução fisiológica, agitando-se vigorosamente.

MEIO ÁGAR FOSFOLIPASE: PEPTONA (DIFCO) – 10,00 g; Glicose (Synth) – 20,00 g; Cloreto de sódio (Reagen) – 57,30 g; Cloreto de cálcio (Reagen) – 0,55g; Ágar (Difco) – 20,00 g; Água destiladas – 1000,00 mL. O meio era esterilizado por autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Ao ágar resfriado a 50°C era adicionada a emulsão de ovo sendo em seguida distribuído o meio em placas de Petri que eram semeadas com 4 isolados de *Candida albicans* a serem testadas. Estas placas foram incubadas a 37°C por 4 dias. A leitura do teste foi realizada da mesma forma que para a proteinase, conforme descrito no item anterior.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na colheita de material biológico na UTI do Hospital das Clínicas UFG para cultura, foram incluídos 324 pacientes.

Foram isoladas 30 amostras à hemocultura, das 17 eram de *Candida albicans*, 1 de *Candida lusitanae*, 4 de *Candida guilliermondii*, 2 de *Candida tropicalis*, 4 de *C. parapsilosis* e 2 de *C. pseudotropicalis*. Já para as amostras de **urina**, o índice de positividade foi maior, totalizando 134 isolados de leveduras. Destas, 84 correspondiam à espécie *Candida albicans*, 13 à *Candida glabrata*, 3 à *Candida guilliermondii*, 7 à *Candida parapsilosis*, 6 à *Candida tropicalis*, 1 à *C. stelatoidea*, 5 à espécie *C. famata*, 8 à *C. pseudotropicalis*, 4 à *C. krusei* e 2 à *C. lusitanae*. A incidência de cada espécie colonizando o **cateter** dos pacientes totalizou 48 isolados: *Candida albicans*, 20; *Candida famata*, 6; *Candida glabrata*, 1; *Candida guilliermondii*, 4; *Candida parapsilosis*, 8; *Candida tropicalis*, 2; *C. krusei*, 4; *C. lusitanae*, 1; *C. stelatoidea*, 1, e *C. lypolytica*, 1.

Os dados que se seguem dizem respeito ao estudo *in vitro* da atividade enzimática dos isolados de *Candida*, isto é, do estudo de fatores de virulência *in vitro*. Dos 30 isolados de *Candida* na hemocultura, 26 (86,7%) apresentaram atividade positiva de proteinase, enquanto 25 (83,3%) apresentaram atividade enzimática positiva de fosfolipase. Dos 134 isolados de *Candida* de urocultura, 72 (53,7%) apresentaram atividade positiva de proteinase, enquanto 81 (60,4%) apresentaram atividade enzimática positiva de fosfolipase. Quanto à cultura semi-quantitativa de cateteres, observou-se que 15 (31,2%) dos 48 isolados de *Candida* apresentaram atividade enzimática positiva de proteinase, enquanto 25 (52,1%) apresentaram positividade para de fosfolipase.

#### 4. CONCLUSÃO

É de suma importância o reconhecimento dos agentes etiológicos específicos causadores de infecções fúngicas nosocomiais. O perfil dos agentes envolvidos em infecções de pacientes da UTI do Hospital das Clínicas da UFG ficou caracterizado no período estudado, quanto às amostras de sangue, urina e cateter. Percebemos que a espécie *Candida albicans* foi a mais incidente, mas outras espécies, como *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *C. parapsilosis*, entre outras, também apresentaram incidência importante.

Uma porcentagem relevante de isolados apresentaram atividade enzimática *in vitro*, ou seja, apresentaram fatores de virulência *in vitro*, mostrando-se com capacidade potencial de gerar lesão tissular *in vivo*.

As infecções nosocomiais têm grande importância no meio médico e microbiológico, portanto devem continuar a ser exaustivamente estudadas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGERI NJ, LOPARDO HA. Análisis de orina - Fundamentos y práctica. In: El diagnóstico microbiológico de la infección urinaria. 1ª ed., Madrid, Panamericana S/A, 9:168-174, 1993.
- BECK-SAGUÉ CM, JARVIS WR and the National Nosocomial Fungal Surveillance System. Secular Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the United States, 1980-1990. J Infec Dis, 167:1247-1251, 1993.
- CANTÓN, E; VIUDES, A; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. Rev. Iber Micol, 18:51-55, 2001.
- KURTZMAN CP, FELL JW 1998. The yeast's: a taxonomic study, 4<sup>th</sup> New York, Elsevier, p. 919-925.
- MAKI, DG; WEISE, CE; SARAFIM, HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous – catheter – related infection. N Engl J Med, 296: 1305-9, 1977.
- ODDS FC. *Candida* and candidosis, 2<sup>nd</sup> ed. Baillière Tindall, London, 1988.
- PRICE, MF; WILKINSON, ID; GENTRY, LO. Plate methods for detection of phospholipase in *Candida albicans*. Sabouraudia, 20:15-20, 1982.
- RUCHEL, R. Virulence factors of *Candida* species. In Oral Candidosis, Edited by Samaranayake, LP & Farlane, TW, Wright, 1990.
- TELES FILHO, FQ. Infecções causadas por fungos. In: Rodrigues, EAC. Infecções Hospitalares – Prevenção e Controle. São Paulo. Sarvier. 6:639-40, 1997.
- WINGARD JR, MERZ WG, RINALDI MG, JOHNSON TR, KARP JE, SARAL R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. N Engl J Med, 325:1274-1277, 1991.

---

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, [werther\\_2006@yahoo.com.br](mailto:werther_2006@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Orientador/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG, [rosario@ipstp.ufg.br](mailto:rosario@ipstp.ufg.br)