

**Rodrigo Berzaghi**

**Detecção de antígeno circulante nas candidemias:  
diagnóstico de candidemia em pacientes de UTI pela  
detecção da molécula de 65 kDa de *Candida albicans*  
através da técnica de ELISA de inibição.**

**São Paulo  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rodrigo Berzaghi

Detecção de antígeno circulante nas candidemias: diagnóstico de candidemia em pacientes de UTI pela detecção da molécula de 65 kDa de *Candida albicans* através da técnica de ELISA de inibição.

Tese apresentada à  
Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Zoilo Pires de  
Camargo

São Paulo  
2009

Rodrigo Berzaghi

Detecção de antígeno circulante nas candidemias: diagnóstico de candidemia em pacientes de UTI pela detecção da molécula de 65 kDa de *Candida albicans* através da técnica de ELISA de inibição.

Tese apresentada à  
Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Zoilo Pires de  
Camargo

São Paulo  
2009

**Berzaghi, Rodrigo**

Detecção de antígeno circulante nas candidemias: diagnóstico de candidemia em pacientes de UTI pela detecção da molécula de 65 kDa de *Candida albicans* através da técnica de ELISA de inibição.

**Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia**

**Título em inglês: Detection of circulating antigen in candidemias: diagnostic of candidemia in patients from Unit Care Treatment by the detection of 65 kDa molecule from *Candida albicans* by inhibition ELISA technique. .**

**1- Detecção de antígenos 2- 65 kDa 3- ELISA de inibição 4- Candidemia**

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Biologia Celular do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), com o auxílio financeiro do CNPq e FAPESP.

## Resumo

A candidíase nosocomial é grande preocupação em hospitais terciários em todo o mundo. A infecção ocorre geralmente em pacientes com doenças neoplásicas e degenerativas e é considerada a quarta causa mais freqüente de infecções sangüíneas. O diagnóstico da candidemia ou candidíase hematogênica tem sido problemático porque os sinais e sintomas clínicos são inespecíficos, o que conduz a atrasos no diagnóstico e, conseqüentemente, na terapia antifúngica apropriada. Desenvolvemos a técnica de ELISA de inibição para a detecção do antígeno de 65 kDa em modelo experimental de candidemia e para o diagnóstico de pacientes em UTI com suspeita de candidemia. Anticorpo monoclonal anti-65 kDa foi produzido e testado para a detecção do antígeno comum de 65 kDa produzido por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* em modelos murinos candidemia. No modelo experimental o antígeno de 65 kDa foi detectado no soro do camundongos em concentrações variando de 0,012 a 3,25 µg / ml. Vinte pacientes com candidemia foram avaliados pelo teste de ELISA de inibição em soros seqüenciais. Dezesesseis (80%) pacientes apresentavam o antígeno de 65 kDa em concentrações variando de 0,07 a 5,0 µg/ml. Os soros sequenciais de pacientes com candidemia apresentaram 3 diferentes padrões de antigenemia; 1 – clareamento total da antigenemia; 2-clareamento inicial e recidiva da antigenemia; e 3 – clareamento parcial da antigenemia. Nossos resultados indicam que a detecção da molécula de 65 kDa pode ser muito útil para o diagnóstico de candidemia por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Avaliamos também um possível papel biológico da molécula de 65 kDa. Os ensaios demonstraram que a proteína de 65 kDa tem ligantes de fibronectina de matriz extracelular, tendo um possível papel da adesão do fungo no hospedeiro.

## Abstract

Nosocomial candidiasis is a major concern in tertiary care hospitals worldwide. This infection generally occurs in patients with degenerative and neoplastic diseases and is considered the fourth most frequent cause of bloodstream infections. Diagnosis of candidemia or hematogenous candidiasis has been problematic because clinical signs and symptoms are nonspecific, leading to delays in diagnosis and, consequently, in appropriate antifungal therapy. We developed an inhibition ELISA for detection of a 65 kDa-antigen in an experimental model of candidemia and for diagnosis of patients in ICUs with suspected candidemia. An anti-65 kDa monoclonal antibody was tested for detection of the 65 kDa antigen produced by *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis* in murine candidemia models. The 65 kDa-antigen was detected in sera at concentrations ranging from 0.012 to 3.25 µg/ml. A total of 20 human patients with candidemia were then evaluated with the inhibition ELISA using sequential sera. Sixteen (80%) patients had the 65 kDa-antigen in concentrations ranging from 0.07 to 5.0 µg/ml. Sequential sera from patients with candidemia presented 3 different patterns of antigenemia of the 65 kDa molecule; 1- total clearance of antigenemia; 2-initial clearance and relapse of antigenemia; and 3- partial clearance of antigenemia. Our results indicate detection of the 65 kDa protein may be a valuable tool in the diagnosis of candidemia by *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*. We also evaluated a possible biological role of the molecule of 65 kDa from *C. albicans*. The tests showed that the protein of 65 kDa is bound to fibronectin from extracellular matrix, and a possible role of the adhesion of the fungus in the host.



## Abreviaturas

|                                   |                                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Ac</b>                         | Anticorpo                            |
| <b>A.f.</b>                       | <i>Aspergillus fumigatus</i>         |
| <b>Ag</b>                         | Antígeno                             |
| <b>C.a.</b>                       | <i>Candida albicans</i>              |
| <b>C.g.</b>                       | <i>Candida glabrata</i>              |
| <b>C.p.</b>                       | <i>Candida parapsilosis</i>          |
| <b>C.t.</b>                       | <i>Candida tropicalis</i>            |
| <b>DAPI</b>                       | 4'6-diamino-2 phenylindole           |
| <b>ELISA</b>                      | Enzyme linked immunosorbent assay    |
| <b>EDTA</b>                       | Ethylenediaminetetracetic acid       |
| <b>FIT-C</b>                      | Fluorescein isothiocyanate           |
| <b>gp</b>                         | Glicoproteína                        |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de hidrogênio               |
| <b>HEPES</b>                      | Ácido N-2 etanosulfônico             |
| <b>HAT</b>                        | Sodium hypoxantine and thymidine     |
| <b>H.c.</b>                       | <i>Histoplasma capsulatum</i>        |
| <b>Inh-ELISA</b>                  | ELISA de inibição                    |
| <b>Ig</b>                         | Imunoglobulina                       |
| <b>i.p.</b>                       | Intraperitoneal                      |
| <b>i.v.</b>                       | Intravenoso                          |
| <b>J.L.</b>                       | Doença de Jorge Lobo                 |
| <b>kDa</b>                        | Kilodalton                           |
| <b>MAb</b>                        | Anticorpo monoclonal                 |
| <b>mg</b>                         | Miligramas                           |
| <b>ng</b>                         | Nanograma                            |
| <b>µg</b>                         | Micrograma                           |
| <b>P</b>                          | Padrão de peso molecular             |
| <b>P. b.</b>                      | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |
| <b>PBS</b>                        | Phosphate buffer solution            |
| <b>PBS-T</b>                      | Phosphate buffer solution + Tween 20 |
| <b>PEG</b>                        | Polietilenoglicol                    |
| <b>PMSF</b>                       | Phenylmethyl sulphonyl fluoride      |

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| <b>rpm</b>      | Rotações por minuto                   |
| <b>SDS-PAGE</b> | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| <b>SFB</b>      | Soro fetal bovino                     |
| <b>SHN</b>      | Soro humano normal                    |
| <b>S.s.</b>     | <i>Sporothrix schenckii</i>           |
| <b>ST</b>       | Sem tratamento                        |
| <b>T.r.</b>     | <i>Trichophyton rubrum</i>            |
| <b>UFC</b>      | Unidade formadora de colônia          |

## Lista de figuras

**Figura 1-** Perfil eletroforético por SDS-PAGE dos exoantígenos de *Candida tropicalis* (coluna1), *C. parapsilosis* (coluna 2), *C. albicans* (coluna 3) e *C.glabrata* (coluna 4). P- Padrão de peso molecular

**Figura 2-** Perfil eletroforético por SDS-PAGE do exoantígeno bruto de *C. albicans* (1) e a molécula de 65 kDa purificada (2). P- Padrão de peso molecular.

**Figura 3-** Resultado do *Western blot* utilizando IgG de soro de coelho (1/50) anti-gp 65 kDa de *C. albicans* contra exoantígenos brutos de *C. glabrata* ATCC (1), *C. tropicalis* ATCC (2), *C. parapsilosis* ATCC (3) e *C. albicans* ATCC (4). P- Padrão de peso molecular.

**Figura 4- A:** Concentração de antígenos circulantes em modelo murino experimental de candidemia por *C. albicans* (*C.a*-ATCC e *C.a*-sangue) **B:** Concentração de antígenos circulantes em 2 soros de pacientes com candidemia (paciente 1 e paciente 2).

**Figura 5-** Detecção de antígeno circulante (65kDa) em modelo de candidemia experimental em coelhos nos tempos de 3h, 6h, 9h, 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d- pós-infecção; Controles negativos: scn (soro normal de coelho - pré-infecção); IgG normal de coelho.

**Figura 6-** SDS-PAGE mostrando a purificação da gp65 de *C. albicans*. P- Padrão de peso molecular, 1- Exoantígeno bruto de *C. albicans* e 2-Proteína de 65 kDa.

**Figura 7-** Reatividade do Mab anti-65kDa de *C. albicans* reconhecendo a proteína de 65kDa de *C. albicans* (coluna 9), *C. parapsilosis* (coluna 8) e *C. tropicalis* (coluna 7). Coluna 1 = *H. capsulatum*; coluna 2 = *A. fumigatus*; coluna 3 = *S. schenckii*; coluna 4 = *P. brasiliensis*; coluna 5 = *T. rubrum*; coluna 6 = *C. glabrata*.

**Figura 8-** Detecção de antígeno circulante (gp65) em modelo murino experimental de candidemia por *C. tropicalis* (A), *C. parapsilosis* (B) e *C. albicans* (C) utilizando Mab anti 65 kDa de *C. albicans*. Controle: soro de camundongo normal = 0,23 D.O. (bola amarela).

**Figura 9-** Representação esquemática da dinâmica de antigenemia por gp65 de *C. albicans* em 16 pacientes com candidemia. A= Pacientes com clareamento total da molécula após tratamento com antifúngico; B= Pacientes com clareamento inicial da molécula após tratamento antifúngico e recidiva da antigenemia; C= pacientes com clareamento parcial da antigenemia. ☺= pacientes que sobreviveram. ☠= pacientes com óbito.

**Figura 10.** Resultados do teste de inibição de ELISA para detecção da molécula de 65 kDa de *C. albicans*. Candidemia = soros de pacientes com candidemia devido a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. glabrata*; A.f = aspergilose; H.c = histoplasmoses; P.b = paracoccidioidomicose; J.L = Doença de Jorge Lobo. SHN = soro humano normal.

**Figura 11-** Efeito do MAb anti-65 kDa de *C. albicans* no crescimento de células vivas de *C. albicans*. UFC = unidade formadora de colônia. ST = sem tratamento.

**Figura 12-** UFC dos órgãos de camundongos tratados com MAb anti-65 kDa de *C. albicans* em concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/ml. ST = sem tratamento.

**Figura 13-** Células de *C. albicans* mostrando a imunomarcação utilizando anticorpo monoclonal anti- gp65. Em verde, imunomarcação por Fit-C e em azul marcação nuclear por DAPI. A localização das moléculas de 65 kDa se mostra distribuída predominantemente na parede celular na forma de “spots” (células de 3 dias). Aumento de 1000x.

**Figura 14- A,B,C,D,E e F:** Imunomarcação por microscopia eletrônica em células de *C. albicans* utilizando anticorpo monoclonal contra gp65; **G:** Controle negativo. As setas indicam acúmulo da gp65 na parede celular fúngica.

**Figura 15-** Resultado da purificação da fibronectina de plasma sanguíneo. 1- Fibronectina purificada (~ 440 kDa). P- Padrão de peso molecular.

**Figura 16-** Western blot mostrando a interação da proteína de 65 kDa de *C. albicans* com a fibronectina de matriz extracelular. Coluna 1- Controle negativo (fibronectina + gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*), coluna 2- controle positivo (proteína de 65 kDa de *C. albicans* + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*), coluna 3- controle da ligação inespecífica do mAb contra fibronectina (fibronectina + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*) e coluna 4- interação da proteína de 65 kDa de *C. albicans* com a fibronectina de

matriz extracelular (fibronectina + proteína de 65 kDa de *C. albicans* + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*)

## Lista de tabelas

**Tabela 1-** Detecção de antígeno de 65 kDa de *C. albicans* por ELISA de inibição em soros de pacientes com candidemia e as espécies de *Candida* isoladas. **Em negrito o dia da positividade pelo BacTec.**

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Introdução.....  | 1  |
| Revisão geral.....   | 2  |
| Características do gênero <i>Candida</i> .....   | 10 |
| Taxonomia.....   | 11 |
| Agente etiológico: características macroscópicas e microscópica.....   | 11 |
| Características da célula leviduriform.....  | 11 |
| Características da pseudo-hifa.....  | 12 |
| Características da hifa verdadeira.....  | 12 |
| Características relativas à fermentação e assimilação de carboidratos e álcoois.....   | 14 |
| Fatores predisponentes.....  | 15 |
| Mecanismos que potencializam infecções por <i>Candida</i> spp.....   | 15 |
| Efeitos no hospedeiro.....   | 15 |
| Mecanismos de defesa do hospedeiro.....  | 15 |
| Imunidade Celular.....   | 15 |
| Imunidade humoral.....   | 17 |
| Barreiras anatômicas.....  | 19 |
| Fatores químicos e mecânicos.....  | 19 |
| Proteção oferecida pela flora normal.....  | 20 |
| Patogenicidade.....  | 21 |
| Métodos diagnósticos em candidemia.....  | 22 |
| Diagnóstico de candidemia por hemocultura.....   | 23 |
| Diagnóstico sorológico.....  | 26 |
| Diagnóstico de candidemia pela Reação de Polimerase em Cadeia-PCR.....   | 30 |
| Justificativa.....   | 33 |
| Objetivos específicos.....   | 34 |
| Material e métodos.....  | 35 |
| Isolados de <i>Candida</i> spp.....  | 35 |
| Produção de antígeno bruto de <i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i> e antígenos brutos de fungos heterólogos..... | 35 |
| Condições de cultura.....  | 35 |
| Dosagem de proteínas.....  | 36 |
| Análise antigênica dos antígenos brutos de <i>Candida</i> spp.....   | 36 |
| Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....   | 36 |
| Preparo do gel.....  | 36 |
| Preparo das amostras.....  | 37 |
| Condições da corrida eletroforética.....   | 38 |
| Coloração pela prata.....  | 38 |
| Purificação da fração de 65 kDa de <i>Candida albicans</i> .....   | 38 |
| Produção de anticorpos policlonais anti-gp65 de <i>C. albicans</i> em coelhos.....   | 39 |
| Western blot.....  | 39 |
| Modelo murino experimental de candidemia.....  | 40 |
| Modelo de candidemia experimental em coelhos.....  | 41 |
| Produção de anticorpos monoclonais anti-gp65.....  | 41 |
| Imunização dos camundongos.....  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| Fusão de células.....  | 42 |
| Formação de ascite.....  | 43 |
| Purificação e dosagem dos anticorpos.....  | 43 |
| Isotipagem dos anticorpos monoclonais anti-gp65.....   | 44 |
| Coluna affi-gel 10 acoplada ao anticorpo monoclonal anti-65 kDa de <i>C. albicans</i> e purificação da gp65.....   | 44 |
| Soro de pacientes com candidemia e com outras micoses.....   | 45 |
| ELISA de inibição.....   | 45 |
| Princípio da detecção de antígeno circulante pela técnica de ELISA de inibição.....  | 45 |
| Tratamento das amostras para uso no teste de ELISA de inibição   | 46 |
| Tampão de diluição.....  | 46 |
| Placa de inibição.....   | 47 |
| Curva padrão de inibição.....  | 47 |
| Placa de reação.....   | 47 |
| Ensaio para determinação do possível papel biológico da proteína de 65 kDa de <i>C. albicans</i> .....   | 48 |
| Ação do anticorpo monoclonal no crescimento de células de <i>C. albicans</i> “in vivo”.....  | 48 |
| Determinação da unidade formadora de colônia (UFC) de <i>C. albicans</i> “in vivo”.....  | 49 |
| Imunodeteção da molécula de 65 kDa na célula de <i>C. albicans</i> .....   | 49 |
| Ensaio de imunofluorescência direta utilizando Mab anti-gp65 de <i>C. albicans</i> ..  | 49 |
| Imunomarcção por microscopia eletrônica.....   | 50 |
| Imunomarcção.....  | 51 |
| Ensaio de aderência do antígeno de 65 kDa à fibronectina.....  | 51 |
| Purificação de fibronectina do plasma sanguíneo.....   | 51 |
| SDS-PAGE.....  | 52 |
| Western blot.....  | 52 |
| Resultados.....  | 53 |
| Perfil protéico/glicoprotéico dos exoantígenos brutos de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i> .....   | 54 |
| Purificação da proteína de 65 kDa a partir do exoantígeno bruto de <i>C. albicans</i> .....  | 54 |
| Western blot utilizando anticorpos policlonais (IgG) contra a molécula de 65 kDa de <i>Candida</i> spp.....  | 55 |
| Resultados do teste de ELISA de inibição para detecção de antígeno circulante em modelo murino experimental de candidemia e em soro de dois pacientes com candidemia.....  | 56 |
| ELISA de inibição para determinação de antígeno circulante em modelo de candidemia experimental em coelho.....   | 57 |
| Obtenção de anticorpos monoclonais anti-gp65.....  | 58 |
| Purificação da proteína de 65 kDa com anticorpo monoclonal IgG1-2.....   | 59 |
| Western blot utilizando Mab anti-gp65 (IgG) de <i>C. albicans</i> versus exoantígenos de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i> e exoantígenos heterólogos..... | 59 |



|  |    |
|--|----|
| ELISA de inibição para detecção e quantificação de antígeno circulante em modelo murino experimental de candidemia por <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. Tropicalis</i> .....                            | 60 |
| ELISA de inibição para detecção e quantificação de antígeno circulante (65 kDa) em pacientes suspeitos de candidemia por <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> .....                          | 62 |
| Resultado do teste de ELISA de inibição para detecção e quantificação de antígenos circulantes (gp65 de <i>C. albicans</i> ) em soros de pacientes com candidíase e outras micoses.....                                    | 66 |
| Ensaio para determinação do papel biológico da molécula de 65 kDa de <i>C. Albicans</i> .....  | 67 |
| Ação do anticorpo monoclonal no crescimento de células de <i>C. albicans</i> .....   | 67 |
| Determinação de Unidade Formadora de Colônia (UFC) de <i>C. albicans</i> em modelo murino experimental de candidemia tratados com diferentes concentrações de anticorpo monoclonal anti-65 kDa de <i>C. albicans</i> ..... | 68 |
| Ensaio de imunofluorescência direta utilizando Mab anti-gp65 para localizar a presença da gp65 na célula de <i>C. albicans</i> .....   | 69 |
| Imunomarcagem por microscopia eletrônica.....  | 70 |
| Interação da gp65 kDa de <i>C. albicans</i> com fibronectina, proteína de matriz endotelial.....   | 75 |
| Interação da proteína de 65 kDa de <i>C. albicans</i> com a fibronectina.....  | 75 |
| Discussão.....   | 76 |
| Referências bibliográficas.....  | 86 |



## 1-Introdução.

Entre os agentes de infecção da corrente sangüínea estão os fungos, cuja incidência elevou-se nas últimas décadas em decorrência do avanço tecnológico da medicina. Este avanço propiciou a pacientes gravemente enfermos uma sobrevida maior, porém expondo-os mais às infecções fúngicas devido o uso de cateter venoso central, de nutrição parenteral total, de quimioterapia mais agressiva para neoplasias (provocando mucosite e neutropenia); pelo maior número de transplantes de medula óssea; e pelo uso de antibióticos de largo espectro (Wingard, 1995; Viudes *et al.*, 2002).

Das infecções fúngicas hospitalares, o gênero *Candida* corresponde a 78,3% dos casos (Becke-Sagué e Jarvis, 1993), sendo a quarta causa de infecção da corrente sangüínea nos EUA (Pittet *et al.*, 1997; Edmond *et al.*, 1999). *Candida albicans* é o agente mais freqüentemente isolado, próximo a 50% dos casos. Entretanto, vários autores vêm documentando um aumento de espécies não-*albicans* nas últimas décadas, o que é preocupante, pois algumas espécies têm sensibilidade diminuída aos triazólicos, como *Candida glabrata*, ou mesmo resistência a eles como *Candida krusei*, ou ainda resistência à anfotericina B, como *Candida lusitanae* (Colombo e Guimarães, 2003).

A apresentação clínica é inespecífica, sendo a febre o dado clínico mais comum (Nucci *et al.*, 1998; Viscoli *et al.*, 1999; Viudes *et al.*, 2002), o que torna o diagnóstico da candidíase hematogênica um desafio, pois as hemoculturas são positivas no máximo em 50% dos casos (Abi-Said *et al.*, 1997; Luzzati *et al.*, 2000; Blot *et al.*, 2002; Alonso-Valle *et al.*, 2003). Em geral, o diagnóstico é feito tardiamente no curso de uma infecção prolongada ou durante a necrópsia (Eggimann *et al.*, 2003).

A mortalidade entre os pacientes com candidemia é relatada entre 40% e 60% (Anaissie *et al.*, 1998; Nucci *et al.*, 1998; Viscoli *et al.*, 1999; Luzzati *et al.*, 2000; Saiman *et al.*, 2001; Viudes *et*

*al.*, 2002; Blot *et al.*, 2002; Hadley *et al.*, 2002; Nucci e Colombo, 2002; Colombo e Guimarães, 2003; Alonso-Valle *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2003). Esse alto percentual de mortalidade se deve particularmente ao diagnóstico tardio e à gravidade das comorbidades. (Abi-Said *et al.*, 1997; Voss *et al.*, 1999; Eggiman *et al.*, 2003).

## 1.2- Revisão geral.

Os casos de infecções fúngicas relatados na era pré-antibióticos e pré-esteróides eram muito raros. Em 1945, Downing e Contant (1945a; 1945b) relataram três casos de infecções sistêmicas e dois de endocardite causados por *Candida* spp. Winner e Hurley (1964) relataram alguns casos adicionais de candidíase sistêmica e, possivelmente, mais quatro fatalidades ocorridas durante a década de cinquenta.

O primeiro caso de candidíase disseminada em adulto foi relatado em 1937 por Bogen e Kessel, onde verificaram um aumento no crescimento fúngico em pacientes tratados com estreptomicina. Outros autores relataram aumento dos efeitos letais de *C. albicans* em embriões de galinha tratados com penicilina (Campbell e Saslaw, 1949; Foley e Winter, 1949). Em 1959, Zimmerman relatou que o uso de antibióticos de amplo espectro era responsável pelo aumento da incidência de doenças fúngicas. No início dos anos 50, alguns autores relataram que o uso de antibióticos de amplo espectro, tais como cloridrato de oxitetraciclina e cloranfenicol, era responsável pelo super crescimento fúngico em pacientes tratados com esses antibióticos [Berhman (1950), Freeman (1952), Mangiaracine (1951) e Reiches (1951)]. Também, neste momento, havia muitos casos de infecções severas causadas por *Candida* spp, ocasionando complicações bronco-pulmonares e relatos de infecções sistêmicas fúngicas endocárdicas e de trato urinário, correlacionadas com a administração de antibióticos (Wolff, 1952; Kunstadter, *et al.*, 1952; Wybel, 1952; Taylor and Rundle, 1952; Gausewitz, *et. al.*, 1951).

Em 1956, Keye e Magge analisaram casos clínicos, protocolos de autópsias, relatos histológicos e bacteriológicos de 15.845 óbitos no período de 1919 a 1955. Eles encontraram um total de 88 casos de infecções fúngicas, incluindo aquelas causadas por *Candida* spp., dos quais 47 foram considerados como secundários ao tratamento de uma doença primária. Os autores concluíram que havia alteração na incidência de infecções fúngicas primárias e aumento significativo de infecções fúngicas secundárias. Torack (1957) relacionou o aumento da incidência de infecções fúngicas ao uso de antibióticos com ou sem corticosteróide, sendo que as formas mais invasivas desenvolviam-se em pacientes aos quais eram administrados esteróides. Baker (1962) e Gruhn e Sanson (1963) confirmaram o aumento da incidência de micoses secundárias em pacientes leucêmicos. Baker (1962) atribuiu o aumento das fatalidades fúngicas, em pacientes com leucemia, ao uso de drogas anti-leucêmicas, corticóides e antibióticos. Ele relatou que entre os 143 pacientes leucêmicos autopsiados antes de 1953, nenhum óbito fora atribuído às infecções fúngicas. Entretanto, nos oito anos a seguir, 9% dos óbitos entre pacientes leucêmicos foram diretamente atribuídos à infecções fúngicas. Gruhn e Sanson (1963) estudando 103 pacientes leucêmicos, sendo 25 com infecções fúngicas secundárias, 5 dos quais com morte por micose disseminada, relataram que todos tinham sido submetidos à terapia antibiótica múltipla, bem como uso de corticosteróides.

Hutter e Collins (1962) relataram que entre 1950 e 1959 houve um aumento de quinze vezes no número de infecções fúngicas nos pacientes internados no *Memorial-Sloan Kattering Cancer Center* (Nova Iorque- EUA). Nos casos onde infecções fúngicas complicavam o quadro de leucemia aguda, Budey (1966) relata que, no período de 1959 a 1964, houve duplicação na freqüência de infecções fúngicas quando comparado com o período precedente de 5 anos. Schumacher *et al.* (1964) analisaram a incidência de infecções fúngicas em pacientes com leucemia, examinando os registros médicos de pacientes admitidos entre 1957 a 1962. Apenas 13,7% dos pacientes foram encontrados com infecções fúngicas. O fungo mais comum observado foi *Candida* spp. que ocorreu em 89,3% dos pacientes, ocasionando 24% de morte.

Até 1963, aproximadamente, cinco novas espécies de *Candida* com importância médica haviam sido descritas, *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (Emmons *et al.*, 1963). Contudo, na década de 60, com o advento de novas modalidades para o tratamento do câncer, além do uso de catéteres venosos e a explosão de novos agentes antibacterianos, abriram-se novas portas para o inóculo de leveduras que causam estas infecções no homem. Existem no mínimo 17 espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em humanos. Com o desenvolvimento das intervenções médicas e com o aumento da população de pacientes com imunodeficiências ou que passam por imunossupressão transiente ou longa, a lista de leveduras que causam doenças continua crescendo (Rinaldi, 1993; Krcmery e Barnes, 2002; DiazGranados *et al.*, 2008; St-Germain *et al.*, 2008; Bouza e Muñoz, 2008, Colombo *et al.*, 2008; Leroy *et al.*, 2009).

Espécies de *Candida* têm sido uma das mais comuns causas de infecções da circulação sanguínea nosocomial até 1990. O aumento das infecções fúngicas pode estar atribuído a muitos fatores, tais como regime terapêutico imunossupressivo, longo período de uso de cateteres, uso de antibióticos de amplo espectro e a sobrevida longa de indivíduos imunocomprometidos. Leveduras patogênicas previamente reconhecidas por raramente causar doenças ou causá-las apenas em condições específicas estão sendo relatadas com maior frequência (Leroy *et al.*, 2009; DiazGranados *et al.*, 2008; St-Germain *et al.*, 2008; Bouza e Muñoz, 2008, Colombo *et al.*, 2008; Krcmery e Barnes, 2002; Banerjee *et al.*, 1991).

Entre as infecções invasivas causadas por *Candida* vale ressaltar a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, complicação esta conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica. Três estudos compararam a representação percentual de diferentes espécies de leveduras presentes no sangue de pacientes em dois períodos no mesmo hospital. Em

um caso, a porcentagem de leveduras isoladas (*C. albicans*) aumentou (Beck-Sagué *et al.*, 1993) e em outro estudo, a porcentagem diminuiu (Borg von-Zepelin *et al.*, 1993). Os resultados do terceiro estudo (Price *et al.*, 1994) sugeriram que o uso de fluconazol pode ter contribuído para um significativo aumento no isolamento de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* do sangue e uma dramática diminuição de *C. albicans*. Revisões retrospectivas sobre leveduras isoladas da circulação sanguínea têm demonstrado uma preponderância de isolados pertencentes ao gênero *Candida*. Quando estudos são limitados a este gênero, as espécies isoladas mais freqüentemente são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* (Badenhorst *et al.*, 1991; Banerjee *et al.*, 1991).

No Brasil, Colombo *et al.* (1999) conduziram estudo epidemiológico reunindo dados sobre infecções de corrente sanguínea documentada em quatro hospitais de São Paulo. Durante o período de 12 meses, 7.038 episódios de bacteremias e fungemias foram avaliados e *Candida* spp. responderam por 4,3% do total das infecções da corrente sanguínea. Colombo *et al.* (2006) realizaram estudo epidemiológico de candidemia em onze centros médicos brasileiros, onde foram detectados 712 casos de candidemia, com incidência de 2,49 casos por 1000 admissões por dia, um valor elevado quando comparado a dados de outras regiões [E.U.A, 0,28 - 0,96 (Wisplinghoff *et al.*, 2004); Canadá, 0,45 (Macphail *et al.*, 2002); Europa, 0,28 – 0,38 (Tortorano *et al.*, 2004); França, 0,17 (Richet *et al.*, 2002); Itália, 0,38 (Tortorano *et al.*, 2002); Espanha, 0,76-0,81 (Viudes *et al.*, 2002; Alonso-Valle *et al.*, 2003)]. Das espécies de *Candida* isoladas por hemocultura *C. albicans* foi a espécie mais comum, com 40,9% dos casos, seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%), nos Estados Unidos e na Europa, *C. glabrata* vem em segundo lugar como espécie mais incidente (respectivamente, 18,3% e 13,6%), seguida por *C. parapsilosis*, respectivamente, 13,2% e 13,3% (Diekema e Pfaller, 2004; Tortorano *et al.*, 2004).

Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal,

local onde há rica colonização por *Candida* spp., em até 70% da população normal. Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* spp. até os capilares mesentéricos (Alexander *et al.*, 1990).

A perturbação do trato gastrointestinal pode ser o fator mais importante que predispõe ao desenvolvimento de infecções, particularmente a fungemia, pelas leveduras incomuns. Badenhorst *et al.* (1991) observaram que fatores como antibioticoterapia de amplo espectro e desordens abdominais, incluindo laparotomia, parecem estar entre os fatores mais envolvidos no desenvolvimento da fungemia.

Infecções hematogênicas por *Candida* spp. também podem ser adquiridas por via exógena, por meio do contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres vasculares em posição central, implantes de próteses contaminadas, bem como pela administração parental de soluções contaminadas (Pfaller, 1996; Wenzel *et al.*, 1995). Estudo feito com pessoal de um hospital demonstrou que mais de 70% dos enfermeiros e não enfermeiros abrigam leveduras em suas mãos (Strausbaugh *et al.*, 1994). Neste estudo, os organismos isolados em maior frequência foram *Rhodotorula* spp. e *C. parapsilosis*. Esta última espécie frequentemente coloniza a pele, particularmente o espaço subunguial (Weems, 1992). Se tal colonização contribui para o aumento de isolamento de *C. parapsilosis* em infecções nosocomiais por *Candida* spp. e contaminação de fluídos de irrigação, soluções de hiperalimentação e catéteres, tais fatores ainda requerem estudos (Branchini *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 1993; Weems, 1992). Quando um cateter se mostra contaminado por leveduras, culturas de sangue periférico são negativas e nenhum outro “ninho” é aparente, então a pele pode ser uma possível origem da levedura.

Wey *et al.* (1988) preconizaram os seguintes fatores de risco para candidemia: uso de antibióticos, colonização por *Candida* spp. em diferentes



locais, hemodiálise e uso de cateter venoso central. Assim, é possível entender porque a maior casuística de candidemia tem sido documentada em indivíduos portadores de câncer, submetidos à transplantes de órgãos ou procedimentos cirúrgicos de grande porte, crianças prematuras e pacientes críticos admitidos em unidades de terapia intensiva com falência de diferentes órgãos.

A baixa resposta imune do hospedeiro pode explicar como um organismo de baixa virulência é capaz de estabelecer uma infecção. A *C. parapsilosis* pode induzir resposta inflamatória aguda e crônica. D' Antonio *et al.* (1992) observaram que micro abscessos hepáticos e esplênicos são freqüentemente associados com *C. parapsilosis* em pacientes com doenças hematológicas malignas. Estas observações demonstraram que organismos que geralmente são infreqüentes causadores de infecção, podem, sob condições apropriadas, causar sérias infecções.

Yamura *et al.* (1999) relataram a predominância de candidemias por *C. albicans* em 14 hospitais canadenses. No estudo, *C. parapsilosis* (10,4%), *C. glabrata* (8,2%) e *C. tropicalis* (8,2%) foram as espécies não-*albicans* predominantes.

Nos Estados Unidos e Europa, *C. parapsilosis* apresenta-se, desde os anos 80, como importante patógeno hospitalar de fungemias, sendo responsável por 7 a 15% das candidemias (Pfaller,1996; Voss *et al.*, 1997). Sua ocorrência ainda é maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva, onde a prevalência de candidemias por *C. parapsilosis* é de 17 a 50% (Levy, 1998). Caracteristicamente, *C. parapsilosis* prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme e freqüentemente coloniza a pele. Vários estudos estabelecem claramente a associação entre a utilização de cateteres venosos e maior ocorrência de fungemia por *C. parapsilosis* (Levin *et al.*, 1998).

Em países da América Latina, *C. parapsilosis* é reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva (Colombo *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2003; Goldani e Mario, 2003). *C. parapsilosis*, em muitas instâncias, é levedura patogêna adquirida exogenamente, tendo propensão em colonizar e infectar materiais sintéticos implantados e semi-implantados, incluindo cateteres venosos (Nucci e Colombo, 2002; Walsh e Rex, 2002; Levin *et al.*, 1998). As infecções sistêmicas por *C. parapsilosis* são comumente observadas em pacientes suscetíveis, como neonatais e aqueles submetidos à cirurgias (Kao *et al.*, 1999; Levy, 1998; Stamos e Rowley, 1995). A afinidade de *C. parapsilosis* por materiais de uso externo tem sido reconhecida como fator de risco em pacientes submetidos à diálises peritonais, próteses de válvulas cardíacas e infecções em próteses de "juntas" (Diekema *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2000). O uso de cateteres intravasculares em pacientes portadores de neoplasias tem papel fundamental na promoção de infecções hematogênicas por *C. parapsilosis* (Levin *et al.*, 1998).

*C. tropicalis*, por sua vez, tem sido relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasia, sendo sua freqüência maior em leucemias e menor em tumores sólidos (Wingard, 1995). *C. tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal. Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis à anfotericina B e, na grande maioria das vezes, aos triazólicos. Em países da América Latina, particularmente, esta espécie é extremamente freqüente entre pacientes não portadores de câncer constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia (Colombo *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2003; Goldani e Mario, 2003).

*C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram as espécies não-*albicans* mais freqüentemente isoladas da corrente sanguínea, sendo isoladas em vários hospitais brasileiros (Nucci *et al.*, 1998; Colombo *et al.*, 1999) e estes estudos sugerem que *C. tropicalis* é menos colonizadora, mas é mais patogênica.

Contudo, *C. tropicalis* não tem se mostrado como mais patogênica do que *C. albicans* em estudos experimentais em animais (Wingard *et al.*, 1982). Recentemente, um programa internacional de acompanhamento de infecções sanguíneas (SENTRY - North América Antimicrobial Surveillance Program) ocorrido nos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa, entre 1997 e 1999, demonstrou alta proporção de *C. tropicalis* e baixa de *C. glabrata* na América Latina (Pfaller *et al.*, 1999). O programa SENTRY tem relatado predominância de *C. albicans*, comparada às espécies não-*albicans* (54,4% vs 46,6%) em hospitais dos Estados Unidos (Pfaller *et al.*, 2000), sendo *C. glabrata* e *C. parapsilosis* as espécies não-*albicans* mais comuns.

*C. glabrata* surge como um importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das séries de candidemia relatada nos Estados Unidos e Europa (Abi-Said *et al.*, 1997). *C. glabrata* apresenta maior prevalência em pacientes idosos, sendo que respondeu por 25% de todas as fungemias documentadas em pacientes maiores de 65 anos, como relatado pelo SENTRY, que avaliou casos de candidemia em 17 centros médicos do Estado de Iowa - Estados Unidos (Diekema *et al.*, 2002).

*C. krusei* tem se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplantes de medula óssea (Iwen *et al.*, 1995). A resistência deste organismo ao fluconazol e o uso sistemático desta droga podem explicar o aumento significativo no número de infecções causadas por esse patógeno (Horn *et al.*, 1985; Merz *et al.*, 1986; Miyake *et al.*, 1986).

*C. lusitaniae* é uma levedura pouco freqüente como agente causador de doença invasiva, mas tem sido relatada como agente de candidemia em pacientes imunocomprometidos, onde de um total de 86 casos descritos de doenças invasivas por esta espécie, 70 foram identificadas em pacientes com câncer (Colombo e Guimarães, 2003).

De forma geral, 40 a 60% dos pacientes que desenvolvem candidemia morrem durante a internação na qual houve a fungemia, sendo a alta mortalidade decorrência, particularmente, do diagnóstico tardio, gravidade da infecção e estado geral do paciente (Wenzel, 1995; Wey *et al.*, 1988). Devido a estes fatores, é de fundamental importância para o tratamento destes pacientes, o diagnóstico precoce da candidemia antes que ela se torne disseminada e ponha em risco a vida dos pacientes.

### **1.3- Características do gênero *Candida*.**

#### **1.3.1- Taxonomia.**

*Candida* spp. fazem parte do reino Fungi e dentro deste encontramos sua categoria taxonômica segundo Berkhout (1923):

Reino: Fungi

Filo ou Divisão: Ascomycota

Classe: Saccharomycetes

Ordem: Saccharomycetales

Família: Saccharomycetaceae

Gênero: *Candida*

### **1.3.2- Agente etiológico: Características macroscópicas e microscópicas.**

*Candida albicans* é um fungo dimórfico que cresce rapidamente em ágar-Sabouraud. Após três dias a 25°C as colônias são brancas a creme, lisas e brilhantes. Após um mês, apresentam tonalidade creme, sendo serosas, lisas ou sulcadas, com ou sem franjas micelianas. Microscopicamente, *C. albicans* cresce como célula elipsoidal (usualmente denominada blastósporo), como pseudo-hifa ou a 37 °C como hifa verdadeira septada (Berkhout, 1923).

#### **1.3.2.1- Características da célula leveduriforme.**

As células leveduriformes são redondas ou elipsoidais delimitadas por uma parede celular (de 100 a 300 nm de espessura) e com diâmetro entre 2 a 5 µm (Poulain *et al.*, 1978; Yamaguchi *et al.*, 1974; Yamaguchi *et al.*, 1974). O processo de brotamento (blastósporo) envolve a formação de uma evaginação da membrana celular e da parede celular. Durante este processo, desenvolve-se centripetamente um septo contínuo com a parede na junção da célula-mãe e da célula-filha, seguido pela separação da célula-filha. Os blastósporos contém várias organelas, incluindo: núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, ribossomos, grânulos lipídicos e vacúolos (Yamaguchi *et al.*, 1974, Shannon e Rothman, 1971., Miller *et al.*, 1974, Persi e Burnham, 1981)

#### **1.3.2.2- Características da pseudo-hifa.**

A morfologia da pseudo-hifa de *C. albicans* é intermediária entre o blastósporo elipsoidal e a hifa alongada. Embora a pseudo-hifa se assemelhe a uma hifa verdadeira, microscopicamente seu modo de formação é diferente. Uma pseudo-hifa individual tem um diâmetro de 2 a 5 µm e de 26 a 30 µm de comprimento (Silva-Hunter, 1970).

### 1.3.2.3- Características da hifa verdadeira.

A hifa verdadeira de *C. albicans* tem formato de tubo ou filamento compartimentalizado com diâmetro entre 0,8 a 1,3  $\mu\text{m}$  (um terço do diâmetro de um blastóporo) (Soll, 1985, Yamaguchi *et al.*, 1974, Silva-Hunter, 1970). Dentro de cada compartimento de hifa existem organelas similares às encontradas nos blastósporos. As hifas crescem apicalmente e podem surgir como ramificações de uma hifa já existente ou pela germinação de blastósporos (Braun e Calderone, 1978). A formação da hifa pelos blastósporos é iniciada pelo surgimento de um tubo germinativo que cresce continuamente em extensão.

Em adição às três formas mencionadas, *C. albicans* pode existir como uma célula elipsoidal, denominada clamidósporo (Winner e Hurley, 1964, Jansons e Nickerson, 1979). Estas células representam uma fase estacionária ou mesmo um fenótipo terminal de um blastósporo (Nickerson e Mankowski, 1953).

As colônias de *C. tropicalis* em ágar-peptona dextrose, a 25°C, após três dias, apresentam tonalidade creme, sendo lisas, opacas, com bordas micelianas após incubação prolongada. O cultivo em lâmina em ágar-fubá evidencia micélio e pseudomicélio extensos, com parede celular fina, isolados, em curtas cadeias e aglomerados de blastoconídeos são encontradas nas constrições de pseudo-hifas. Em soro sanguíneo, a 37°C, os blastoconídeos, após 2 a 3 horas, podem formar pseudo-hifas com constrições. Os tubos germinativos verdadeiros não possuem constrições, sendo tubos ou filamentos contínuos (Berkhout, 1923).

As colônias de *C. parapsilosis*, em ágar-peptona dextrose, a 25°C, após 3 dias, apresentam tonalidade creme, sendo elevadas a umbonadas, opacas e brilhantes, lisas ou sulcadas, com 2 mm, após três dias e de 3 a 7 mm, após

sete dias. O cultivo em lâmina, em ágar-fubá, mostra pseudomicélio muito reto, constituído de células alongadas. Ramificações muito regulares conferem ao pseudomicélio aspecto de pinhos da floresta, com blastoconídeos esféricos e ovais formados nas constrições das pseudo-hifas. Algumas amostras produzem muito pouco pseudomicélio (Langerson e Talice, 1932).

As colônias de *C. glabrata* em ágar peptona dextrose, a 25°C, após 3 dias, apresentam tonalidade creme, sendo lisas, opacas, regulares na forma e esféricas. Células leveduriformes geralmente são ovais, isoladas ou com brotamento, com 2-4 x 3-5,5 µm. Em ágar-fubá + Tween 80, observam-se células ou blastoconídeos ovais, com ou sem brotamentos. Não há formação de pseudomicélio (Kreger-van Rij, 1984)

#### **1.4- Características relativas à fermentação e assimilação de carboidratos e álcoois.**

*Candida albicans* fermenta a glicose e a maltose, não fermentando a lactose. Apresenta ação fermentativa variável com a sacarose e a galactose. Quanto às “fontes de carbono”, assimila a galactose, a maltose, a trealose, o amido solúvel, a D-xilose e o D-manitol. A assimilação é variável com a L-sorbose, a sacarose, a melizitose, a L-arabinose, a D-arabinose, o glicerol, o ribitol, o D-glucitol, o DL-ácido láctico, o ácido succínico e o ácido cítrico. Não assimila a celobiose, a lactose, a melibiose, a rafinose, a L-raminose, o eritrol, o galactitol, a silicina e o inositol. Não assimila o nitrato de potássio (Meyer *et al.*, 1984).

*C. parapsilosis* apresenta provas do tubo germinativo e da uréia negativas. A fermentação da sacarose e da maltose é negativa ou fracamente positiva, sendo negativa a lactose, variável a galactose e positiva a dextrose. A assimilação é positiva na dextrose, sacarose, maltose, galactose, trealose,

manitol, D-xilose, L-arabinose, glicerol, ribitol, D-glucitol, sendo negativas a lactose, a rafinose, a celobiose, o inositol, a melezitose, a melibiose, a D-arabinose, a L-ramnose, a salicina e o amido solúvel. São variáveis L-sorbose, D-ribose, DL-ácido láctico e ácidos succínico e cítrico. A assimilação do nitrato de potássio é negativa (Kreger-van Rij, 1984).

*C. tropicalis* apresenta provas da urease e da assimilação do nitrato de potássio negativas. A dextrose, a maltose e a galactose são fermentadas, não sendo a lactose e a rafinose. A sacarose e a trealose possuem comportamento fermentativo variável. A assimilação é positiva com dextrose, maltose, galactose, trealose, D-xilose, manitol, D-glucitol, ácido succínico e amido solúvel, sendo negativa com lactose, rafinose, inositol, melibiose, D-arabinose, L-ramnose, eritritol e galactitol. A assimilação é variável com sacarose, arabinose, celobiose, melezitose, L-sorbose, D-ribose, glicerol, rabitol, salicina, DL-ácido láctico e ácido cítrico (Kreger-van Rij, 1984).

*C. glabrata* fermenta a dextrose e a trealose, mas não a sacarose, a maltose, a lactose, a galactose e a rafinose. Assimila a dextrose e a trealose como única fonte de carbono, não ocorrendo o mesmo com a sacarose, a maltose, a lactose, a galactose, a rafinose, a celobiose, o inositol, a melibiose, a sorbose, a xilose, a arabinose, a ribose, o eritritol, o rabitol, o galactitol, o glucitol, a salicina, o ácido láctico, o ácido succínico, o ácido cítrico e o amido solúvel. A assimilação de glicerol é variável e a do nitrato de potássio negativa (Kreger-van Rij, 1984).



## **1.5- Fatores predisponentes**

### **1.5.1- Mecanismos que potencializam infecções por *Candida* spp.**

#### **1.5.1.1- Efeitos no hospedeiro**

Para compreender os mecanismos exercidos pelos vários fatores predisponentes na potencialização da infecção por *Candida* spp. necessita-se uma compreensão dos fatores que protegem o hospedeiro contra a invasão superficial ou sistêmica por estas espécies. Estes mecanismos de proteção podem ser divididos em três categorias: mecanismos de defesa do hospedeiro, barreiras anatômicas e proteção oferecida pela flora normal (Tattersall, 1975).

#### **1.5.1.2- Mecanismos de defesa do hospedeiro**

##### **1.5.1.2.1- Imunidade celular**

Alterações na imunidade celular do hospedeiro podem predispor à infecção por *Candida* (Rogers e Balish, 1980, Edwards *et al.*, 1978). Os fatores imunes celulares e fagocíticos são os mais importantes na resistência do hospedeiro a *Candida* do que a imunidade humoral, que está mais associada a infecções por bactérias e algumas infecções virais (Tattersall, 1975). Em geral, o “clearance” de *C. albicans* no sangue é atribuído à atividade dos leucócitos (Lehrer e Claine, 1969; Rogers e Balish, 1980). Neutrófilos, monócitos e eosinófilos são conhecidos por fagocitar e matar as leveduras (Lehrer e Claine, 1969; Lehrer, 1975; Lehrer, 1971). As interações entre estas células e *C. albicans* têm sido extensivamente estudadas “in vitro” (Lehrer e Claine, 1969; Lehrer *et al.*, 1975; Lehrer, 1971). Existem 2 mecanismos sugeridos para atividade candidacida destas células (ambas envolvem proteínas contidas dentro dos grânulos dos neutrófilos); o primeiro envolve interação entre

mieloperoxidase/peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (Quie, 1976). O segundo mecanismo envolve a ação de certas proteínas, entre elas a proteína catiônica quimotripsina (Lehrer *et al.* 1975; Lehrer e Cline, 1969a; Lehrer, 1969). Esta proteína exibe capacidade candidacida para *C. parapsilosis* e *Candida* spp. “in vitro”. A quimotripsina é rapidamente e, preferencialmente, absorvida pela *C. parapsilosis* levando ao aumento da permeabilidade da membrana (Lehrer *et al.*, 1975).

A anormalidade mais comum nos grânulos dos neutrófilos é a deficiência da mieloperoxidase, na qual há uma completa falta de mieloperoxidase nos grânulos primários leucocíticos (Klebanoff e Clark, 1978). Tal deficiência pode ocorrer através do uso de drogas ou por certas doenças como leucemia e aplasia da medula óssea, onde há leucopenia acentuada. Pacientes sofrendo de leucemia mielógena apresentam aparecimento maturo de neutrófilos que são deficientes em composição e em atividade candidacida (Kernbaum e Bastin, 1974, Lehrer e Cline, 1971). Defeitos na capacidade de gerar peróxido de hidrogênio ou anion superóxido também podem interferir na morte de células de *C. albicans* fagocitadas (Lehrer e Cline, 1969a e 1969b).

O defeito mais comum dos neutrófilos é causado pela quimioterapia anti-neoplásica. Neutrófilos deficientes em atividade candidacida foram observados em pacientes submetidos à quimioterapia contra câncer metastático e transplantados renais que foram tratados com drogas imunossupresivas (Lehrer e Cline, 1971; Lehrer, 1972).

Defeito nas células mediadoras de resposta imune tem sido associado com a ocorrência de candidíase mucocutânea (Hitzig, 1968; Montes *et al.*, 1968). Burford-Mason *et al.* (1987) sugerem que uma resposta imune celular protege contra candidíase mucocutânea e sistêmica e que a resposta imune defeituosa contra candidíase mucocutânea não implica na falta de proteção contra propagação da candidíase sistêmica.

### 1.5.1.2.2- Imunidade Humoral

Imunoglobulinas apresentam um papel muito pequeno, se algum, na proteção contra candidíase, o que não ocorre em pacientes com deficiências específicas nas imunoglobulinas (Hermans e Wilson, 1980). A sugestão de que a imunoglobulina G (IgG) contém opsoninas efetivas para *C. albicans* é controversa (Smith, 1985). Kagaya e Fukasawa (1981) relataram que a adição de um anticorpo específico de coelho em um sistema “in vitro” contendo *C. albicans* e neutrófilos não aumentou a proporção de fagocitose ou morte. La Force *et al.* (1975) mostraram que soros de pacientes com candidíase disseminada inibiram a fagocitose de *C. albicans* por neutrófilos humanos. Estes autores sugerem que este efeito foi devido a presença de alto títulos de anticorpos anti-*Candida* que são prevalentes em pacientes que sofrem de candidíase sistêmica ou mucocutânea. Inversamente, Diamond *et al.* (1978) relataram aumento da fagocitose de *Candida* por neutrófilos humanos em soro normal devido a opsonização de baixos níveis de anticorpos IgG anti-*Candida*. Diamond *et al.* (1978) investigaram os mecanismos envolvidos no reconhecimento e no dano da *C. albicans* por neutrófilos na falta do soro. Eles concluíram que *Candida* contém uma molécula na sua superfície que é reconhecida por receptores de neutrófilos. Consequentemente, o dano causado pelos neutrófilos na *Candida* ocorre primariamente pelos mecanismos oxidativos.

Outro papel sugerido às imunoglobulinas no controle da *Candida* é a interferência com a aderência do microrganismo. Epstein *et al.*, (1982) demonstraram que anticorpos IgA anti-*Candida* presentes na saliva podem inibir a aderência da *Candida* na mucosa oral. Estes autores concluíram que a inibição da aderência por anticorpos existe, mas é menos marcante na relação *Candida*/hospedeiro.

Lehrer e Cline (1969) mostraram que a atividade candidacida do sangue é atribuída aos leucócitos porque o plasma ou o soro não eliminam a *C.*

*albicans*, apesar do fato de conterem anticorpos e componentes de complemento. Por outro lado, Moreli e Rosemberg (1971) mostraram que a fagocitose da *C. albicans* pelos leucócitos do sangue de camundongos foi aumentada pelo sistema de complemento. Eles também mostraram que a fagocitose desta levedura foi aumentada por um anti-soro específico. Camundongos com deficiência no sistema de complemento têm resistência menor às infecções por *Candida*. Humanos com deficiência hereditária em C2 do sistema complemento apresentaram deficiência na fagocitose de *Candida* (Meuwissen *et al.*, 1982). Lyon *et al.* (1986) utilizaram camundongos congênitos, deficientes ou não de componente C5 e observaram que o C5 é importante, mas não essencial na defesa contra *C. albicans*. Kozel *et al.* (1987) mostraram que a ativação da cascata de complemento é um evento importante na patogenicidade causada por *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Eles sugeriram que a via alternativa do complemento é o mecanismo primário para ativação e ligação de fragmentos de C3 à *Candida albicans* e que a ligação do C3 nas leveduras está envolvida com ligações éster e amino.

Resultados da ação de macrófagos sobre *Candida* são limitados e contraditórios. Kagaya e Fukasawa (1981) investigaram a fagocitose e a atividade intracelular de fagócitos normais de camundongos contra *C. albicans*. Os autores relataram que a viabilidade das células que foram fagocitadas por leucócitos de sangue periférico de camundongos e as de macrófagos peritoniais têm a mesma proporção. Estes resultados sugerem que os macrófagos peritoniais, fatores associados com a via alternativa do complemento e os macrófagos ativados por linfocinas têm papel importante na proteção de camundongos contra candidíase (Kagaya e Fukasawa, 1981). Lehrer *et al.* (1977) e Peterson e Caldron (1977) consolidaram o papel dos macrófagos no controle da infecção por *Candida* mostrando que eles podem matar as células de *C. albicans* fagocitadas na mesma intensidade que os neutrófilos humanos. Contudo, Stanley e Hurley (1969) e Ozato e Uesaka (1974) encontraram macrófagos que apenas tinham uma atividade fungistática transiente. Estes resultados contraditórios podem ser pelo fato de que Lehrer *et al.* (1977) utilizaram macrófagos alveolares e os outros utilizaram

macrófagos peritoniais. É sabido que macrófagos peritoniais residentes têm metade da efetividade do que os macrófagos alveolares (Edwards *et al.*, 1978). Taschdjian *et al.*, (1971) examinaram tecidos de pacientes com candidíase sistêmica e encontraram células de *Candida* com a parede celular alterada com os macrófagos teciduais e células reticuloendoteliais sésseis em todo corpo sugerindo ingestão.

### **1.5.2.-Barreiras anatômicas.**

#### **1.5.2.1.- Fatores químicos e mecânicos.**

Fatores químicos como ácidos graxos voláteis e ácidos biliares presentes no ambiente gastrointestinal são relatados como fatores importantes na proteção de infecção por *Candida* por interferir na associação entre levedura e mucosa (Kennedy e Volz, 1985). Os fatores que danificam a integridade da pele ou mucosa do hospedeiro geram condições predisponentes à infecções microbianas, incluindo as causadas por *Candida*. Contudo, não apenas os fatores que danificam a integridade destas barreiras são responsáveis pela predisposição a estas infecções. Pacientes que não possuem ou apresentam as defesas secundárias prejudicadas têm maior predisposição à doença disseminada (Wolfson *et al.*, 1985). Pacientes que sofreram queimaduras, submetidos à antibioticoterapia, imunossuprimidos com uso de cateteres intravenosos ou hiperalimentação estão sujeitos à infecção disseminada por *Candida* (Law *et al.*, 1972; MacMillan *et al.*, 1972).

A pele pode se tornar porta de entrada para uma infecção potencial nas seguintes circunstâncias: quando a barreira superficial de queratina é destruída, quando é submetida a um trauma ou pela introdução de algum material externo, como, por exemplo, um catéter intravascular (Collins *et al.*, 1968); pela administração de antibióticoterapia de amplo espectro que altera a

flora normal tornando-se ambiente propício para a interferência bacteriana (Carlisle *et al.*, 1978; Dennis *et al.*, 1980; Gartenberg *et al.*, 1978; Keys *et al.*, 1978).

Danos na mucosa são atribuídos à quimioterapias com agentes imunossupressivos e tratamento com irradiação, tornando-se fatores predisponentes à infecção por *Candida* (Tattersall, 1975; Silverman *et al.*, 1984).

#### **1.5.2.2.- Proteção oferecida pela flora normal.**

A importância da flora normal na proteção do hospedeiro contra a invasão de patógenos se tornou aparente em 1950 com o uso de antibióticos de amplo espectro como, por exemplo, as tetraciclínas. Estudos mostraram que pacientes submetidos à antibioticoterapia apresentavam aumento da incidência nas culturas positivas por *Candida* na nasofaringe, escarro e fezes (Lipnik *et al.*, 1952; Meads *et al.*, 1951). Vários relatos de casos exemplificam a associação entre infecções de *Candida* e utilização de antibióticos (Kennedy e Volz, 1983; Seelig, 1968). No geral, estes trabalhos concluem que pacientes que foram submetidos à antibioticoterapia por longos períodos tinham o número de certas espécies da flora normal do trato gastrointestinal reduzidas, levando à ruptura dos mecanismos regulatórios normais. Assim, patógenos oportunistas, incluindo *Candida*, podem aumentar a aderência, a colonização e a disseminação no trato gastrointestinal (Sutter e Finegold, 1974).

#### **1.6- Patogenicidade**

O padrão da patogenicidade das infecções causadas por *Candida* está relacionado à combinação de fatores, entre eles, aderência/crescimento/ produção de toxinas e aderência/penetração/crescimento. A patogenicidade

envolve aderência e multiplicação da levedura na superfície das mucosas, com filamentação e formação do tubo germinativo no caso de *Candida albicans* (Liljemark e Gibbons, 1973; Howlett e Squire, 1980; Marrie e Costerton, 1981). Também, por produção de enzimas (fosfolipases e proteinases), por dano tecidual, penetração e resposta inflamatória nos tecidos subjacentes (Odd e Evans, 1980; Montes e Wilborn, 1968; Cawson e Rajasingham, 1972). Isto pode culminar, ocasionalmente, em colonização sistêmica, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e da atividade proliferativa das células de *Candida*, danificando o tecido hospedeiro e causando infecção (Garber, 1960).

Uma vez a *Candida* estabelecida na superfície da mucosa e no processo de penetração pela camada de células epiteliais, a levedura encontra a membrana basal. Esta membrana atua como um filtro e pode impedir a infecção, mas com a sua integridade funcional alterada devido a algum processo de inflamação ou por um dano epitelial, as células de *Candida* entram em contato com o sistema de defesa do hospedeiro (fluidos do tecido, sistema linfático e células fagocíticas) (Odds, 1979; Odd e Evans, 1980, Diamond *et al.*, 1978; Ishikawa *et al.*, 1972; Iannini *et al.*, 1977; Stone *et al.*, 1974). Se o fungo conseguir superar as células fagocíticas, uma micose sistêmica pode se desenvolver (Borg e Ruchel, 1988).

### **1.7- Métodos diagnósticos em candidemia.**

A incidência da candidíase invasiva tem aumentado nas últimas décadas (Vanden Bergh *et al.*, 1999; Walsh e Chanock 1998). O diagnóstico precoce desta doença tem sido extremamente difícil porque os sinais e sintomas clínicos não são específicos, o que leva ao retardo no diagnóstico e, conseqüentemente, ao retardo na terapia antifúngica mais apropriada. Com freqüência, as técnicas microbiológicas tradicionais para diagnóstico da candidíase invasiva falham em detectar a doença, sendo imprescindível recorrer a múltiplas coletas de sangue para que se tenha chance de obter cultura, uma vez que a fungemia é transiente. Além disso, o uso de técnicas invasivas diagnóstico-específicas para estudos histopatológicos não é

recomendado, pois, na maioria das vezes, os pacientes apresentam condições críticas devido ao fato de estarem imunocomprometidos.

Esforços para desenvolver testes diagnósticos rápidos têm estimulado o desenvolvimento de alguns métodos sorológicos para o diagnóstico de infecções por *Candida*. Contudo, a detecção de anticorpos em pacientes com candidemia é de utilidade limitada por duas razões. Primeiro, a colonização por espécies de *Candida* do trato gastrointestinal ou outros sítios podem resultar em formação de anticorpos em indivíduos não infectados. Segundo, pacientes imunocomprometidos podem não apresentar resposta anticórpica, mesmo quando estes apresentam infecção profunda causada por *Candida* spp.

Sendo a candidemia de difícil diagnóstico e causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (Bodey, 1966; Bodey, 1984; Horn *et al.*, 1985; Wey *et al.*, 1988; Brooks, 1989; Komshian *et al.*, 1989; Beck-Sague *et al.*, 1990; Diekema *et al.*, 2002; Hajjeh *et al.*, 2004), métodos de diagnósticos não baseados em culturas têm sido desenvolvidos buscando-se agilidade e maior sensibilidade do diagnóstico e propiciando o início rápido de terapêutica (Cerikcioglu *et al.*, 2004) assim como para um melhor entendimento dos aspectos epidemiológicos da infecção (Al-Jasser & Elkhizzi, 2004).

Vários métodos são utilizados para o diagnóstico das candidemias, cada qual com diferentes tempos para a realização, bem como diferentes percentagens de sensibilidade e especificidade na detecção destes patógenos (Ahmad *et al.*, 2002). Os métodos micológicos tradicionais de cultura, sorologia e estudos morfológicos vêm sendo enriquecidos com as novas aplicações moleculares (Pfaller, 1995) tais como a técnica de PCR e suas variáveis: RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), Nested e Seminested PCR (Ahmad *et al.*, 2002), PCR-enzyme immunoassay (PCR-EIA) (Ahmad *et al.*, 2004) e a técnica de seqüenciamento de DNA (Wahyuningsih *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2002; Chibana & Mikami 2003). Pode-se citar, ainda, como método diagnóstico em candidemias a detecção de anticorpos anti-*Candida*; detecção de antígenos de *Candida* (Reiss & Morrison,



1993; Herent *et al.*, 1992). A detecção de antígenos circulantes apresenta baixa sensibilidade e especificidade, de modo que o diagnóstico pode ser demorado. Em muitos casos, este só é obtido na necrópsia. Métodos diagnósticos usando a detecção antígeno e anticorpo possuem baixa sensibilidade e especificidade (Van-Deventer *et al.*, 1994). A produção de anticorpos em pacientes imunocomprometidos pode ser variável complicando o diagnóstico (Zöller *et al.*, 1991). Outros métodos incluem a detecção de manoses e outros componentes da parede celular (1-3-β-D-Glucan) (Obayashi *et al.*, 1995).

### 1.7.1 - Diagnóstico de candidemia por hemocultura

Existem vários sistemas de hemocultura para detectar a presença de *Candida*, entre eles o sistema de cultura em meio bifásico, e mais recentemente os sistemas de lise centrifugação e radiométrico (BACTEC) (Bodey, 1993). Pereira (1977) relatou, em hospital terciário de ensino localizado em São Paulo, o aumento da participação de espécies de leveduras entre microrganismos responsáveis por infecções na corrente sanguínea de 1,9% para 6,4% (p=0,001), quando comparados os períodos prévios e posteriores à implantação de testes automatizados em hemoculturas.

A utilização de sistemas automatizados em culturas de sangue foi um dos grandes avanços na investigação da candidemia durante as duas últimas décadas (Bodey, 1993). Através dele a detecção de *Candida* spp depende de algumas variáveis como o volume de sangue, condições do meio e atmosfera, concentrações desse patógeno dentro da corrente sanguínea, bem como a espécie (por exemplo: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tendem a ser detectadas com maior antecedência do que *C. krusei* e *C. glabrata*).

A hemocultura é o método básico no diagnóstico da candidemia (Tarrand *et al.*, 1991; Brawner *et al.*, 1992; Hellinger *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 2003), no entanto, nesses pacientes, muitas vezes é difícil detectar *C. albicans*, pois uma possível inibição de seu crescimento pode ocorrer devido a diversos

fatores, tais como o uso prévio de antifúngicos e condições de temperatura inadequadas (Meunier e Klastersky, 1988).

Avanços em métodos de hemoculturas têm aperfeiçoado a detecção de fungemias, no entanto, a rotina para culturas de sangue é pouco sensível, podendo levar vários dias até apresentar resultados positivos. O sistema “Isolator”, de lise centrifugação, que libera fungos de leucócitos, produz um sedimento que é plaqueado em cinco diferentes meios de cultura (Telenti *et al.*, 1991), apresentando vantagens sobre outros métodos, pois reduz o tempo entre a inoculação e a detecção do crescimento (Telenti & Roberts, 1989). Sua utilização em estudo de casos de pacientes de alto risco gerou a média de 2,1 dias para detecção de candidíases disseminadas em culturas de sangue (Telenti *et al.*, 1991).

Também deve ser considerado que pacientes crônicos, com candidíase disseminada, apresentando lesões hepáticas, têm uma baixa frequência de culturas de sangue positivas. Thaler *et al.*, (1988) pesquisando a literatura encontraram apenas cinco pacientes com culturas de sangue positivas entre 60 casos de candidíase hepática e, em oito pacientes com candidíase apresentando lesões hepáticas tratados no “National Cancer Institute” entre 1982 e 1985, apenas dois casos (25%) das culturas de sangue foram positivas.

O isolamento de espécies de *Candida* em culturas de amostras de sangue nem sempre podem ser indicativo de infecção disseminada, embora isso indique cada vez mais que a candidemia benigna é um evento raro, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (Meunier-Carpinter *et al.*, 1981). Ainda segundo esses autores, somente numa pequena proporção de pacientes colonizados por espécies de *Candida* ocorrem infecções hematógenas. A colonização por *C. tropicalis* é uma exceção, uma vez que mais de 50% desses pacientes desenvolvem candidíase no sangue.

A dificuldade em se diagnosticar candidíase disseminada *pré-mortem*, conduz muitos pacientes terminais a não receberem terapia antifúngica já que técnicas de cultura não têm sido suficientes para identificar candidíase

sistêmicas nestes pacientes. Assim, outras técnicas como as sorológicas e métodos enzimáticos têm ajudado na detecção de anticorpos ou antígenos circulantes (Bodey, 1993). Benjamin *et al.*, (2004), conduziram estudo para quantificar a mortalidade associada com hemoculturas positivas e detectaram que candidemia (e também bacteremia por Gram-negativas) estavam associadas com o aumento da mortalidade hospitalar.

Embora a hemocultura seja considerada a técnica “padrão ouro” no diagnóstico de candidemias, o resultado pode permanecer como negativo apesar da disseminação de *Candida* spp. em órgãos internos (Geha & Roberts, 1994). Tal ocorrência somada ao fato de que os sinais e sintomas desta doença não são específicos dificulta o diagnóstico de candidíase disseminada (Rand *et al.*, 1994).

O sistema automatizado de hemoculturas rotineiramente utilizado como ferramenta diagnóstica falha na detecção das leveduras em até 65% (Borst *et al.*, 2001) ou necessita de tempo de incubação prolongada ou subcultura de hemoculturas com resultado negativo, antes que o crescimento da levedura seja detectado (Maksymiuk *et al.*, 1984; Shigei *et al.*, 1995; Tinghitella & Lamagdeleine, 1995). Isso pode ocorrer em função da presença de antifúngicos no sangue do paciente ou baixo número de microrganismos ou até mesmo devido ao uso incorreto do meio mais apropriado para o crescimento da levedura, já que devido ao preço, muitos laboratórios usam somente a garrafa de hemocultura padrão (Fricker-Hidalgo *et al.*, 1998).

### **1.7.2- Diagnóstico sorológico.**

Além dos testes convencionais de detecção de anticorpos, a detecção direta de antígenos de espécies de *Candida* tem se mostrado pouco eficaz em testes para o diagnóstico precoce da doença. Os testes de detecção de antígenos, realizados antes de 1990, têm sido analisados e confirmados

extensivamente em vários laboratórios (de Repentigny, 1992; de Repentigny e Reiss, 1984; Reiss e Morrison, 1993). Testes como o Cand-Tec de aglutinação em látex (Ranco Laboratories, Houston, Texas) que foi o primeiro teste de detecção de antígenos comercialmente usado (Bailey *et al.*, 1985; Lemieux *et al.*, 1990) apresenta variações quanto à sensibilidade e especificidade entre os laboratórios (Bailey *et al.*, 1985; Battafarano *et al.*, 1991; de Lozier *et al.*, 1987; Phillips *et al.*, 1990). Resultados falso-positivos devido ao fator reumatóide foram observados, o que dificultava o diagnóstico dos pacientes e, conseqüentemente, o tratamento (Burnie e Williams, 1985). Recentemente, um novo ensaio de aglutinação em látex de antígenos de *Candida*, o Cand-Tec microtiter system (Cand-Tec MT, Ranço Japan, Japan) é capaz de expressar, através de uma análise colorimétrica, os níveis de antígenos de *Candida* spp. expressos com valor do índice de “cutoff” das amostras. Este ensaio demonstrou ser mais específico e sensível em pacientes imunocomprometidos do que o Cand-tec original. Pode ser usado para o monitoramento do curso clínico de pacientes suspeitos de terem infecção hematológica por *Candida* spp, para diagnóstico precoce e para avaliação precisa dos efeitos terapêuticos de pacientes com candidíase sistêmica (Misaki *et al.*, 2003). [Cand-Tec ( $\geq 1:2$ ) = sensibilidade de 80%, especificidade 79%, Cand-Tec ( $\geq 1:4$ ) = sensibilidade de 60%, especificidade 97% e Cand-Tec MT (infecção por *Candida*  $\geq 1.0$ ) = sensibilidade de 100% e especificidade de 87% (Misaki *et al.*, 2003)].

Outros antígenos-alvo incluem o antígeno protéico citoplasmático de 47 kDa (Matthews e Burnie, 1988) e o antígeno de 48 kDa (Franklyn *et al.*, 1990; Mason *et al.*, 1989) de espécies de *Candida*. O antígeno de 48 kDa que foi reconhecido como enolase (Franklyn *et al.*, 1990; Mason *et al.*, 1989) é um novo marcador para diagnóstico de candidíase invasiva (Hamilton, 1998; Mitsutake *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1991). A antigenemia por enolase foi detectada em pacientes com candidemia, onde o antígeno não está presente naqueles que apresentam colonização superficial por *Candida* e naqueles que não apresentam evidências de candidíases (Mitsutake *et al.*, 1996). Ballantyne e Warmington, (2000), conseguiram detectar enolase das

principais espécies de *Candida* de importância médica: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. lusitanea*.

Outra estratégia de investigação é a detecção de  $\beta$ -(1-3)-D-glucana, componente da parede celular da *Candida*. Altas concentrações de  $\beta$ -(1-3)-D- glucana têm sido detectadas em coelhos que apresentavam candidíase induzida experimentalmente (Miyasaki *et al.*, 1992) e em pacientes com candidíase invasiva (Miyasaki *et al.*, 1995).

A detecção de manana (mananemia) para o diagnóstico de candidíase sistêmica foi sugerida há décadas por Weiner e Coats-Stephen (1979) e agora ele é um dos antígenos mais estudados em pacientes com candidíase. Estudos têm mostrado a correlação entre manana detectada e tecidos invadidos por *Candida* spp. em pacientes com candidemia. Contudo, no passado, o uso de inúmeras técnicas para detecção de manana não resultou em algum teste eficiente, pois todas apresentavam baixa sensibilidade e/ou especificidade (de Repentigny, 1992; de Repentigny e Reiss, 1984; Latge, 1995; Martins *et al.*, 1995). Bournaux *et al.* (1990) calcularam que o ensaio para detecção de manana para diagnóstico de candidíase disseminada apresentava sensibilidade de 29% e especificidade de 97%. Tentativas de aperfeiçoar a detecção imunológica de manana envolvem a dissociação de imunocomplexos pelo aquecimento do soro antes da realização do teste, o uso de um teste que seja mais sensível e o uso de anticorpos monoclonais que reagem com epítomos definidos (Herent *et al.*, 1992; Jacquinet *et al.*, 1998; Reiss *et al.*, 1982).

Alguns anticorpos monoclonais têm sido caracterizados e utilizados em ensaios de imunodiagnóstico. O "AF1" é um dos anticorpos monoclonais que reconhecem uma porção oligossacarídica de um número de manoproteínas de diferentes espécies patogênicas de *Candida*, com exceção da *C. krusei* (De Bernardis *et al.*, 1993; Girmenia *et al.*, 1997; Girmenia *et al.*, 1996). Outro anticorpo monoclonal, 3H8, é uma IgG1 que reconhece apenas manoproteínas de alta massa molecular, presente na parede celular da *C.*

*albicans*, mas não nas outras espécies de *Candida* (Marcilla *et al.*, 1999). Outro anticorpo monoclonal, EB-CA1, para casos em que diferentes espécies de *Candida* possuem a porção do epítipo EB-CA1 distribuído nas mananas e manoproteínas de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Jacquinot *et al.*, 1998). Dois ensaios usam este anticorpo monoclonal, Pastorex *Candida* latex agglutination test (Bio-Rad) e Platelia *Candida* Antigen test (Double-sandwich enzyme immunoassay (EIA) - Bio-Rad) (Sendid *et al.*, 1999). Embora a especificidade destes dois testes seja similar, o EIA é mais sensível do que o teste de aglutinação por látex (Sendid *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram que testes repetidos de soros de pacientes de alto risco com testes, Platelia *Candida* antigen test e dois testes para anticorpos contra manana da *C. albicans* puderam identificar mais pacientes infectados do que apenas o teste de detecção de antígenos (Yera *et al.*, 2001).

Apesar de se tentar aperfeiçoar a detecção de manana para imunodiagnóstico, na maioria dos ensaios, como o teste de aglutinação por látex Pastorex, a técnica apresenta baixa sensibilidade, devido ao rápido “clearance” do antígeno do soro do paciente, especialmente quando apenas uma única amostra de soro é testada no período da suspeita clínica da infecção. No estudo realizado por Sendid *et al.*, (1999), manana foi detectada em 40% dos pacientes, com análise de múltiplas amostras de soros, e em 11% de pacientes, quando apenas uma única amostra de soro foi analisada. Portanto, a repetição das amostras de soros é essencial para aperfeiçoar a sensibilidade de detecção de manana de *Candida*.

Estudos recentes têm sugerido que a detecção combinada do antígeno manana e de anticorpos anti-manana apresentam uma melhora considerável no diagnóstico da candidemia. Fasahat *et al.*, (2007), testaram soros de pacientes com candidemia para detecção do antígeno manana e de anticorpos contra o antígeno manana e determinaram sensibilidade de 41% e 47%, respectivamente. Quando utilizaram os dois testes, nos mesmos soros testados, conseguiram aumentar a sensibilidade para 75%. Sendid *et al.*, (2003), demonstraram que independentemente das espécies de *Candida*

causadora da doença, o uso da detecção combinada do antígeno manana e de anticorpos anti-manana em pacientes com candidemia apresentou sensibilidade maior que 80%. Fasahat *et al.* (2007) realizaram estudo comparando o valor diagnóstico do antígeno (1-3)- $\beta$ -D-glucana em comparação com antígeno manana pelo método de EIA (*Enzymatic immuno assay*) em soro de pacientes com cultura positiva para candidemia e observaram que a combinação dos dois testes aumentou a sensibilidade para 56% quando comparado aos testes isolados. Mitsutake *et al.*(1996) compararam a especificidade e sensibilidade dos antígenos enolase, manana, (1-3)- $\beta$ -D-glucana e Cand-Tec no diagnóstico de 39 pacientes com candidemia e eles sugeriram que a combinação de pelo menos dois testes aumentou significativamente a precisão do diagnóstico da candidemia. Estudos sugerem que o uso combinado das técnicas de detecção do antígeno manana e de (1-3)- $\beta$ -D-glucana pode ser útil para eliminar os resultados falso-positivos que podem ocorrer em pacientes submetidos à hemodiálise ou pacientes internados em centros de terapia intensiva que podem também estar colonizados com espécies de *Candida* (Kanda *et al.*, 2001; Upton *et al.*, 2006).

### **1.7.3.- Diagnóstico de candidemia pela Reação de Polimerização em Cadeia - PCR**

O desenvolvimento de métodos utilizando o DNA para a detecção de espécies de *Candida* mostra-se como um meio adicional e potencialmente mais sensível no diagnóstico de candidíase disseminada (Fujita *et al.*, 1995). Seqüências genômicas podem ser específicas para fungos e distintas daquelas de células de mamíferos e de bactérias. Assim a tecnologia do PCR (Saiki *et al.*, 1988) foi adaptada para amplificar DNA de *Candida* spp. facilitando sua detecção (Miyakawa *et al.*, 1992; Holmes *et al.*, 1994; Crampin e Matthews, 1993; Ellepola *et al.*, 2003; Cerikcioglu *et al.*, 2004).

Sabe-se que em fungemias apenas 1 a 10 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de sangue podem estar presentes, o que pode dificultar o diagnóstico. Esse fato evidencia porque métodos diagnósticos biomoleculares como o da amplificação de DNA são cada vez mais utilizados. Vários grupos têm publicado bons resultados utilizando a PCR com DNA isolado de sangue total para a detecção de candidemias (Klan e Mustafa, 2001; Borst *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2004). O uso de testes baseados em PCR para detectar DNA de *C. albicans* em fluidos corporais produziram resultados encorajadores na investigação de espécies de *Candida* em amostras clínicas de pacientes (Buchman *et al.*, 1990; Hopfer *et al.*, 1993). A técnica de PCR é ideal na detecção de leveduras mesmo quando estas ocorrem em baixas concentrações e em pequenos volumes de sangue (Jordan, 1994).

Os genes que codificam rDNA no genoma dos fungos têm recebido considerável atenção em estudos filogenéticos e investigações epidemiológicas moleculares (Sogin & Gunderson, 1987). Muitos pesquisadores têm utilizado sequências altamente conservadas como genes rRNA (Hopfer *et al.*, 1993; Niesters *et al.*, 1993) ou genes das proteínas do choque térmico *HSP90* (Crampin & Matthews, 1993), como DNA alvo para amplificação. Em algumas dessas técnicas é requerido trabalho intensivo na preparação das amostras, além de enzimas caras e extração do DNA de *Candida* com álcool/clorofórmio para purificar o DNA antes da amplificação por PCR (Buchman *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1995). Como a sensibilidade e a especificidade têm sido variáveis (Buchman *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1995; Miyakawa *et al.*, 1993) é importante coletar amostras clínicas de pacientes com risco elevado para candidemia, reduzindo-se os resultados falsos positivos (Miyakawa *et al.*, 1993).

Segundo alguns autores, a detecção de *C. albicans* recuperadas de amostras clínicas, mesmo após amplificação por PCR, pode apresentar problemas de sensibilidade (Crampin & Matthews, 1993; Buchman *et al.*, 1990; Flahaut *et al.*, 1998), particularmente quando o DNA é recuperado do sangue (Holmes *et al.*, 1994; Miyakawa *et al.*, 1993). Para Erlich *et al.*, (1991), a metodologia da PCR pode levar ao aumento da sensibilidade e especificidade



na detecção de candidemias. Stevens (2002) cita a realização de estudo sobre candidemia utilizando a técnica de PCR com 100% de sensibilidade.

Métodos moleculares que visam a identificação de sequências específicas para espécies de *Candida* e, assim, permitir a sua identificação, também têm sido relatados. Nestes procedimentos, fragmentos genômicos de DNA fúngico são amplificados e testados com oligonucleotídeos específicos, permitindo identificar espécies comuns como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. Lusitaniae*.

## 2- Justificativa

Nas candidemias, cerca de 50% das infecções são causadas por espécies não-albicans, sendo as mais comuns a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Desde os anos 80, a ***C. parapsilosis*** apresenta-se como um importante patógeno hospitalar responsável pelas fungemias, com 7 a 15% das ocorrências. A sua ocorrência ainda é maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva onde a prevalência é de 17 a 50%. A ***C. tropicalis*** é relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua freqüência maior em leucêmicos e menor em pacientes com tumores sólidos. ***C. glabrata*** surge como um importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das séries de candidemia relatada nos Estados Unidos da América e Europa. ***C. krusei*** tem se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplantes de medula óssea.

O diagnóstico precoce de candidemia tem sido extremamente difícil, porque os sinais e sintomas clínicos não são específicos, o que leva ao retardo no diagnóstico e, conseqüentemente, ao atraso na terapia antifúngica mais apropriada, podendo levar à morte do paciente. Em nosso meio, as candidíases mais freqüentes por *Candida* não-albicans são devido à ***C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis***.

Com o objetivo de padronizar um teste que apresente boa sensibilidade e especificidade para detecção de antígeno circulante de espécies de ***Candida***, com interesse clínico, em soros de pacientes imunossuprimidos e possibilitar um diagnóstico precoce de candidemia causadas por estas espécies, pretendemos padronizar a técnica de "ELISA de inibição" para detectar um antígeno comum para as *Candida* de interesse em nosso meio (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) para pesquisar sua presença em soros de pacientes e poder viabilizar tratamento adequado antes da disseminação da doença.

## **2.1- Objetivos específicos**

**2.1.1-** Identificar um antígeno comum presente em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*;

**2.1.2-** Desenvolver modelos experimentais de candidemia para detecção de antígenos circulantes de *Candida* spp. pela técnica de inh-ELISA, utilizando anticorpos policlonais e monoclonais;

**2.1.3-** Padronizar a técnica de ELISA de inibição para diagnóstico de candidemia, por meio de detecção de antígeno circulante (molécula de 65 kDa) em soros de pacientes internados em UTI e suspeitos de candidemia;

**2.1.4-** Verificar a dinâmica desse antígeno em diferentes períodos da internação do paciente;

**2.1.5-** Testar uma possível atividade biológica da molécula de 65 kD;

**2.1.6-** Localizar a glicoproteína de 65 kDa em células de *C. albicans* (ATCC) por imunomarcção pela técnica de imunofluorescência e microscopia eletrônica, utilizando anticorpo monoclonal contra esta glicoproteína;

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. isolados de *Candida* spp.**

Os isolados *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida glabrata* (ATCC 90030) foram selecionados para este estudo e mantidos em ágar Sabouraud, a temperatura ambiente e repicados a cada mês para manutenção.

#### **3.2. Produção de antígeno bruto de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e antígenos brutos de fungos heterólogos.**

##### **3.2.1. Condições de cultura.**

Culturas de *Candida* spp. foram repicadas para vários tubos de ágar Sabouraud e cultivadas a 37 °C, por 3 dias. O crescimento fúngico total de pelo menos 10 tubos foi transferido, com auxílio de alça de platina, para frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo Sabouraud e cultivado durante 3 dias, sob agitação constante, a 50 rpm, a 37 °C, em incubador (Ética equipamentos científicos, modelo 430). A seguir, esse pré-inóculo foi transferido, no fluxo laminar, para frasco tipo “Fernbach”, com capacidade para 2.800 mL, contendo 450 mL de caldo Sabouraud e cultivado por 7 dias, sob as mesmas condições descritas para o pré-inóculo. Depois de constatada a não contaminação e a concentração de  $10^6$  células/ml de meio de cultura, as culturas foram mortas pela a adição de mertiolato de sódio (0,2g/L), por 24 horas, a 4°C. A seguir, as células foram separadas do fluído sobrenadante pela filtração em papel de filtro. O filtrado foi concentrado 20 vezes, por evaporação a vácuo, a 40°C e dialisado contra água destilada, a 5 °C, com várias trocas, por 48 horas. A seguir, o dialisado foi filtrado novamente e concentrado até o volume de 20 ml. A preparação final constituiu o antígeno bruto.

Os antígenos brutos de *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* e *Paracoccidioides brasiliensis* foram preparados como descrito por Smith and Goodman (1975), Biguet *et al.* (1964), and Camargo *et al.* (2003), respectivamente. Antígenos brutos de *Sporothrix schenckii* e *Trichosporum rubrum* foram obtidos com descrito por Camargo *et al.* para *Paracoccidioides brasiliensis* (2003). A dosagem proteica foi determinada pelo método de Bradford (3).

### **3.2.2. Dosagem de proteínas**

A concentração protéica dos antígenos brutos foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando como padrão soro de albumina bovina (Sigma).

## **3. 3. Análise antigênica dos antígenos brutos de *Candida spp.***

### **3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

#### **3. 3.1.1. Preparo do gel**

O gel para eletroforese vertical foi preparado segundo método descrito por Laemmli (1970), em cuba de eletroforese vertical para mini gel (GibcoBRL, modelo Mini 8.10), constando de um gel de separação linear a 10 % de acrilamida e um gel de empilhamento a 3 % de acrilamida polimerizado entre 2 placas de vidro separadas por espaçadores com 0,75 mm de espessura. Um pente com 10 canaletas para molde foi utilizado para a aplicação das amostras.

Os géis foram preparados a partir de soluções de reagentes nas seguintes proporções:

| <i>Solução Estoque</i> | <i>Gel de Separação<br/>(10 %)</i> | <i>Gel de Empilhamento<br/>(3 %)</i> |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|

|  |         |         |
|--|---------|---------|
| Acrilamida-Bisacrilamida<br>(30 % : 0,8 %) | 3 mL    | 1,25 mL |
| Tris 0,75 M, SDS 0,2% pH 8,8               | 4,5 mL  | ---     |
| Tris 0,25 M, SDS 0,2% pH 6,8               | ---     | 2,5 mL  |
| Água Bidestilada                           | 1,25 mL | 1,25 mL |
| Persulfato de Amônia a 10 %                | 90 µL   | 50 µL   |
| N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino<br>(TEMED)  | 4 µL    | 4 µL    |

### 3.3.1.2- Preparo das amostras

Volumes contendo 2 µg em proteína das amostras foram suspensos individualmente em tampão de amostra (Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 20 % de SDS; 10 % de glicerol; 0,1 % de azul de bromofenol), adicionados de 2-mercaptoetanol a 5 %, como agente redutor, no momento do uso. As amostras foram fervidas por 3 minutos e aplicadas nas canaletas do gel. Paralelamente, padrão de peso molecular foi colocado em cada gel. O padrão de peso molecular utilizado é composto de uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (SIGMA) :

- \* miosina (músculo de coelho) (205.000 Da);
- \* β- galactosidase (*Escherichia coli*) (116.000 Da);
- \* fosforilase B (músculo de coelho) (97.000 Da);
- \* albumina bovina (66.000 Da);
- \* ovoalbumina (45.000 Da);
- \* anidrase carbônica (eritrócitos bovinos) (29.000 Da)

### 3.3.2.3. Condições da corrida eletroforética

A corrida eletroforética foi feita a 25 mA até que o corante azul de bromofenol chegue até o fim do gel. O tampão de corrida utilizado foi Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; 0,1 % de SDS e pH final 8,3.

#### **2.3.2.4. Coloração pela prata**

Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com água bidestilada e corado pela prata como descrito por Blum *et al.*, (1987). Os géis foram incubados em solução fixadora (50% metanol e 12% ácido acético glacial) por duas horas, e lavados três vezes com uma solução de etanol 50% (v/v) durante 20 minutos. Em seguida, foram incubados durante 1 minuto em uma solução de 0,02% tiosulfato de sódio, lavados rapidamente três vezes com água destilada e transferidos para uma solução de 0,2% nitrato de prata, contendo 75 µl de formaldeído (37%). Após 20 minutos foram lavados três vezes com água destilada e incubados na solução reveladora (6% carbonato de sódio, 0,05% formaldeído e 2% tiosulfato de sódio) até a visualização das bandas de proteína. A reação foi interrompida por incubação dos géis na solução fixadora (50% metanol e 12% ácido acético) por 20 minutos.

#### **3.4. Purificação da fração de 65 kDa de *Candida albicans*.**

Para obtenção da molécula de peso molecular de 65 kDa de *C. albicans* o exoantígeno foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE a 10 %. Volumes contendo 10 µg de exoantígeno bruto foram suspensos em tampão de amostra (Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 20 % de SDS; 10 % de glicerol; 0,1 % de azul de bromofenol) adicionados de 2-mercaptoetanol a 10 %, e adicionados ao gel. Em paralelo, foi adicionado padrão de peso molecular. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados em solução de cloreto de cobre 0,3M por 10 minutos e descorados em água bidestilada, por 5 minutos. Sob superfície negra, a banda correspondente a proteína de 65 kDa foi cortada, colocada em membrana de diálise e eletroeluída em tampão de transferência (10 mM CAPS, 10% metanol) a 150 mA, durante 1 hora. O produto da eletroeluição foi dialisado contra água bidestilada por 24 h e a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

### **3.5. Produção de anticorpos policlonais anti-gp65 de *C. albicans* em coelhos.**

Para obtenção de anticorpos policlonais anti-gp65 de *C. albicans* foram executadas 3 imunizações (2 subcutâneas e 1 intravenosa) em locais diferentes no dorso do animal (*Oryctolagus cuniculus*), de 3 meses de idade (adulto jovem), albino. Cada injeção consistia de 200 µg da proteína purificada com intervalo de 15 dias cada e uma de 20 µg por via endovenosa. Na primeira imunização, a proteína foi emulsificada em adjuvante de Freund completo; na segunda, em adjuvante de Freund incompleto; a terceira e última imunização foi endovenosa utilizando apenas proteína purificada. Após as imunizações, a titulação do soro foi verificada e quando o título de anticorpos determinado por imunodifusão fosse >1/64, o sangue do animal era retirado por punção cardíaca e o soro separado. Os anticorpos (IgG) foram purificados em coluna de Sepharose Proteína-A (item 3.9.4).

### **3.6. Western blot**

Géis para eletroforese vertical (SDS-PAGE) foram feitos e nas canaletas aplicadas individualmente 10 µg dos antígenos brutos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em contato com membrana de nitrocelulose (Millipore) e montados entre 3 folhas de papel de filtro, 2 esponjas embebidas em tampão de transferência e 2 suportes de acrílico. Em seguida, foi realizada a transferência empregando-se corrente de 150 mA durante 1 hora em uma cuba de eletroforese vertical (GibcoBRL, modelo Mini 8.10). Após o término da transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com solução de Ponceau S (0,15%) por 5 minutos, sob agitação lenta, sendo depois descoradas em água destilada. Os padrões de peso molecular foram marcados com caneta e as canaletas individualizadas.

Os sítios livres da nitrocelulose foram bloqueados com Tampão Tris - 5% de leite desnatado, por 2 horas, sob agitação lenta, à temperatura ambiente.



Após esta etapa, a membrana foi lavada 3 vezes em Tampão Tris, por 10 minutos cada lavagem. A membrana foi cortada em tiras nos locais previamente marcados e colocadas em recipiente que contém várias canaletas, para reagir contra anticorpos policlonais de coelho anti-gp65, na diluição de 1:50. Os anticorpos foram diluídos em tampão Tris, por 1 hora, sob agitação lenta e à temperatura ambiente. Após esta etapa, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 3 vezes com Tampão - Tris, por 10 minutos, cada lavagem. Em seguida, anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma) foram acrescentados à membrana de nitrocelulose nas canaletas, diluídos a 1:1000 em tampão Tris. As membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Logo após, nova etapa de lavagens foram feitas e, então, adicionado o substrato de acordo com a fórmula abaixo:

3,3-diaminobenzidina (DAB).....5 mg

Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4.....50 mg

Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30 %..... 10 µl

Após o aparecimento das bandas a reação foi interrompida adicionando às membranas de nitrocelulose solução de ácido acético glacial a 10% ou água bidestilada.

### **3.7. Modelo murino experimental de candidemia**

Camundongos da linhagem Balb-C, com 2 a 3 semanas de idade foram tratados com ciclofosfamida (150 mg/kilo de animal) durante quatro dias consecutivos. Após tratamento, os camundongos foram inoculados com células vivas de *C. albicans*. O crescimento fúngico foi ajustado para transmitância de 0,6 D.O. a 530 nm. Em seguida, 1 x 10<sup>6</sup> células em 100 µl foram inoculadas por via endovenosa pela veia lateral da calda. O sangue dos camundongos foi

coletado após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção e o soro analisado por ELISA de inibição para detecção de antígeno circulante.

### **3.8. Modelo de candidemia experimental em coelhos**

Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), de 3 meses de idade (adulto jovem), albinos, foram tratados com ciclofosfamida (150 mg/kilo de animal) durante quatro dias consecutivos. Após tratamento, os coelhos foram inoculados com células vivas de *C. albicans*. O crescimento fúngico foi ajustado para transmitância de 0,6 D.O. a 530 nm. Então,  $1 \times 10^6$  células em 100  $\mu$ l foram inoculadas por via endovenosa pela veia lateral da orelha. Após a infecção, o sangue do coelho foi coletado, de 3 em 3 horas até a 12<sup>a</sup> hora. Após as 12 horas iniciais, o sangue foi coletado de 24 em 24 horas. Os soros foram analisados por ELISA de inibição para detecção de antígeno circulante (item 3.12).

### **3.9. Produção de anticorpos monoclonais anti-gp65**

#### **3.9.1. Imunização dos camundongos**

Para obtenção de anticorpos da classe IgG foram executadas 3 imunizações (2 subcutâneas e 1 intraperitoneal) em 4 sítios diferentes (nas patas), cada uma de 20  $\mu$ g da proteína purificada, com intervalo de 15 dias cada. Na primeira imunização, a proteína foi emulsificada em adjuvante de Freund completo; na segunda, em adjuvante de Freund incompleto; a terceira e última imunização foi intraperitoneal utilizando apenas a proteína purificada. Após 14 dias foi realizado um "booster" endovenoso com 20  $\mu$ g de proteína e no dia seguinte retirou-se o baço do animal para a fusão.

### 2.9.2. Fusão de células

A fusão de células seguiu o seguinte protocolo:

1- Foram utilizadas aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células de mieloma (Sp2); as células foram lavadas por centrifugação a 1000 rpm, durante 6 minutos e transferidas para uma placa de Petri contendo 5 ml de RPMI sem soro fetal bovino - SFB. Em seguida, as células foram ressuspensas em 20-30 ml de meio RPMI-1640 completo, acrescido de 10% de SFB e colocadas em tubo cônico de 50ml e incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

2- Retiramos o baço do camundongo previamente imunizado.

3- Realizamos o esmigalhamento do baço com a finalidade de liberar o maior número de células.

4- Transferimos o conteúdo da placa de Petri para um tubo cônico e deixamos em repouso por 5 minutos. Em seguida, adicionamos as células esplênicas ao tubo cônico contendo as células Sp2.

5- Centrifugamos a mistura de células (1000 rpm durante 6 minutos) para obtenção do "pellet" de células a serem fundidas. Removemos o máximo de sobrenadante e dissolvemos o "pellet" com agitação suave. Lavamos mais uma vez em RPMI-1640.

6- Adicionamos 1ml da solução de PEG (agente fusionante) e durante a adição do PEG mantemos o tubo girando para que este tenha maior contato com as células (este procedimento durou aproximadamente 90 segundos).

7- Diluímos lentamente a solução de PEG + células com RPMI-1640, no seguinte esquema de tempo:

1 ml de RPMI-1640 em 30 segundos

3 ml de RPMI-1640 em 30 segundos

12 ml de RPMI-1640 em 60 segundos

8- Completamos o volume para 50 ml com RPMI-1640 e mantemos a suspensão celular em repouso durante 5 minutos.

9- Centrifugamos a 2000 RPM, por 10 minutos, e ressuspendemos as células em 30 ml de RPMI-1640 para nova centrifugação, visando remoção de eventuais resíduos de PEG.

10- Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos em meio HAT (seletivo para hibridomas) em volume adequado para a distribuição nas placas de cultura de 96 orifícios.

11- As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

Aproximadamente em 10 dias os clones foram visualizados, mapeados e testados para verificação da secreção de anticorpos.

### **3.9.3. Formação de Ascite**

Para irritar o peritônio do camundongo foi injetado 1 ml de óleo mineral e, após 3 horas, injetamos, via intraperitoneal, 2 milhões de células (hibridomas). Após 7 a 10 dias, o líquido peritoneal foi coletado para a purificação de anticorpos.

### **3.9.4. Purificação e dosagem dos anticorpos.**

Para purificação dos anticorpos da classe IgG utilizamos o método de cromatografia de afinidade com coluna de Sepharose acoplada com proteína A. A molécula de IgG tem afinidade por esta proteína e liga-se à mesma. Eluímos

a coluna com tampão glicina pH 2,8 e frações de 2 ml foram coletadas em tubos contendo 100 µL de tampão Tris, pH 9,0 para impedir que os anticorpos se denaturem. Utilizamos o corante “Coomassie Brilliant Blue” como descrito por Blakesley and Boezi (1977) para selecionar as amostras que continham os anticorpos. As amostras selecionadas foram dialisadas contra água bidestilada e submetidas à eletroforese (SDS-PAGE), com subsequente coloração pela prata, com o propósito de monitorar sua real purificação. A seguir, as amostras foram dosadas em espectrofotômetro a 280nm. O fator de conversão utilizado foi 1,3 de densidade óptica (DO) para 1,0 mg de anticorpo por ml.

### **3.9.5. Isotipagem dos anticorpos monoclonais anti-gp65.**

Os anticorpos monoclonais foram isotipados utilizando o kit “Mouse Immunoglobulin Screening/Isotyping Kit” (ZYMED- Laboratories Inc. San Francisco-CA-USA).

### **3.10. Coluna Affi-gel 10 acoplada ao anticorpo monoclonal anti-65kDa de *C. albicans* e purificação da gp65.**

O anticorpo monoclonal contra proteína de 65 kDa foi acoplado à resina Affi-gel 10 (Bio-Rad) utilizando 35mg de anticorpo, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Após o acoplamento, foi montada uma coluna em seringa de 1ml e utilizada para purificação da proteína de 65 kDa. O exoantígeno bruto de *C. albicans* foi passado pela coluna por 2 horas. Em seguida, a coluna foi lavada com Tampão Fosfato (0,1M, pH 7,0) e a proteína que se ligou ao MAb foi eluída com tampão glicina pH 2,8. Frações de 2 ml foram coletadas em tubos contendo 100 µL de tampão Tris, pH 9,0 para impedir que a proteína se denature. Utilizamos o corante “Coomassie Brilliant Blue” para selecionar as amostras que continham proteína. As frações

selecionadas foram juntadas, colocadas em membrana de diálise, dialisadas contra água bidestilada e dosadas pelo método de Bradford (1976). Em seguida, submetemos à eletroforese (SDS-PAGE) e subsequente coloração pela prata, com o propósito de monitorar sua real purificação.

### **3.11. Soro de pacientes com candidemia e com outras micoses.**

Um total de 20 pacientes voluntários suspeitos de candidemia foram selecionados entre aqueles que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes estavam internados na U.T.I. do Hospital São Paulo e no GRAAC (Grupo de Apoio à Criança e ao Adolescente com Câncer) entre fevereiro de 2006 e Julho de 2007. Todos foram acompanhados e o seguimento sorológico foi realizado em cada paciente. Pacientes com idade entre 10 a 87 anos (média de 47.1 anos); sendo 45 % dos pacientes do sexo masculino e todos eles expostos a múltiplos fatores de risco para candidemia.

A coleta dos soros (n=74) foi realizada em diferentes intervalos, soros foram coletados antes do diagnóstico de candidemia (n= 10), no dia do diagnóstico (hemocultura positiva pelo BacTec) (n= 20) e após diagnóstico (n= 44).

Soros heterólogos de pacientes com Aspergilose (n=3), Histoplasmoze (n=3), Paracoccidioidomicose (n=3) e Doença de Jorge Lobo (n=3) foram obtidos na soroteca do laboratório de Sorologia das Micose da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP.

### **3.12. ELISA de Inibição**

#### **3.12.1. Princípio da detecção de antígeno circulante pela técnica de ELISA de inibição.**

A detecção de antígeno circulante pela técnica de ELISA de inibição é baseada assumindo-se que a incubação de uma quantidade conhecida de

anticorpo monoclonal (MAb) com uma amostra contendo uma quantidade desconhecida de antígeno circulante formará complexos MAb-antígeno diretamente proporcional. Se esta mistura de MAb-amostra for, então, incubada com uma concentração conhecida de antígeno de *Candida* spp, em uma placa de ELISA, apenas os MAbs específicos livres serão capazes de reagirem com o antígeno ligado. Os MAbs presentes como complexos MAb-antígenos pré-formados não poderão se ligar ao antígeno imobilizado. A quantidade conhecida de MAb que deixou de reagir com o correspondente antígeno homólogo, pode ser então determinado através de um teste ELISA convencional. A densidade óptica obtida a 490 nm é, então, lançada numa curva padrão, construída a partir de dados derivados da incubação do MAb com soro humano normal contendo concentrações conhecidas de antígeno de *Candida* spp no mesmo sistema de ELISA. O grau de inibição na ligação dos MAbs será recíproca à concentração de antígeno circulante na amostra.

### **3.12.2. Tratamento das amostras para uso no teste de ELISA de inibição.**

Alíquotas de soros humanos, de camundongos e coelhos (200 $\mu$ l) foram misturadas com igual volume de EDTA 0,1M , pH 7,2 e fervidas a 100° C por 3-5 minutos. As amostras foram resfriadas e centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado no teste de ELISA de inibição.

### **3.12.3. Tampão de diluição**

As amostras dos soros foram diluídas a 1:2 em tampão de diluição. O tampão de diluição usado consistiu de um “pool” de soro normal (camundongos e/ou coelhos e/ou humanos, dependendo da amostra analisada), diluído 1:5 em PBS 0,005% (v/v) Tween 20 (PBS-T), contendo 20 mM MgCl<sub>2</sub> e Soro Albumina Bovina 1% w/v.

#### **3.12.4. Placa de Inibição**

Nesta placa, alíquotas constantes de Mab (anti-65 kDa de *C. albicans*) (10 µg/ml) foram incubadas durante uma noite com amostras dos soros (camundongos, coelhos ou humanos, dependendo da amostra analisada) para formar complexos MAb/antígeno circulante. Placas de poliestireno de fundo chato foram inicialmente bloqueadas pela incubação de 200 µl/orifício de 5% w/v BSA em PBS 0,05% de Tween-20 (BSA-PBS-T), por 2 horas a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-T, 100 µl de soro teste (camundongos, coelhos ou humanos, dependendo da amostra analisada) e controle, diluídos a 1:2 em tampão de diluição foram adicionados. Em seguida, 100 µl de MAb diluído no tampão foram colocados nos orifícios contendo as amostras de soro (camundongos, coelhos ou humanos, dependendo da amostra analisada). As placas foram agitadas em plataforma orbital por 30 minutos, à temperatura ambiente e incubadas por uma noite a 4°C.

#### **3.12.5. Curva Padrão de Inibição**

Uma curva padrão de inibição foi construída em cada placa pela adição de alíquotas de 100µl de MAb contendo concentrações decrescentes de antígeno em tampão de diluição. Soro normal (camundongos e/ou coelhos e/ou humanos, dependendo da amostra analisada) diluído a 1:2, em tampão de diluição (100µl), foi usado como controle negativo. As placas foram agitadas e incubadas por uma noite a 4°C.

#### **3.12.6. Placa de Reação**

Placas de ELISA, de fundo chato com 96 orifícios (NUNC- FluoroNunc Plates-MaxiSorp) foram sensibilizadas com 250 ng/orifício de antígeno de 65



kDa de *C. albicans* (100µl por orifício), diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 e incubadas por 2 horas, à temperatura de 37°C e uma noite a 4°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com uma solução de BSA a 1% w/v em PBS-T, por 2 horas, a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-T, 100µl dos conteúdos de cada orifício da placa de inibição (contendo a mistura de complexo MAb-antígeno circulante e MAb livre) foram transferidos para os respectivos orifícios na placa de reação e incubados por 2 horas, a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e adicionados 100µl/orifício de conjugado de carneiro anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho ou anti-IgG de humano (dependendo do sistema analisado) na diluição de 1:1000, em PBS-T-BSA a 1% e incubadas novamente por mais 2 horas a 37°C.

As placas foram lavadas novamente (3X com PBS-T) e 100 µl/orifício de solução de ECL (PIERCE) diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 foram adicionados. As placas foram incubadas por 15 minutos no escuro e as densidades ópticas foram medidas em leitor de quimioluminescência (Multiskan MCC /340P).

### **3.13. Ensaios para determinação do possível papel biológico da proteína de 65 kDa de *C. albicans***

#### **3.13.1. Ação do anticorpo monoclonal no crescimento de células de *C. albicans* “in vitro”.**

Células de *C. albicans* foram cultivadas por 24 horas em caldo Sabouraud, a 36°C e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS estéril, por centrifugação. Em seguida,  $1 \times 10^3$  células foram tratadas com diferentes concentrações de MAb anti-65 kDa de *C. albicans*. As células foram homogeneizadas em tubos do tipo ependorf (1,5 ml) com 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 mg/ml de MAb anti-65 kDa de *C. albicans*, diluído em água Milli-Q estéril e mantidas sob agitação constante por 16 horas a 4°C. Após este período, as

células foram cultivadas em meio ágar-Sabouraud e mantidas em estufa a 36°C. O crescimento fúngico foi acompanhado diariamente por uma semana e as unidades formadoras de colônias contadas.

### **3.14.2. Determinação da unidade formadora de colônia (UFC) de *C.albicans* “in vivo”.**

Vinte camundongos da linhagem Balb/C, com 2 a 3 semanas de idade, foram tratados com ciclofosfamida (150 mg/kilo de animal) durante quatro dias consecutivos. Após tratamento, um grupo de camundongos foi inoculado com  $1 \times 10^6$  células vivas de *C. albicans*, crescidas a 37°C, por via endovenosa (grupo controle) e três grupos, 30 minutos antes da inoculação foram tratados com concentrações determinadas (0,1, 0,5 e 1,0 mg/ml) de MAb anti-65 kDa de *C. albicans*, por via intraperitoneal. Os camundongos tratados foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células vivas de *C. albicans* por via endovenosa. Após 3 semanas, os camundongos foram sacrificados e o rim, pulmão, baço e fígado retirados. Os órgãos foram pesados e macerados em uma solução de PBS estéril e 100 µl do macerado foram semeados em meio de agar Sabouraud/ciclohexamida e mantidos em estufa a 36° C. O crescimento fúngico foi acompanhado durante 1 semana e as UFC foram contadas diariamente.

## **3.15. Imunodeteção da molécula de 65 kDa na célula de *C. albicans*.**

### **3.14.1. Ensaio de imunofluorescência direta utilizando MAb anti-gp65 de *C. albicans*.**

O crescimento fúngico total de pelo menos 2 tubos de *C. albicans* em ágar Sabouraud a temperatura de 36 °C, foi transferido, com auxílio de alça de platina, para frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo

Sabouraud e cultivado durante 3 dias, sob agitação constante (50 rpm), a 37 °C, em incubador com agitação (Ética equipamentos científicos, modelo 430). Depois de constatada a não contaminação, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com 2,5 % de glutaraldeído por 1 hora. Em lâminas de microscopia óptica, tratadas com polilisina, por 10 minutos, foram adicionadas 20 µl das células fixadas. Após 10 minutos as células estavam aderidas à lâmina e foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween (0,05%). Em seguida, as células foram tratadas com metaperiodato de sódio saturado, por 10 minutos e lavadas três vezes com PBS-Tween (0,05%). Após, as células foram tratadas com cloreto de amônia (50 mM), por 15 minutos, lavadas 3 vezes com PBS-Tween (0,05%) e bloqueadas com solução de PBS/soro fetal bovino (5%), por 1 hora. Então, foi adicionado 100 µg/ml de MAb anti-gp65 kDa, por 1 hora. A seguir as células foram lavadas com PBS-Tween (0,05%) e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com FIT-C (diluição a 1:200) foi adicionado e incubado por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-Tween (0,05%), as lâminas foram vedadas e observadas em microscópio de fluorescência em aumento de 1000 X.

### **2.15.2. Imunomarcação por microscopia eletrônica de transmissão.**

O crescimento fúngico total de pelo menos 2 tubos de *C. albicans*, crescida a temperatura de 36°C, foi transferido, com auxílio de alça de platina, para frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo Sabouraud e cultivado durante 3 dias, sob agitação constante (50 rpm) a 37 °C, em incubador (Ética equipamentos científicos, modelo 430). Depois de constatada a não contaminação, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com 3% formoldeído / 0,5% glutaraldeído em PBS, por 3 horas. As células foram centrifugadas a 3000g, lavadas 3 vezes com PBS e ressuspendidas com metaperiodato de sódio (1% em água) e incubadas por 15 minutos. As células foram centrifugadas a 3000g, lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por 15 minutos com cloreto de amônia (1% em PBS). Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com PBS. Ao precipitado celular foi acrescentado o mesmo volume de gelatina (10% em PBS) a 37°C, homogenizado e centrifugado por 10 segundos a 3000g. Com a gelatina solidificada, o “pellet” foi retirado e cortado, com auxílio de uma lâmina, em

pequenos cubos com bases de 1mm<sup>2</sup>. As cubos foram colocados em solução de sucrose 2,3M e mantidas sob agitação constante a 4°C, por 16 horas. Os cubos foram retiradas da solução de sucrose 2,3M, colocadas no aparato de congelamento e congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram cortadas, com uma espessura de 70nm, em um ultramicrótomo, ajustado à temperatura de -120°C. Os cortes foram acondicionados em telas de níquel com 200 orifícios e conservadas em 2% de gelatina em câmara úmida a 4°C.

### **3.15. Imunomarcação**

A tela de níquel com os cortes foi colocada sobre uma gota (40µl) de PBS-glicina a 0,15%, por 5 minutos e transferidas para uma gota de PBS/soro fetal bovino 5%, por 3 minutos. Após, as telas foram transferidas para uma gota de anticorpo primário (mAb contra gp65) na concentração de 500 µg/ml, por 1 hora. Então, transferidas para gotas de PBS/glicina, por 3 minutos e para gotas de PBS/soro fetal bovino 5%, por 5 minutos. Em seguida, foram transferidas para uma gota de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com ouro coloidal (12 nm) (Sigma), por 20 minutos. As telas foram lavadas com 6 gotas de PBS, por 3 minutos e transferidas para uma gota de glutaraldeído a 1% em PBS, por 5 minutos. Após, foram lavadas em 10 gotas de água e transferidas para uma gota de metilcelulose/acetato de uranila (9:1), por 10 minutos, a 4°C. Com o auxílio de uma alça, a tela de níquel foi retirada da metilcelulose/acetato de uranila e o excesso foi retirado em um papel de filtro. Após 24 horas a tela foi observada em um microscópio eletrônico e os cortes fotografados.

### **3.16. Ensaio de aderência do antígeno de 65 kDa à fibronectina.**

#### **3.16.1. Purificação de fibronectina do plasma sanguíneo.**

Plasma humano fresco foi centrifugado a 7000 x g por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado fluoreto de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) na

concentração final de 1mM, posteriormente diluído (v/v) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo Thimerosal a 0,01%.

Fibronectina foi purificada a partir do plasma humano diluído por meio de cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-gelatina. À coluna, previamente lavada exaustivamente com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, foi aplicado lentamente plasma humano diluído (1:5). Após a passagem, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, para remoção das proteínas irrelevantes. A eluição de fibronectina foi efetuada passando tampão Tris-uréia 4M, pH 7,4. Os eluatos foram recolhidos em tubos de 2 ml. A mensuração do material eluído foi feita pelo método de Bradford (1976). Os tubos que continham a proteína foram exaustivamente dialisados contra PBS (1x) contendo 1mM PMSF. As amostras foram monitoradas quanto a sua pureza em gel de SDS-PAGE.

### **3.16.2. SDS-PAGE**

Alíquotas de 20 µg de fibronectina foram submetidas à eletroforese unidimensional conforme descrito no item 3.3.1.

### **3.16.3. Western blot**

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em contato com membrana de nitrocelulose (Millipore) e montados entre 3 folhas de papel de filtro, 2 esponjas embebidas em tampão de transferência e 2 suportes de acrílico. Em seguida, foi realizada a transferência empregando-se corrente de 150 mA durante 1 hora em uma cuba de eletroforese vertical (GibcoBRL, modelo Mini 8.10). Após o término da transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com solução de Ponceau S (0,15%) por 5 minutos, sob agitação lenta, sendo depois descoradas em água destilada. Os padrões de peso molecular foram marcados com caneta e as canaletas individualizadas.

Os sítios livres da nitrocelulose foram bloqueados com Tampão Tris - 5% de leite desnatado, por 2 horas, sob agitação lenta, à temperatura ambiente.

Após esta etapa, a membrana foi lavada 3 vezes em Tampão Tris, por 10 minutos cada lavagem. A membrana foi cortada em tiras nos locais previamente marcados e colocadas em recipiente que contém várias canaletas, para reagir contra a proteína de 65 kDa purificada de exoantígenos de *C. albicans*, na concentração de 5 µg/ml. A proteína foi diluída em tampão Tris e mantida, por 1 hora, sob agitação lenta e à temperatura ambiente. Após esta etapa, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 3 vezes com Tampão - Tris, por 10 minutos, cada lavagem. Em seguida, anticorpos monoclonais contra a proteína de 65 kDa, foram acrescentados por canaleta à membrana de nitrocelulose, na concentração de 10 µg/ml em tampão Tris, e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma), foram acrescentados por canaleta à membrana de nitrocelulose, diluídos a 1:1000 em tampão Tris e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Logo após, nova etapa de lavagens foram feitas e, então, adicionado o substrato de acordo com a fórmula abaixo:

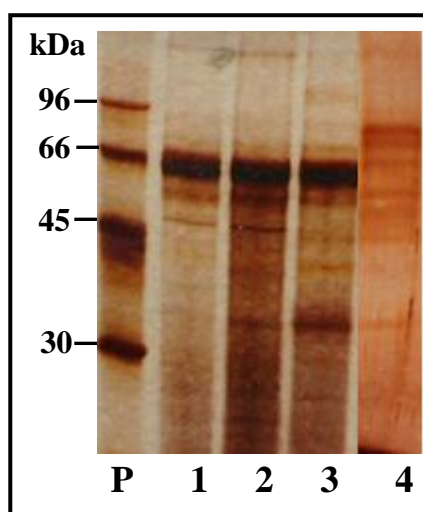
3,3-diaminobenzidina (DAB).....5 mg  
Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4.....50 mg  
Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30 %..... 10 µl

Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida colocando as membranas de nitrocelulose em solução de ácido acético glacial a 10% ou em água bidestilada.

## 4- Resultados

### 4.1. Perfil protéico/glicoprotéico dos exoantígenos brutos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

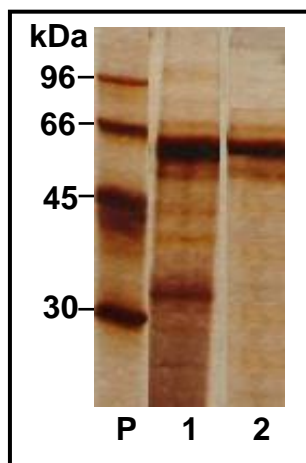
A figura 1 mostra o perfil protéico/glicoprotéico de exoantígenos brutos de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. O gel SDS-PAGE mostrou a presença de uma banda de 65 kDa presente nos exoantígenos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e sua ausência no exoantígeno de *C. glabrata*.



**Figura 1-** Perfil eletroforético por SDS-PAGE dos exoantígenos de *Candida tropicalis* (coluna1), *C. parapsilosis* (coluna 2), *C. albicans* (coluna 3) e *C.glabrata* (coluna 4). P- Padrão de peso molecular.

### 4.2. Purificação da proteína de 65 kDa a partir do exoantígeno bruto de *C. albicans*.

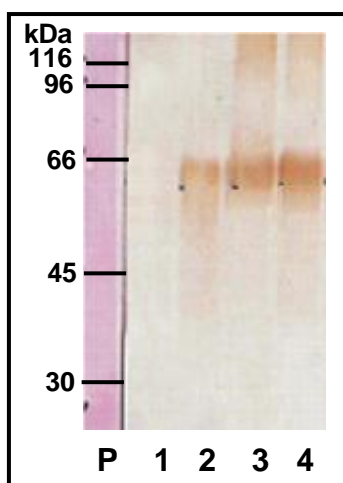
A figura 2 mostra o perfil protéico/glicoprotéico do exoantígeno bruto de *C. albicans* (Coluna 1) e a proteína de 65 kDa purificada por eletroeluição (Coluna 2).



**Figura 2-** Perfil eletroforético por SDS-PAGE do exoantígeno bruto de *C. albicans* (1) e a molécula de 65 kDa purificada (2). P- Padrão de peso molecular.

#### 4.3. *Western blot* utilizando anticorpos policlonais (IgG) contra a molécula de 65 kDa de *Candida* spp.

Após a corrida eletroforética e transferência para a membrana de nitrocelulose de 10 µg de exoantígenos brutos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, realizou-se o teste de *Western blot* e observou-se a reatividade do anticorpo policlonal IgG anti-65 kDa contra a proteína de 65 kDa de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Figura 3).



**Figura 3-** Resultado do *Western blot* utilizando IgG de soro de coelho (1/50) anti-65 kDa de *C. albicans* contra exoantígenos brutos de *C. glabrata* ATCC (1), *C. tropicalis* ATCC (2), *C. parapsilosis* ATCC (3) e *C. albicans* ATCC (4). P- Padrão de peso molecular.

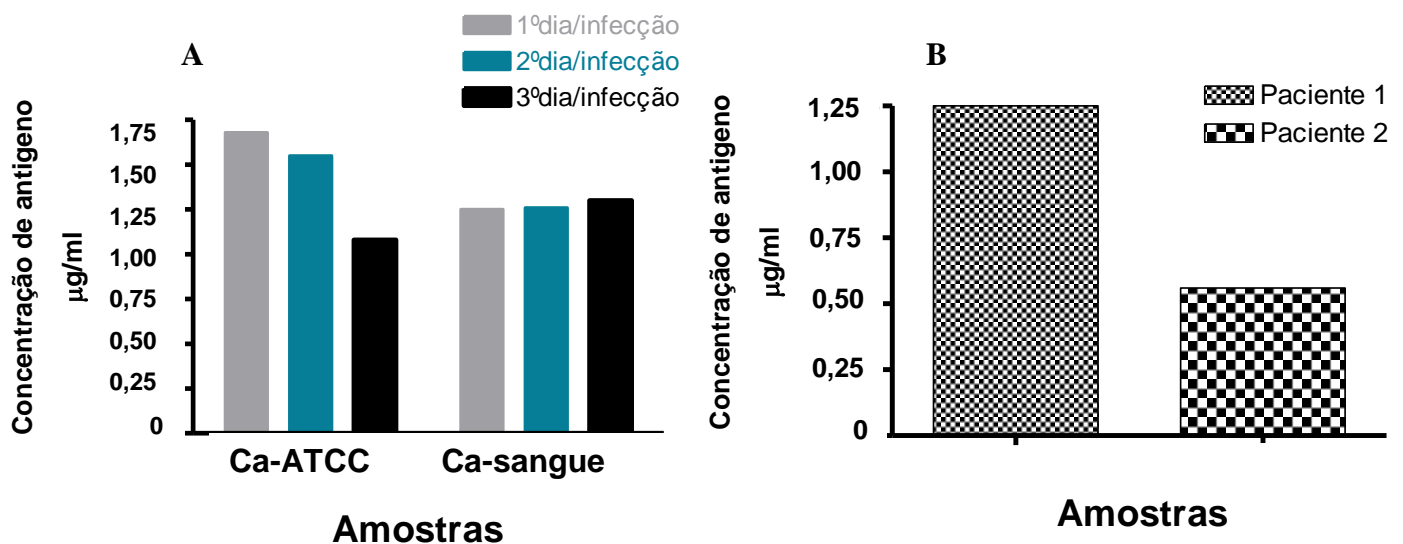


#### **4.4. Resultados do teste de ELISA de inibição para detecção de antígeno circulante, em modelo murino experimental de candidemia e em soro de dois pacientes com candidemia.**

O teste de ELISA de inibição foi realizado para determinação da concentração do antígeno de 65 kDa circulante no soro de camundongos previamente imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* ATCC e *C. albicans* isolada de sangue. Para este ensaio utilizamos o anticorpo policlonal de coelho contra proteína de 65 kDa. Os soros dos camundongos foram coletados no primeiro, segundo e terceiro dia de infecção. Observou-se que no grupo infectado com *C. albicans* (ATCC), houve uma diminuição na concentração do antígeno circulante nos 3 dias de infecção, sendo 1,68 µg/ml, 1,55 µg/ml e 1,08 µg/ml, respectivamente. No grupo infectado com *C. albicans* (sangue) não houve diferença significativa entre o primeiro, segundo e terceiro dia de infecção, respectivamente, 1,25 µg/ml, 1,30µg/ml e 1,36 µg/ml (Figura 4A).

Nota: Testamos também 2 soros de pacientes com candidemia para simples verificação do sistema. O teste foi positivo e os pacientes apresentaram concentração de proteína de 1,25 µg/ml (paciente 1) e 0,56µg/ml (paciente 2) (Fig. 4 B).

### ELISA de inibição/Quimioluminescência

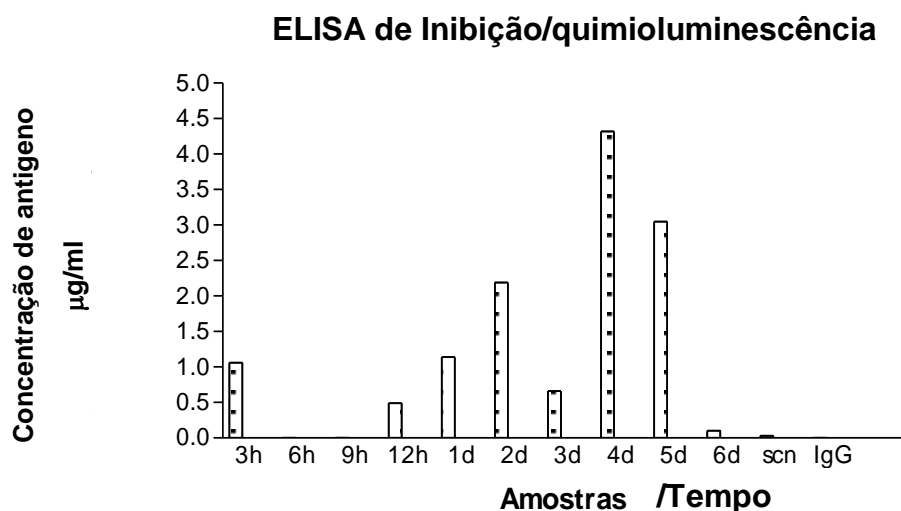


**Figura 4- A:** Concentração de antígenos circulantes em modelo murino experimental de candidemia por *C. albicans* (*C.a*-ATCC e *C.a*-sangue) **B:** Concentração de antígenos circulantes em 2 soros de pacientes com candidemia (paciente 1 e paciente 2).

#### 4.5- ELISA de inibição para determinação de antígeno circulante em modelo de candidemia experimental em coelho.

O ensaio de ELISA de inibição foi realizado para determinação da concentração do antígeno de 65 kDa circulante no soro de coelhos previamente imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* (ATCC), por via endovenosa. Para este ensaio utilizamos o anticorpo policlonal de coelho contra proteína de 65 kDa. Os soros dos coelhos foram coletados de 3 em 3 horas a partir da infecção e, após as primeiras 12 horas, de 24 em 24 horas. Observou-se que, nas primeiras 3 horas de infecção, conseguiu-se detectar antígeno circulante na concentração de 1,06  $\mu\text{g/ml}$ ; nas 6 horas subsequentes o antígeno não foi detectado (Figura 5). A partir da 12ª hora após infecção houve aumento da concentração de antígeno circulante até a 24ª hora, respectivamente 0,49  $\mu\text{g/ml}$ , 1,14  $\mu\text{g/ml}$  e 2,19  $\mu\text{g/ml}$ , com uma queda no 3º

dia (0,66  $\mu\text{g/ml}$ ), atingindo o máximo de detecção, no 4º dia pós-infecção (4,32  $\mu\text{g/ml}$ ). A partir do 5º e 6º dias, houve diminuição de antígeno circulante, 3,05  $\mu\text{g/ml}$  e 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Como controle utilizamos soro de coelho normal (pré-infecção) e o anticorpo policlonal como controle negativo.



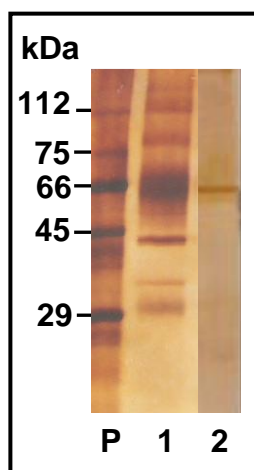
**Figura 5-** Detecção de antígeno circulante (65kDa) em modelo de candidemia experimental em coelhos nos tempos de 3h, 6h, 9h, 12h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d- pós-infecção; Controles negativos: scn (soro normal de coelho - pré-infecção); IgG normal de coelho.

#### 4.6. Obtenção de anticorpos monoclonais anti-gp65.

Foram obtidos 16 anticorpos monoclonais anti-gp65 (MAb anti-gp65) que foram testados pelo ensaio de ELISA, com placas sensibilizadas com gp65 (250ng/orifício) e reveladas por quimioluminescência. Leituras superiores a 80.000 unidades de fluorescência foram consideradas clones positivos. Os anticorpos foram isotipados para determinação de suas classes e subclasses. Dos 16 anticorpos obtidos, 7 eram IgG1, 2 eram IgG2a, 2 eram IgA e 5 eram IgM. Para este estudo utilizaremos o anticorpo IgG1-2 (MAb IgG1-2 anti-gp65) como padrão.

#### 4.7. Purificação da proteína de 65 kDa com anticorpo monoclonal IgG1-2.

O anticorpo monoclonal contra a proteína de 65 kDa (IgG1-2) foi acoplado a resina Affi-gel 10 e empacotada em coluna para purificação da proteína de 65 kDa. Exoantígenos brutos de *C. albicans* foram passados pela coluna. A coluna foi lavada com Tampão Fosfato (0,1M, pH 7,0) e a proteína que se ligou ao MAb foi eluída com tampão glicina pH 2,8. O eluído da coluna foi submetido à corrida eletroforética e corado pela prata. Podemos observar na figura 6 que a proteína de 65 kDa foi purificada (coluna 2).

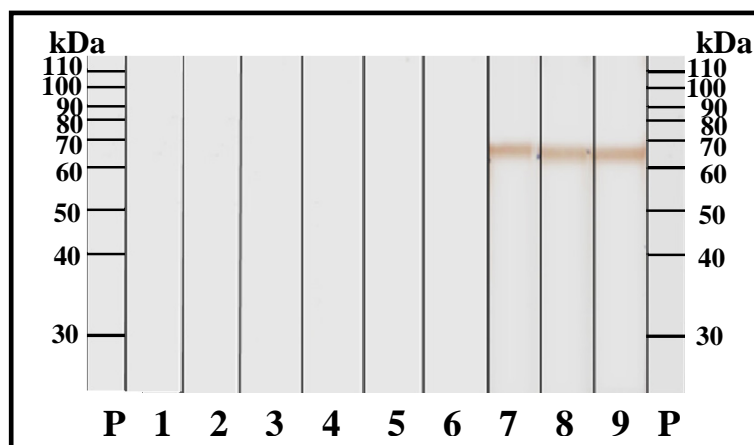


**Figura 6-** SDS-PAGE mostrando a purificação da gp65 de *C. albicans*. P- Padrão de peso molecular, 1- Exoantígeno bruto de *C. albicans* e 2-Proteína de 65 kDa.

#### 4.8. Western blot utilizando MAb anti-gp65 (IgG) *C. albicans* versus exoantígenos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e exoantígenos heterólogos.

Após a corrida eletroforética de 10 µg de exoantígenos brutos de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e os exoantígenos heterólogos *H. capsulatum*, *A. fumigatus*, *S. schenckii*, *P. brasiliensis*, *T. rubrum* foram transferidos para a membrana de nitrocelulose. Foi realizado o teste de Western blot e observamos que o Mab anti-65 kDa de *C. albicans* reconhece a molécula de 65 kDa de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e não

reconhece em *C. glabrata*, indicando que as moléculas de 65 kDa das 3 espécies possuem epitopos comuns (Figura 7).



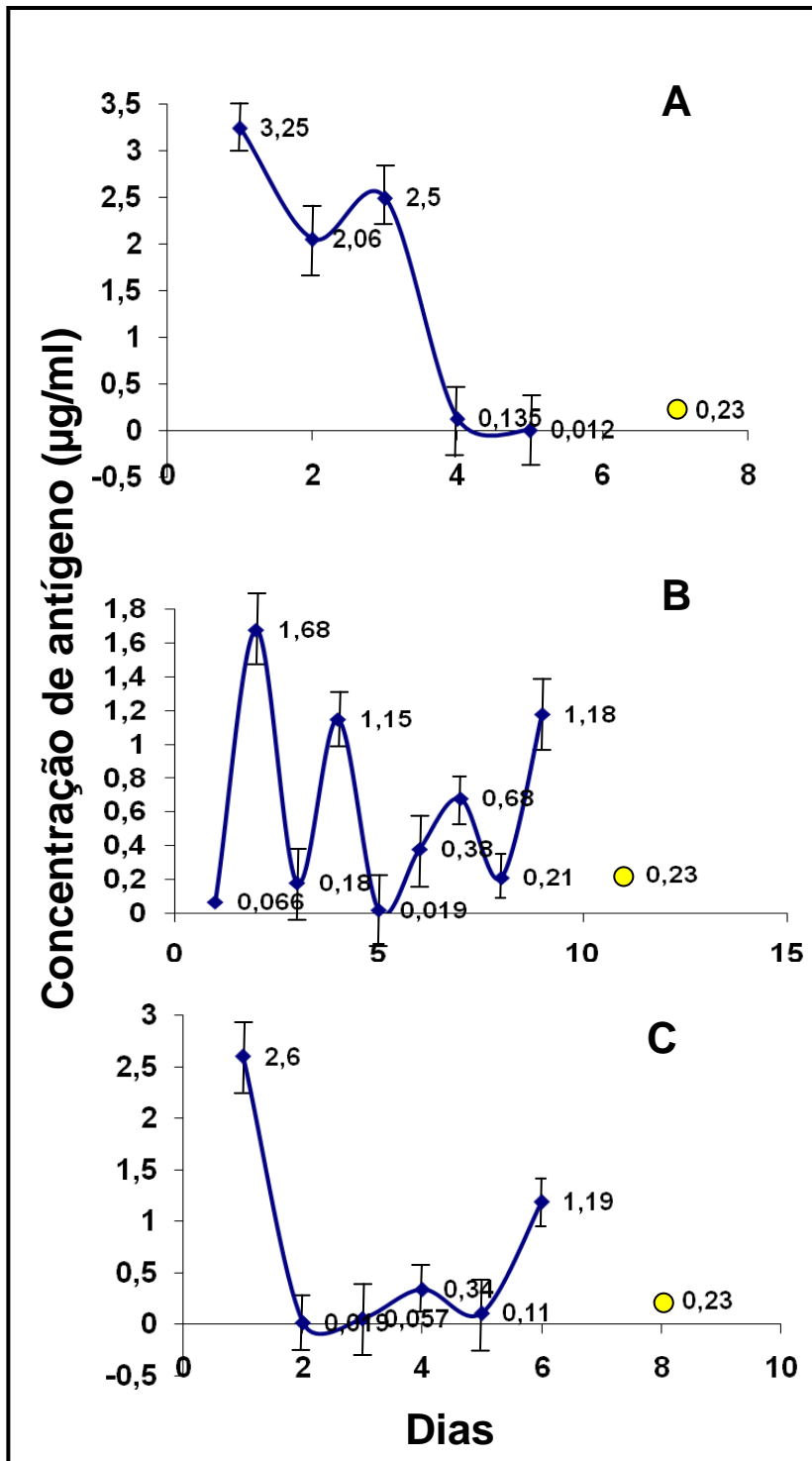
**Figura 7-** Reatividade do Mab anti-65kDa de *C. albicans* reconhecendo a proteína de 65kDa de *C. albicans* (coluna 9), *C. parapsilosis* (coluna 8) e *C. tropicalis* (coluna 7). Coluna 1 = *H. capsulatum*; coluna 2 = *A. fumigatus*; coluna 3 = *S. schenckii*; coluna 4 = *P. brasiliensis*; coluna 5 = *T. rubrum*; coluna 6 = *C. glabrata*.

#### **4.9. ELISA de inibição para detecção e quantificação de antígeno circulante em modelo murino experimental de candidemia por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.**

Realizamos o ensaio de ELISA de inibição para detecção e quantificação do antígeno de 65 kDa circulante no soro de camundongos infectados com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Para este ensaio utilizamos o Mab anti-65 kDa de *C. albicans*. Os soros dos camundongos foram coletados diariamente após a infecção. Observou-se um padrão variado na detecção do antígeno circulante no segmento de cada grupo de camundongos. Observou-se um pico de detecção de 3,25 µg/ml de antígeno circulante e um possível “clearance” do antígeno durante a candidemia no grupo infectado com *C. tropicalis* (Figura 8-A). No grupo infectado com *C. parapsilosis* observou-se um pico de detecção de 1,68 µg/ml e, também, um possível “clearance” durante a candidemia (Figura 8-B). Já no grupo infectado com *C. albicans* observou-se um pico de detecção de 2,6 µg/ml no primeiro dia de infecção e um possível “clearance” nos dias consecutivos (Figura 8-C). Como controle, utilizamos soro de camundongo normal (pré-

infecção). Nos 3 grupos o teste de inh-ELISA detectou antígeno circulante em pelo menos uma das amostras de soro.



**Figura 8-** Detecção de antígeno circulante (gp65) em modelo murino experimental de candidemia por *C. tropicalis* (A), *C. parapsilosis* (B) e *C. albicans* (C) utilizando Mab anti 65 kDa de *C. albicans*. Controle: soro de camundongo normal = 0,23 D.O. (bola amarela).

#### **4.10. ELISA de inibição para detecção e quantificação de antígeno circulante (65kDa) em pacientes suspeitos de candidemia por *C. albicans*, *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis*.**

Realizamos o ensaio de ELISA de inibição para detecção e quantificação do antígeno circulante de 65 kDa em soros de **20** pacientes suspeitos de candidemia, internados na U.T.I. do Hospital São Paulo e no GRAAC (Grupo de Apoio à Criança e ao Adolescente com Câncer).

Para este ensaio utilizamos o Mab anti-65 kDa de *C. albicans*. A coleta de sangue dos 20 pacientes resultou em 74 amostras de soros. Foi realizado um segmento sorológico dos pacientes: soros dos pacientes foram coletados antes do diagnóstico de candidemia (n= 10), no dia do diagnóstico (hemocultura positiva pelo BacTec) (n= 20) e após diagnóstico (n= 44).

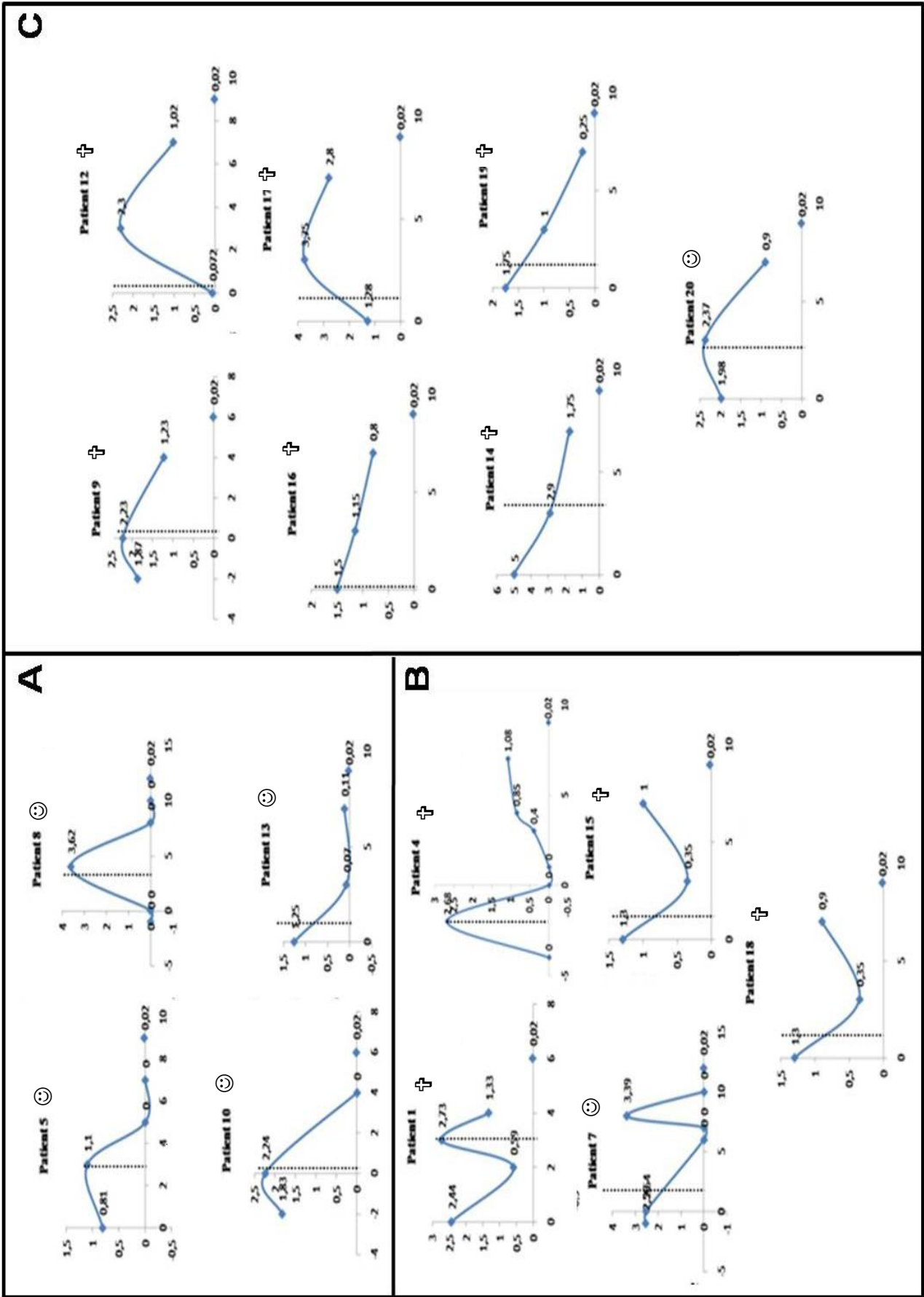
Observou-se três diferentes dinâmicas de antigenemia do antígeno de 65 kDa nestes pacientes. Quatro pacientes apresentaram um clareamento total da molécula, após o tratamento com drogas antifúngicas. A concentração da molécula de 65 kDa na última amostra testada foi < a 0,11µg/ml. Cinco pacientes apresentaram um clareamento inicial, após o tratamento antifúngico (com excessão do paciente número 1) e reincidiva da antigenemia. Sete pacientes apresentaram um clareamento parcial da antigenemia, onde a concentração da molécula de 65 kDa na última amostra foi > 0,25 µg/ml. Observamos que os pacientes que persistiram com a antigenemia, em níveis superiores a 0,25 µg/ml, após o tratamento antifúngico, foram a óbito.

Dos 20 pacientes suspeitos de candidemia e confirmados pelo Bactec e por hemocultura, 16 apresentaram o antígeno circulante (65 kDa) em pelo menos uma das amostras de soro. Os 4 pacientes restantes não apresentaram antigenemia por 65 kDa em nenhum dos soros coletados.

A figura 9 mostra a dinâmica de antigenemia pela proteína de 65 kDa no soro de 16 pacientes que apresentaram a detecção deste antígeno em pelo

menos uma das amostras de sangue coletadas. A tabela 1 mostra os dados encontrados e a concentração de antígeno no sangue dos pacientes no momento do diagnóstico pelo Bactec.





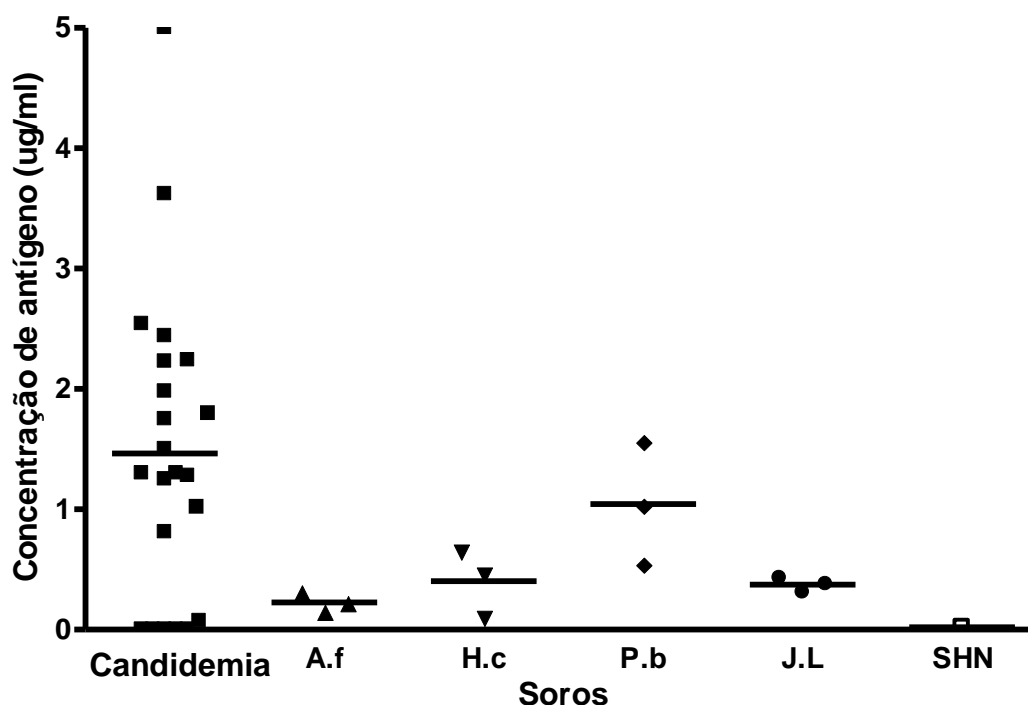
**Figura 9-** Representação esquemática da dinâmica de antigenemia por gp65 de *C. albicans* em 16 pacientes com candidemia. A= Pacientes com clareamento total da molécula após tratamento com antifúngico; B= Pacientes com clareamento inicial da molécula após tratamento antifúngico e recidiva da antigenemia. ☹= pacientes com clareamento parcial da antigenemia. ☺= pacientes que sobreviveram. †= pacientes com óbito.

**Tabela 1-** Detecção de antígeno de 65 kDa de *C. albicans* por ELISA de inibição em soros de pacientes com candidemia e as espécies de *Candida* isoladas. **Em negrito o dia da positividade pelo BacTec.**

| Pacientes | Soros coletados e [ ] (µg/ml) do antígeno de 65 kDa              |             |             |          |      |     |      |      | BacTec+<br>Espécies isoladas |
|-----------|--|-------------|-------------|----------|------|-----|------|------|------------------------------|
|           | Número em negrito representa o momento de positividade do BacTec |             |             |          |      |     |      |      |                              |
|           | 1°   | 2°          | 3°          | 4°       | 5°   | 6°  | 7°   | 8°   |                              |
| 1         | <b>2,44</b>  | 0,59        | 2,73        | 1,33     |      |     |      |      | <i>C. tropicalis</i>         |
| 2         | 0  | <b>0</b>    | 0           | 0        |      |     |      |      | <i>C. kefyr</i>              |
| 3         | 0  | <b>0</b>    | 0           | 0        |      |     |      |      | <i>C. glabrata</i>           |
| 4         | 2,68   | 0           | 0           | <b>0</b> | 0    | 0,4 | 0,85 | 1,08 | <i>C. albicans</i>           |
| 5         | <b>0,81</b>  | 1,1         | 0           |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 6         | <b>0</b>   | 0           | 0           |          |      |     |      |      | <i>C. glabrata</i>           |
| 7         | 2,56   | <b>2,54</b> | 0           | 0        | 3,39 | 0   | 0    |      | <i>C. parapsilosis</i>       |
| 8         | 0  | 0           | <b>3,62</b> | 0        | 0    |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 9         | 1,87   | <b>2,23</b> | 1,23        |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 10        | 1,83   | <b>2,24</b> | 0           |          |      |     |      |      | <i>C. tropicalis</i>         |
| 11        | <b>0</b>   | 0           | 0           |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 12        | <b>0,072</b>   | 2,3         | 1,02        |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 13        | <b>1,25</b>  | 0,07        | 0,11        |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 14        | <b>5,0</b>   | 2,29        | 1,75        |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 15        | <b>1,3</b>   | 0,35        | 1           |          |      |     |      |      | <i>C. tropicalis</i>         |
| 16        | <b>1,5</b>   | 1,15        | 0,8         |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 17        | <b>1,28</b>  | 3,75        | 2,8         |          |      |     |      |      | <i>C. tropicalis</i>         |
| 18        | <b>1,3</b>   | 0,35        | 0,4         |          |      |     |      |      | <i>C. tropicalis</i>         |
| 19        | <b>1,75</b>  | 1           | 0,25        |          |      |     |      |      | <i>C. albicans</i>           |
| 20        | <b>1,98</b>  | 2,37        | 0,9         |          |      |     |      |      | <i>C. parapsilosis</i>       |

#### 4.11. Resultado do teste de ELISA de inibição para detecção e quantificação de antígenos circulantes (gp65 de *C. albicans*) em soros de pacientes com candidíase e outras micoses.

Realizamos o ensaio de ELISA de inibição para detecção e quantificação do antígeno de 65 kDa circulante em soros de 20 pacientes com candidemia, em soros de pacientes com aspergilose (3 soros), histoplasmose (3 soros), paracoccidioidomicose (3 soros) e Doença de Jorge Lobo (3 soros). Para este ensaio utilizamos o Mab anti-65 kDa de *C. albicans* e como controles negativos utilizamos soro humano normal e o anticorpo monoclonal. Observou-se que em 2 soros de pacientes com paracoccidioidomicose detectou-se antígenos circulantes com concentrações de antígenos superiores a 1 µg/ml, indicando uma possível reação cruzada (Figura 10).

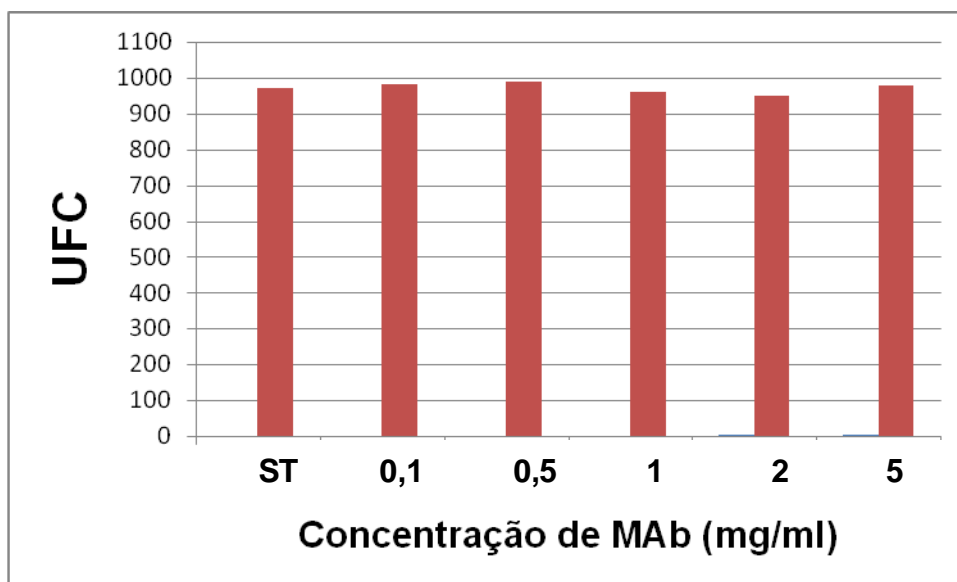


**Figura 10.** Resultados do teste de inibição de ELISA para detecção da molécula de 65 kDa de *C. albicans*. Candidemia = soros de pacientes com candidemia devido a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. glabrata*; A.f = aspergilose; H.c = histoplasmose; P.b = paracoccidioidomicose; J.L = Doença de Jorge Lobo. SHN = soro humano normal.

## 4.12. Ensaio para determinação do papel biológico da molécula de 65 kDa de *C. albicans*

### 4.12.1. Ação do anticorpo monoclonal no crescimento de células de *C. albicans*.

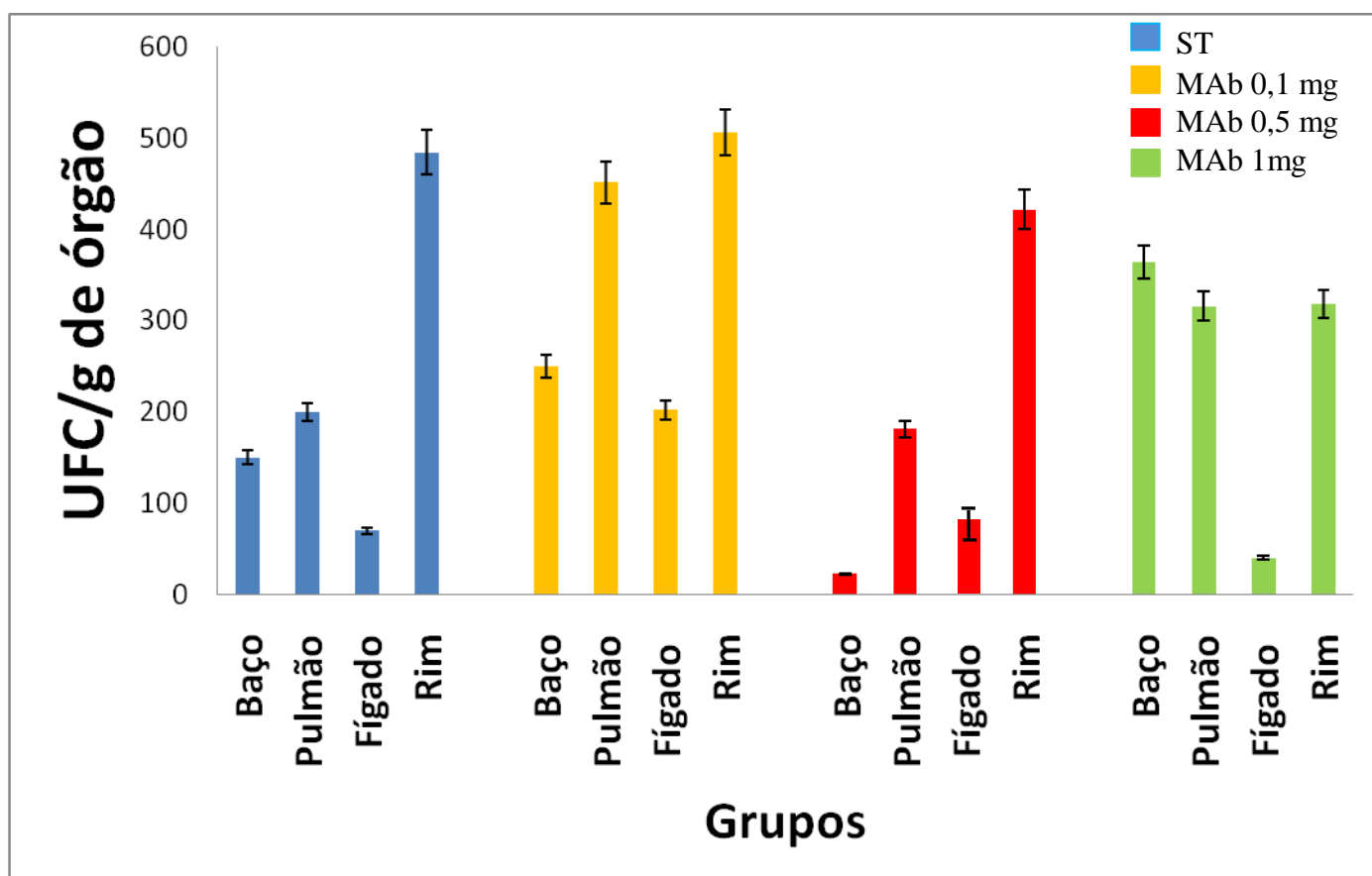
Para determinar um possível papel biológico da proteína de 65 kDa de *C. albicans*,  $1 \times 10^3$  células de *C. albicans* foram crescidas em 250 ml de caldo Sabouraud, à temperatura de 36°C, por 3 dias. As células foram incubadas por 16 horas, a 4°C com diferentes concentrações de MAb e mantidas sob agitação constante, e em seguida foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar-Sabouraud. Após o cultivo das células tratadas com o anticorpo monoclonal contra a proteína de 65 kDa de *C. albicans*, observamos que não houve diferença significativa no crescimento das células tratadas ou não com o anticorpo. O gráfico mostra o crescimento das unidades formadoras de colônias nas diferentes concentrações de mAb (Figura 11).



**Figura 11-** Efeito do MAb anti-65 kDa de *C. albicans* no crescimento de células vivas de *C. albicans*. UFC = unidade formadora de colônia. ST = sem tratamento.

#### 4.12.2. Determinação de Unidade Formadora de Colônia (UFC) de *C. albicans* em modelo murino experimental de candidemia tratados com diferentes concentrações de anticorpo monoclonal anti-65 kDa de *C. albicans*.

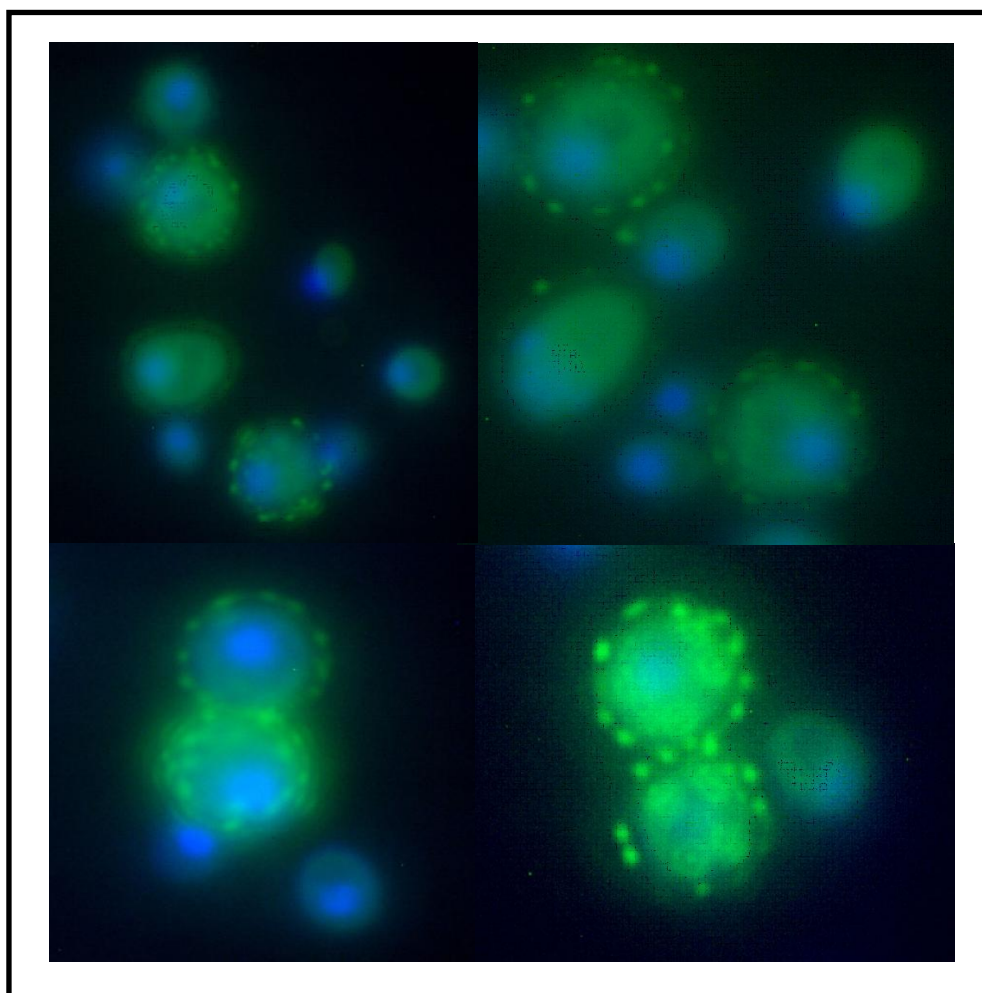
Para determinar a ação *in vivo* do anticorpo monoclonal anti-65 kDa de *C. albicans*, camundongos foram tratados com diferentes concentrações de MAb. Camundongos tratados foram infectados com  $1 \times 10^6$  células vivas de *C. albicans* por via endovenosa e após 3 semanas foram sacrificados e seus órgãos retirados para determinação da unidade formadora de colônia. Observamos que o grupo de camundongos tratados com 0,1 mg/ml de MAb apresentou um aumento significativo no crescimento fúngico no baço dos camundongos (Figura 12).



**Figura 12-** UFC dos órgãos de camundongos tratados com MAb anti-65 kDa de *C. albicans* em concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/ml. ST = sem tratamento.

#### 4.13. Ensaio de imunofluorescência direta utilizando mAb anti-gp65 para localizar a presença da gp65 na célula de *C. albicans*.

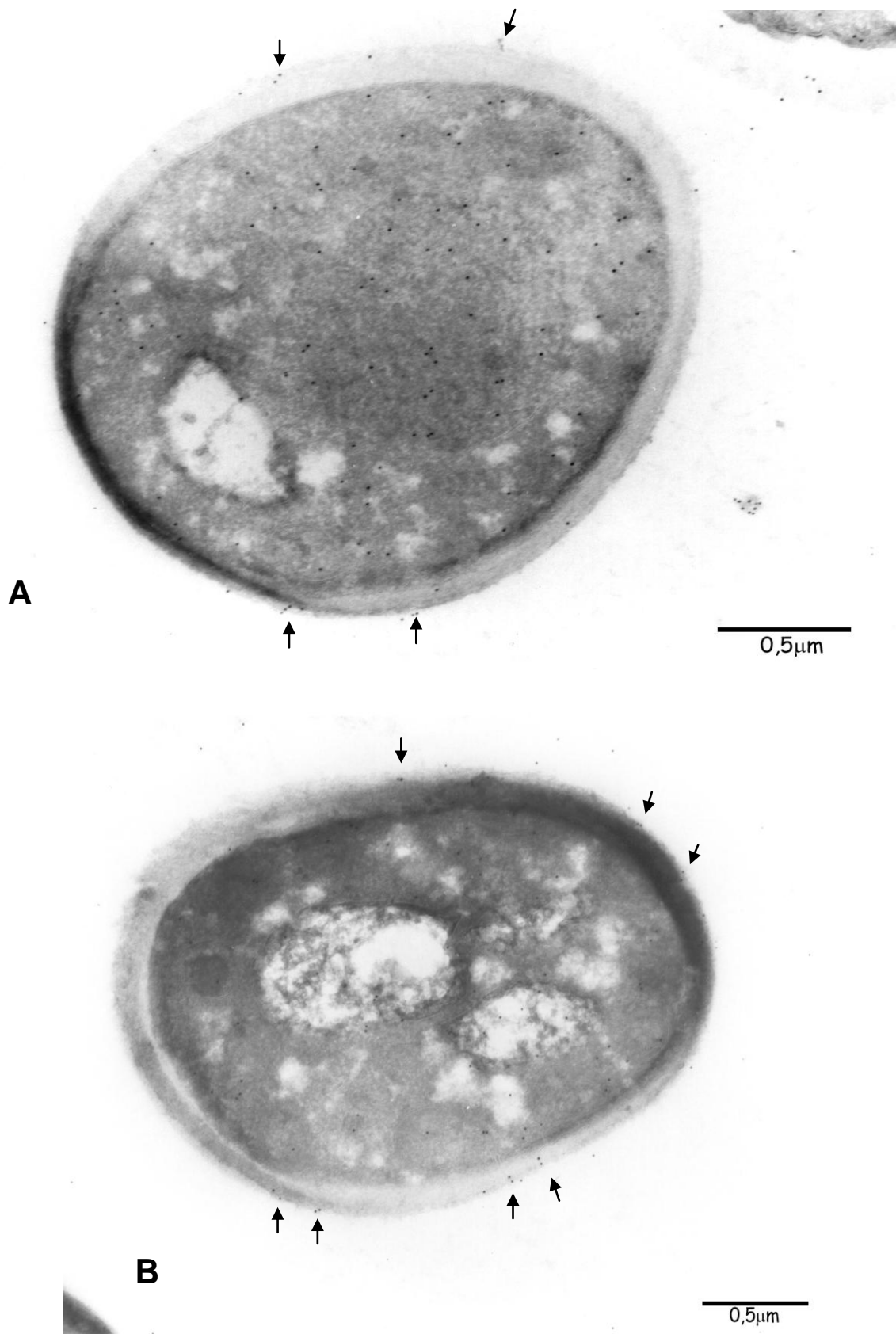
Ensaio de imunofluorescência direta foi realizado o para localizar a glicoproteína de 65 kDa em células de *Candida albicans*. Na figura 13, observamos que o Mab anti-65kDa reconhece a glicoproteína em determinadas regiões da parede celular fúngica (coloração verde). A localização das moléculas de 65 kDa se mostra distribuída predominantemente na parede celular na forma de “spots” (células de 3 dias). Em azul, núcleos marcados com DAPI.



**Figura 13-** Células de *C.albicans* mostrando a imunomarcação utilizando anticorpo monoclonal anti- gp65. Em verde, imunomarcação por Fit-C e em azul marcação nuclear por DAPI. A localização das moléculas de 65 kDa se mostra distribuída predominantemente na parede celular na forma de “spots” (células de 3 dias). Aumento de 1000x.

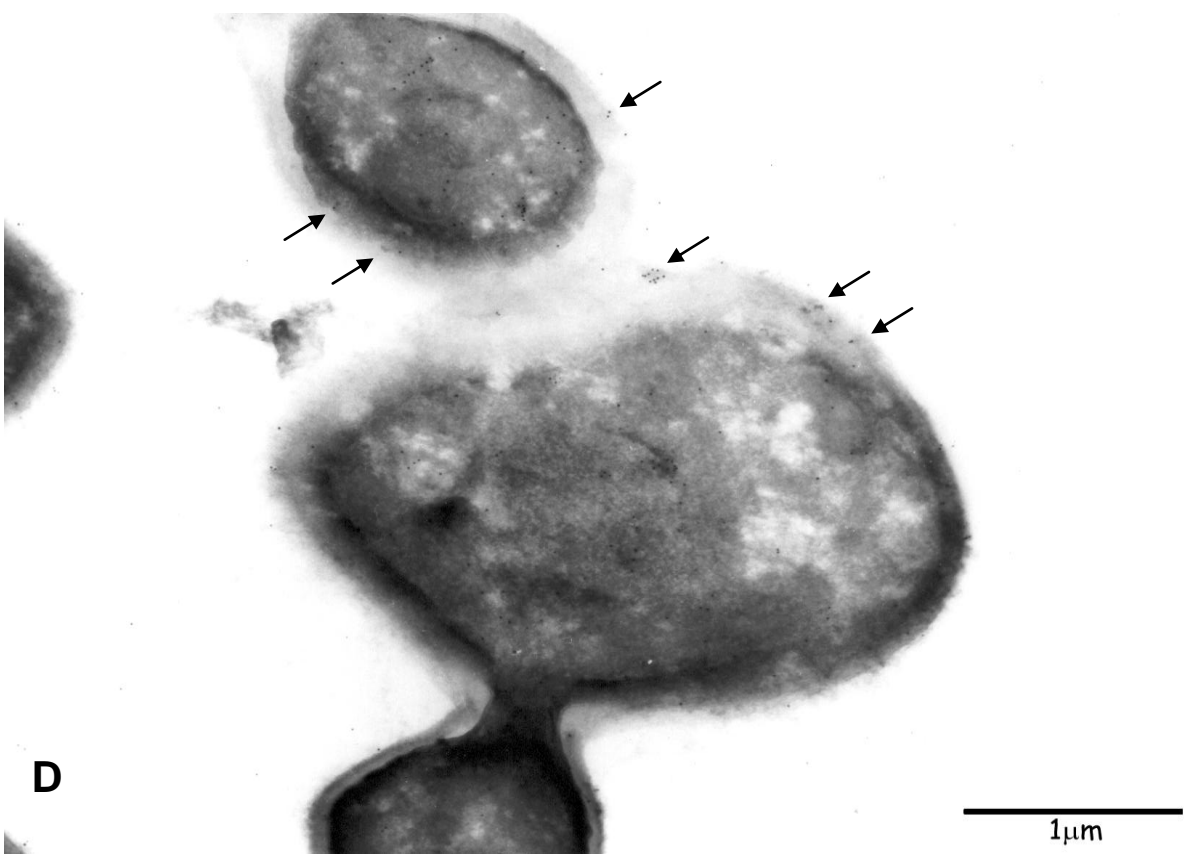
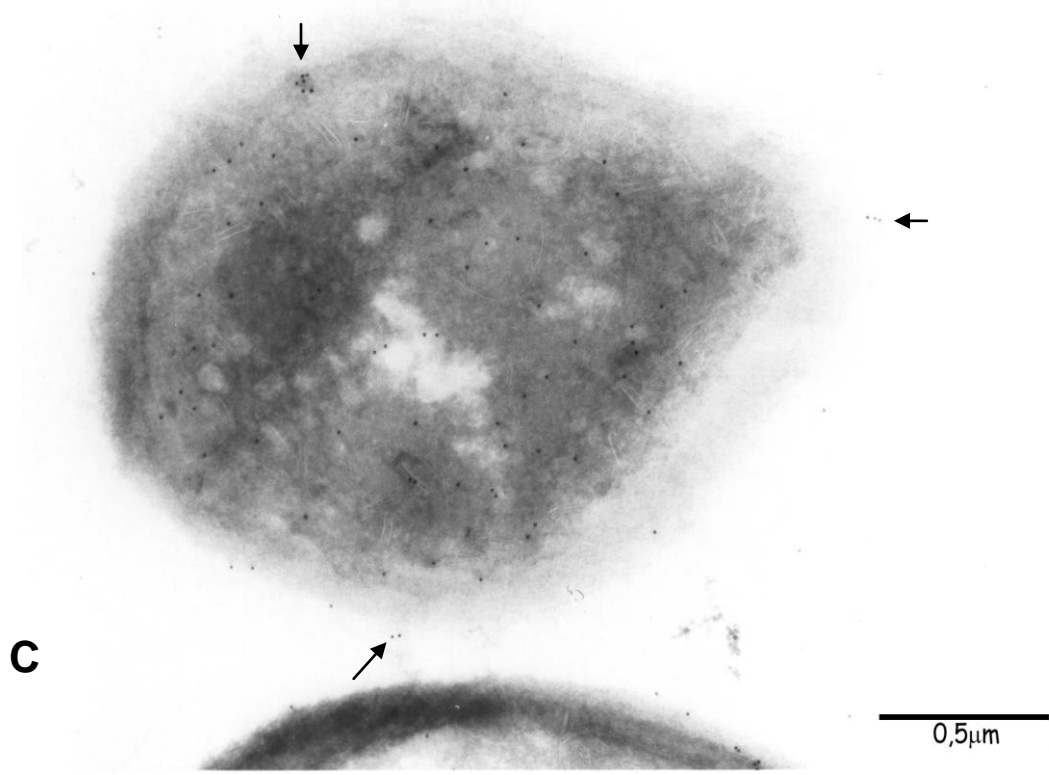
#### 4.14. Imunomarcação por microscopia eletrônica

A figura 14 mostra o resultado da imunomarcação, por microscopia eletrônica, para localizar a glicoproteína de 65 kDa, em células de *C. albicans*. O anticorpo monoclonal reconheceu a glicoproteína em regiões da parede celular e do citoplasma fúngico. Podemos observar que em certas regiões da parede celular há acúmulo da proteína (setas). Como controle negativo (Fig. 14 G), utilizamos apenas o anticorpo secundário marcado com ouro coloidal.

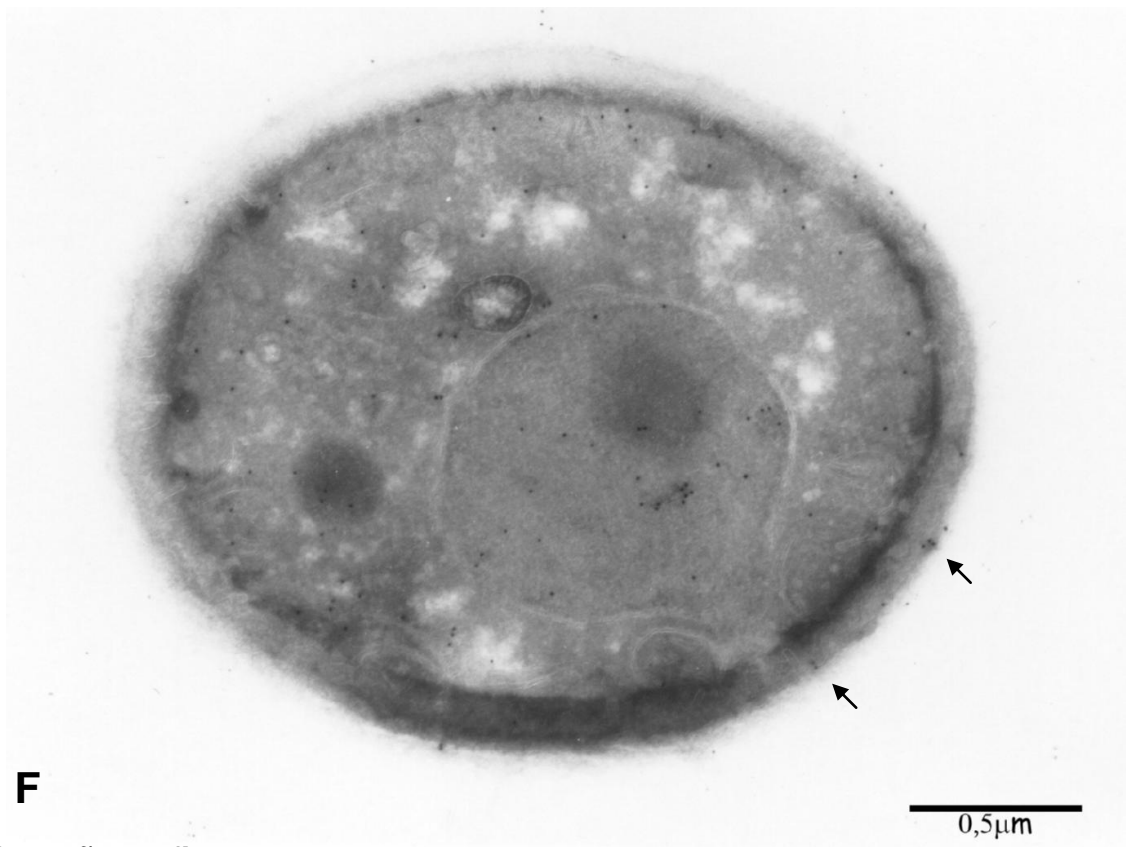
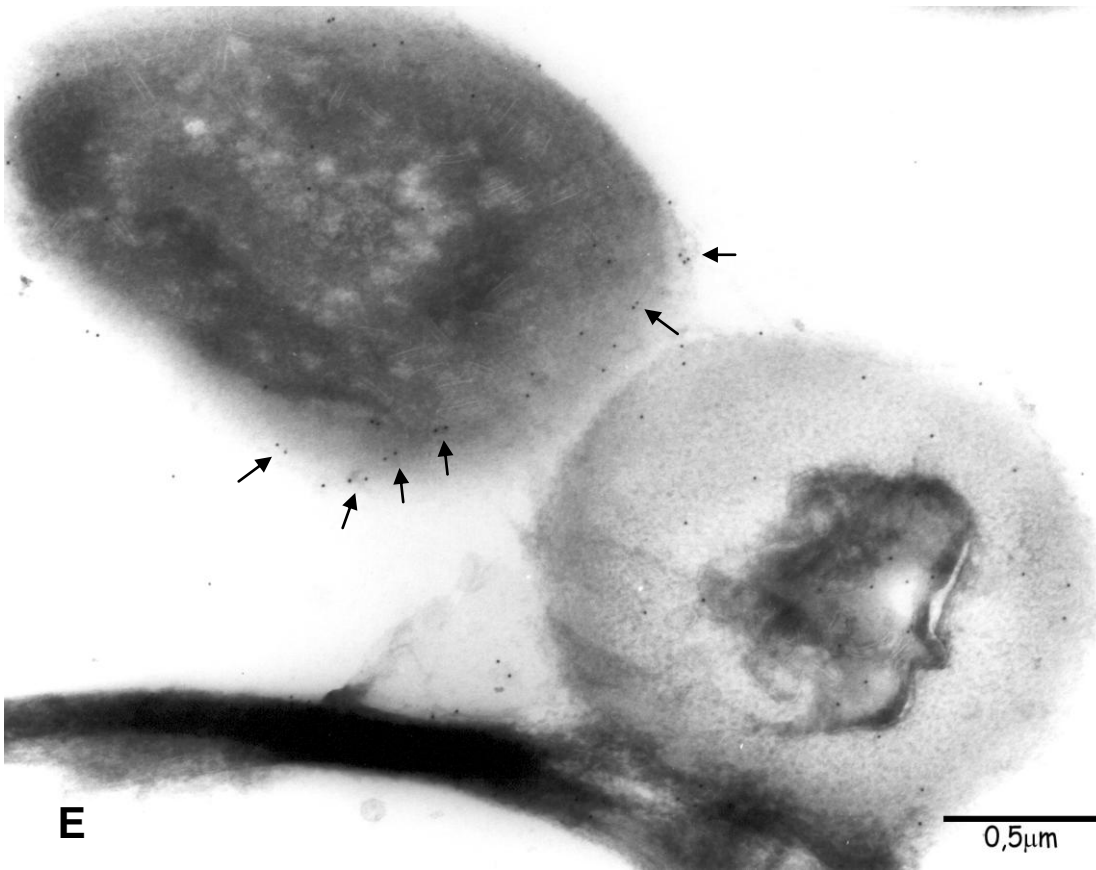


**Figura 14- A,B,C,D,E e F:** Imunomarcção por microscopia eletrônica em células de *C. albicans* utilizando anticorpo monoclonal contra gp65; **G:** Controle negativo. As setas indicam acúmulo da gp65 na parede celular fúngica.

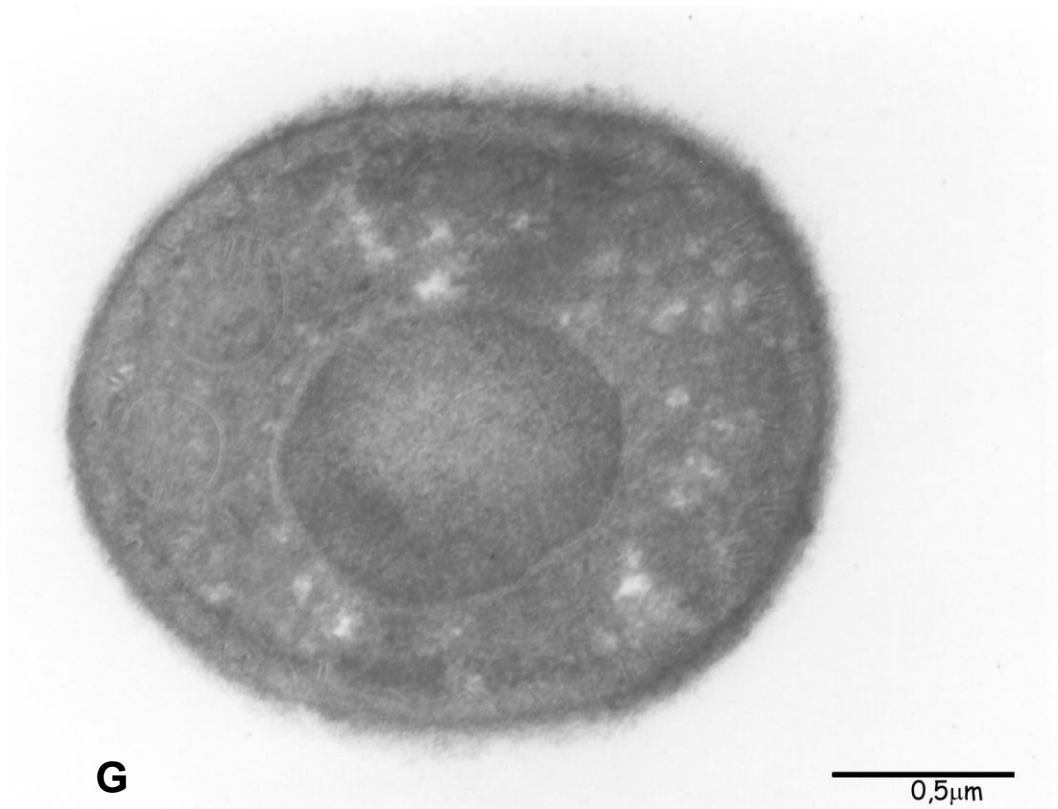




Continuação da figura 14.



Continuação da figura 14.

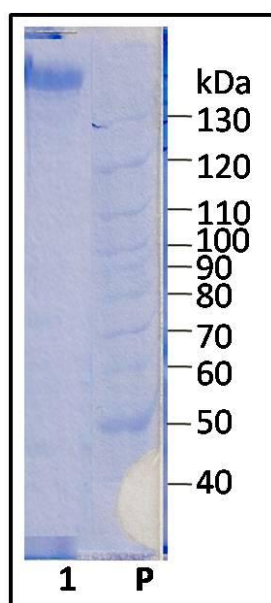


Continuação da figura 14.

#### 4.15. Interação da gp65 kDa de *C. albicans* com a fibronectina, proteína de matriz endotelial.

##### 4.15.1- Purificação de fibronectina de plasma sanguíneo.

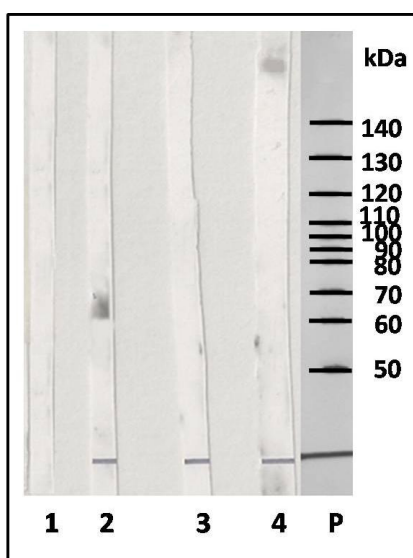
A fibronectina foi purificada do plasma sanguíneo por coluna de afinidade. A figura 15 mostra um gel de SDS-PAGE com a banda de fibronectina purificada.



**Figura 15-** Resultado da purificação da fibronectina de plasma sanguíneo. 1- Fibronectina purificada (~ 440 kDa). P- Padrão de peso molecular.

#### 4.15.2- Interação da proteína de 65 kDa de *C. albicans* com a fibronectina.

Com objetivo de avaliarmos a capacidade de adesão da proteína de 65 kDa à fibronectina da matriz endotelial foi realizado ensaio de Western blot, onde a fibronectina foi aplicada ao SDS-PAGE e posteriormente transferida para membranas de nitrocelulose. Em seguida, colocadas para reagir com a proteína de 65 kDa de *C. albicans* (Como controle negativo utilizamos a proteína gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* que não se liga à fibronectina). A visualização da reação foi verificada por quimioluminescência. Na figura 15, coluna 4, observamos a reação da proteína de 65 kDa com a fibronectina.



**Figura 16-** Western blot mostrando a interação da proteína de 65 kDa de *C. albicans* com a fibronectina de matriz extracelular. Coluna 1-Controle negativo (fibronectina + gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*), coluna 2- controle positivo (proteína de 65 kDa de *C. albicans* + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*), coluna 3- controle da ligação inespecífica do mAb contra fibronectina (fibronectina + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*) e coluna 4- interação da proteína de 65 kDa de *C. albicans* com a fibronectina de matriz extracelular (fibronectina + proteína de 65 kDa de *C. albicans* + mAb anti 65 kDa de *C. albicans*)

## 5. Discussão

As espécies de *Candida* têm sido os agentes das causas mais comuns de infecções da circulação sanguínea nosocomial (Banerjee *et al.*, 1991). O aumento das infecções fúngicas pode ser atribuído a vários fatores como regime terapêutico imunossupressivo, longo período de uso de catéteres, uso de antibióticos de amplo espectro de ação e a sobrevida longa de indivíduos imunocomprometidos. No Brasil, Colombo *et al.* (2006) realizaram estudo epidemiológico de candidemia em onze centros médicos brasileiros, detectando 712 casos de candidemia com uma incidência de 2,49 casos por 1000 admissões por dia, um valor elevado quando comparado a dados de outros países. Das espécies de *Candida* isoladas por hemocultura *Candida albicans* foi a espécie mais comum com 40,9% dos casos, seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%). Nos Estados Unidos e Europa, *C. glabrata* vem em segundo lugar como a espécie mais incidente (respectivamente, 18,3% e 13,6%), seguida por *C. parapsilosis* (respectivamente, 13,2% e 13,3%) (Pfaller *et al.*, 2004; Tortorano *et al.*, 2004). Geralmente, 40 a 60% dos pacientes que desenvolvem candidemia morrem durante a internação na qual houve a fungemia, sendo a alta mortalidade decorrente, particularmente, do diagnóstico tardio, gravidade da infecção e estado geral do paciente (Wenzel, 1995; Wey *et al.*, 1988).

A detecção de anticorpos em pacientes que apresentam deficiências imunológicas e que não conseguem produzir níveis normais de imunoglobulinas é difícil, requerendo técnicas mais sensíveis. Entretanto, técnicas muito sensíveis capazes de detectar baixos níveis de anticorpos, podem perder em especificidade. Desta maneira, a detecção de antígenos circulantes, em vez de anticorpos, pode constituir importante instrumento para se firmar diagnóstico ou monitorar pacientes sob tratamento. Isso se adequa, principalmente para hospedeiros imunocomprometidos, onde diagnóstico depende, sobretudo do diagnóstico precoce e começo de tratamento (Gomez *et al.* 1997).

A detecção de antígenos para o sorodiagnóstico de infecções ocasionadas por espécies de *Candida* tem sido objeto de vários estudos. (Buckley *et al.* 1992, Burnie e Willians, 1985, Franklyn *et al.*, 1990, Fung *et al.*, 1986, Herent *et al.*, 1992, Ikegami *et al.*, 1988, Kohno, 1991). Matthews and Burnie (1988) desenvolveram um método para a detecção de uma proteína citoplasmática de 47 kDa em pacientes com candidíase sistêmica. Um teste imunoenzimático para detecção de um antígeno de 48 kDa, denominado Enolase, que está presente em espécies de *Candida* (Franklyn *et al.*, 1990, Mason *et al.*, 1989) é usado para o diagnóstico de candidíase invasiva (Westhead e McLain, 1964). Testes de aglutinação de látex para a detecção de manana, um componente de parede celular de fungos e está presente em pacientes com candidemia vem sendo usado para diagnóstico (Buckley *et al.*, 1992, Kohno, 1991). Teste comerciais (Pastorex *Candida* e Cand-Tec) têm sido usados para detectar um metabólito fúngico (manana) no sangue de pacientes com candidemia. Ensaios colorimétricos (Fungitec G, Fungitec G MT) detectam  $\beta$ -D-glucana, maior componente estrutural de parede celular fúngica, são usados para o diagnóstico de infecções fúngicas. Estudos mostram que a concentração de  $\beta$ -D-glucan no soro é alta em modelos experimentais de infecção fúngica (Mitsutake *et al.*, 1995, Miyazaki *et al.*, 1992, Miyazaki *et al.*, 1995, Miyazaki *et al.*, 1992) e no plasma de pacientes com micoses (Kohno, 1991, Miyazaki *et al.*, 1992). Vários testes baseados na detecção de anticorpos, antígenos e metabólitos foram desenvolvidos para diagnóstico de candidíase, mas todos apresentam baixa especificidade ou sensibilidade (Walsh e Chancock, 1997).

Devido a estes fatores, um teste para detecção de antígeno circulante em pacientes suspeitos de candidemia se faz necessário para se ter diagnóstico precoce, antes que ela se torne disseminada e ponha em risco a vida do paciente.

A primeira etapa em nosso estudo foi determinar uma molécula comum às três espécies do gênero *Candida* com maior prevalência nas candidemias relatadas no Brasil. Por meio de SDS-PAGE observamos que uma proteína de

65 kDa estava presente em grande quantidade nos exoantígenos destas três espécies mais comuns no Brasil e que ela poderia ser um alvo potencial no diagnóstico da candidemia. A proteína de 65 kDa vem sendo estudada pelo grupo do Dr. Cassone que observou se tratar de uma manoproteína secretada pelo fungo, particularmente pelas células miceliais de *C. albicans* (Arancia *et al.*, 2006, Cassone *et al.*, 1998, Gomez *et al.*, 1996, Torosantucci *et al.*, 1993, Torosantucci *et al.*, 1991 Torosantucci *et al.*, 1990). Também, era reconhecida por células T do sangue periférico de praticamente todos os indivíduos com candidemia (antígeno quaseuniversal) (Arancia *et al.*, 2006, Torosantucci *et al.*, 1993, Torosantucci *et al.*, 1991).

O teste de ELISA de inibição é um ensaio imunoenzimático que detecta antígenos circulantes, através de anticorpos monoclonais murinos específicos, em soro de pacientes com infecções fúngicas invasivas. Este teste foi utilizado com êxito no diagnóstico e seguimento sorológico de pacientes com paracoccidioidomicose. O teste apresenta alta sensibilidade e especificidade e é capaz de detectar antígenos., circulantes em amostras biológicas como soro, líquido e lavado brônquico alveolar (Marques da Silva *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006).

Gomes *et al.* (1998) utilizaram o teste de ELISA de inibição para o diagnóstico de pacientes com histoplasmose por meio da detecção do antígeno de 69-70 kDa, apresentando sensibilidade de 71% e especificidade de 98% em amostras de urina. Na e Song (1999) analisaram três métodos de imunodiagnóstico, ELISA convencional, ELISA de captura e ELISA de inibição utilizando anticorpo monoclonal contra aspartil preteinase secretada em exoantígenos de *C. albicans* para o diagnóstico de pacientes com candidiase invasiva. Os resultados indicaram que o teste de ELISA de inibição foi mais efetivo, com sensibilidade 94% e especificidade de 96%, sendo o método de escolha no diagnóstico e monitoramento do tratamento de pacientes com candidiase invasiva.



Para atingir nosso principal objetivo iniciamos os estudos com o teste de ELISA de inibição em modelos experimentais de candidemia. Inicialmente produzimos anticorpos policlonais em coelhos contra a glicoproteína de 65 kDa de *C. albicans* comum à *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, previamente purificada por eletroeluição de gel de SDS-PAGE. Utilizamos o modelo murino de candidemia para iniciar o teste de detecção de antígenos. No modelo murino experimental de candidemia, infectamos dois grupos de camundongos. O primeiro grupo foi infectado com uma cepa de *C. albicans* padrão ATCC e o segundo grupo foi infectado com uma cepa isolada de hemocultura de paciente com candidemia. Em ambos os grupos, amostras de sangue foram coletadas durante três dias consecutivos, após infecção. Detectamos o antígeno circulante de 65 kDa nos dois grupos. Não houve diferença significativa entre o grupo infectado com a cepa padrão e o infectado com a cepa isolada de hemocultura. Escolhemos a cepa padrão para dar continuidade aos experimentos. Concomitantemente, dois soros de pacientes com candidemia foram testados e em ambos o teste foi capaz de detectar o antígeno de 65 kDa.

Verificada a capacidade de detecção do antígeno circulante de 65 kDa pelo teste de ELISA de inibição, nosso próximo passo foi determinar a partir de quanto tempo, após o animal ser infectado com o fungo, poderia se detectar o antígeno na circulação. Para este experimento, utilizamos o modelo de candidemia experimental em coelhos. Os coelhos foram infectados com *C. albicans* (ATCC) e o soro coletado de 3 em 3 horas a partir da infecção e, após as primeiras 12 horas, de 24 em 24 horas. Observamos que nas primeiras três horas de infecção, o antígeno circulante era detectado no soro, porém, observamos um “clearance” do antígeno em algumas amostras de soros, alternando entre clareamento e aparecimento da proteína circulante. O pico de detecção do antígeno ocorreu no quarto dia de infecção, atingindo concentração de 4,5 µg/ml.

Para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste utilizamos a tecnologia para a obtenção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra antígenos específicos. Foi produzido um anticorpo

monoclonal contra a molécula de 65 kDa de *C. albicans* comum à *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A escolha do antígeno baseou-se nos estudos anteriores realizados com sucesso na detecção do antígeno em modelos experimentais de candidemia com anticorpos policlonais.

O ensaio de caracterização do anticorpo monoclonal contra molécula de 65 kDa de *C. albicans* revelaram que ele pertence ao isotipo IgG-1 e que se liga aos epítomos protéicos da molécula de 65 kDa presente em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Selecionado o MAb contra a gp65 de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, realizamos o teste de ELISA de inibição para detecção de antígenos circulantes no modelo murino de candidemia. Camundongos imunossuprimidos foram infectados com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* e seus soros coletados diariamente para detecção de antígeno circulante. No grupo infectado com *C. albicans* observou-se um pico de detecção de 2,6 µg/ml no primeiro dia de infecção e um possível “clearance” nos dias consecutivos, com diminuição da carga antigênica, seguido de um aumento na última amostra de soro. No grupo infectado com *C. tropicalis* observou-se um pico de detecção de 3,25 µg/ml de antígeno circulante e um possível “clearance” do antígeno durante a candidemia até negativar na última amostra no 5º dia. No grupo infectado com *C. parapsilosis* observou-se um pico de detecção de 1,68 µg/ml e, em seguida, uma queda e subsequente aumento de antígeno que, em seguida diminuiu e tornou a aumentar. Os animais sobreviveram até o 9º dia. Nos três grupos o teste de inh-ELISA detectou antígenos circulantes em quase todas as amostras de soros. A dinâmica de antigenemia pela proteína de 65 kDa foi diferente em cada grupo estudado, mas foi observado que em cada grupo houve um clareamento do antígeno, dados que reforçam os experimentos com anticorpos policlonais.

Uma vez confirmada a especificidade do anticorpo monoclonal e a capacidade do teste detectar o antígeno circulante no soro dos camundongos,

nossos esforços se dirigiram para a detecção de antígeno circulante em soros de pacientes suspeitos de candidemia.

As amostras de soro de pacientes foram coletadas no momento em que o sistema de cultura de sangue (Bactec™ 9240) indicou a presença de leveduras e também nos dias consecutivos. Em alguns casos, as amostras foram coletadas antes de determinada a infecção por *Candida* spp. pelo BacTec. Ao total 20 pacientes suspeitos de candidemia estudados, o teste apresentou positividade para a presença do antígeno circulante em 16 (80%) pacientes, detectado em concentrações variando de 0,075 a 5,0 µg/ml, no momento em que o Bactec foi positivo. Observamos três diferentes dinâmicas de antigenemia da molécula de 65 kDa nestes pacientes; quatro pacientes apresentaram um clareamento total da molécula após o tratamento com drogas antifúngicas. A concentração da molécula de 65 kDa na última amostra testada foi inferior a 0,11µg/ml; cinco pacientes apresentaram um clareamento inicial, após o tratamento antifúngico e reincidiva da antigenemia (com exceção do paciente número 1); sete pacientes apresentaram clareamento parcial da antigenemia, onde a concentração da molécula de 65 kDa na última amostra testada foi superior a 0,25 µg/ml. Observamos que os pacientes que persistiram com a antigenemia, em níveis superiores a 0,25 µg/ml após o tratamento antifúngico, não sobreviveram, provavelmente pela ineficácia do tratamento na redução da carga fúngica no sangue dos pacientes.

Observamos que houve “clearance” do antígeno em soros de alguns pacientes, o que pode ser explicado pela resposta imune do hospedeiro e pelo rápido clearance renal. Das amostras de soros dos pacientes com candidemia foram isoladas quatro espécies de *Candida*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Entretanto, o antígeno foi detectado apenas nos soros em que se isolaram *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* o que demonstra que o anticorpo monoclonal é específico a estas três espécies. Com uma exceção, quando o Bactec foi positivo e o isolado foi *C. albicans*, não se conseguiu detectar o antígeno de 65 kDa. Os outros três casos em que não se detectou o antígeno foram onde se isolaram *C. glabrata* e *C. kefyr*. Na *C.*

*grablata* o MAb anti-gp65 não reconhece a molécula de 65 kDa (Não testamos o exoantígeno da *C. kefyr*, por essa espécie ser raramente isolada de pacientes). Observamos que houve reação cruzada do MAb anti-65 kDa de *C. albicans* com dois soros de pacientes com paracoccidiodomicose, mas acreditamos que essa reação cruzada não interfira no diagnóstico do paciente com candidemia, porque os sinais clínicos dos pacientes com candidemia são diferentes dos pacientes com paracoccidiodomicose.

É nossa opinião de que em condições favoráveis do paciente internado na UTI e com suspeita forte de candidemia, faça-se o teste para a pesquisa do antígeno antes mesmo da positividade do Bactec. Em 3 ocasiões quando foi possível a coleta de soro do paciente antes mesmo da positividade do Bactec, conseguimos detectar a presença do antígeno. Isso pode dar informações ao médico de que a *Candida* spp se instalou no paciente e que a terapêutica antifúngica pode ser iniciada. É importante um segmento sorológico dos pacientes devido a ausência da proteína circulante em algumas amostras analisadas.

A próxima pergunta que se fazia necessário era saber se a molécula de 65 kDa possuía algum papel biológico no sistema. O primeiro ensaio realizado foi determinar se o MAb anti-65kDa tinha ação sobre o crescimento *in vitro* de células de *C. albicans*. Células de *C. albicans* foram tratadas com diferentes concentrações de anticorpos monoclonais e observamos que não houve mudanças significativas no crescimento em meio ágar-Sabouraud das células fúngicas em relação às células não tratadas.

Em um segundo experimento pesquisamos a influência do anticorpo monoclonal da classe IgG1 em células de *C. albicans*, *in vivo*, para determinar um provável potencial de proteção contra candidemia. Casadevall *et al.*, (1992), definiram que a proteção eficaz contra infecção fúngica é dependente dos isotipos, em ordem de eficácia, IgG 1 > IgM > IgG3. Anticorpos IgG1 contra a GXM, principal constituinte da cápsula de *Cryptococcus neoformans* são

protetores em diversos modelos experimentais de criptococose (Dromer *et al*, 1987a, Mukherjee *et al*, 1994, Casadevall, 1997). Anticorpos monoclonais IgG1 produzidos contra uma glicoproteína de *Aspergillus fumigatus* mostraram atividade fungicida contra outras espécies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* e *A. terreus*) (Chatuverdi *et al*, 2005). Na paracoccidiodomicose experimental, anticorpos monoclonais IgG 1 dirigidos contra a gp70 de *P. brasiliensis* suprimiram o desenvolvimento da doença (de Mattos Grosso *et al.*, 2003)

Na histoplasmose, Nosanchum *et al.* (2003) administraram anticorpo monoclonal, gerado contra antígeno de superfície de *H. capsulatum*, em camundongos e depois infectaram com o fungo observando que houve diminuição da carga fúngica e inflamação nos pulmões. Na paracoccidiodomicose, de Mattos-Grosso *et al.* (2003) injetaram anticorpos monoclonais contra a gp70 três dias antes da infecção e o tratamento continuou em intervalos de 72 horas durante 45 dias. Usando essa estratégia de imunização eles verificaram que houve redução na carga fúngica nos pulmões.

Para determinar um possível potencial de proteção do anticorpo monoclonal tratamos camundongos previamente imunossuprimidos com quatro concentrações distintas de MAb anti-65 kDa de *C. albicans* e os infectamos com células vivas de *C. albicans*. Após três semanas, os camundongos foram sacrificados, retirados os rins, pulmão, baço e fígado, e determinadas as UFCs dos órgãos. Observamos que os rins foram os órgãos que apresentaram maior predominância de células fúngicas entre os quatro grupos e que os grupos de camundongos tratados com 0,1 mg e 1 mg de MAb/ml apresentaram aumento da quantidade de células fúngicas, principalmente no pulmão e baço quando comparados com o grupo não tratado e com o grupo tratado com concentração de 0,5 mg/ml de MAb. Não houve diminuição fúngica significativa entre os grupos tratados e não tratados com o anticorpo monoclonal, sugerindo que o anticorpo monoclonal não apresenta papel de proteção contra a doença.

Os anticorpos monoclonais produzidos contra antígenos específicos, além de serem empregados nos estudos da resposta imune humoral contra agentes infecciosos, são importantes ferramentas utilizadas na caracterização de antígenos. Assim, utilizamos o Mab contra a molécula de 65 kDa para localizar o antígeno de 65 kDa nas células leveduriformes de *C. albicans* através de ensaios de imunofluorescência e microscopia eletrônica. Os ensaios revelaram que esse antígeno está presente na superfície do fungo e sua distribuição não é uniforme, pois foi possível observar sua localização de modo pontual nas células. Visto que essa proteína é secretada, esse comportamento pontual pode estar associado aos pontos de secreção da proteína, ou seja, transitoriamente aderida à parede celular do fungo, como acontece com a maioria das proteínas secretadas por fungos (Klis, 1994).

O relacionamento de ligantes no tecido hospedeiro por microrganismos patogênicos parece ser essencial para a sobrevivência do patógeno. Um microrganismo que consegue aderir às células epiteliais ou às células endoteliais dos vasos sanguíneos pode evitar a sua eliminação desses locais. A aderência ao tecido hospedeiro é um pré-requisito para a disseminação dos microrganismos patogênicos. Os fungos patogênicos apresentam diversas adesinas na sua superfície, logo são capazes de aderir à várias células e de interagir com inúmeros ligantes do hospedeiro, como fluídos biológicos, a matriz extracelular e a membrana basal (Tronchin *et al*, 2008).

Tanto em bactérias como em fungos, as adesinas têm papel fundamental nos vários processos infectivos. Vários trabalhos procuram elucidar os mecanismos e as prováveis adesinas de fungos como em *C. albicans* (Cotter *et al.*, 1998; Gaur *et al.*, 1999; Gaur e klotz, 1997), *Aspergillus fumigatus* (Coulot *et al.*, 1994; Gil *et al.*, 1996; Peñalver *et al.*, 1996; WasylInka *et al.*, 2000); *Histoplasma capsulatum* (Mcmahon *et al.*, 1995); *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2003); *Pneumocystis carinii* (Kottom *et al.*, 2003); *Sporothrix schenckii* (de Lima *et al.*, 2001); *Penicillium marneffe* (Hamilton *et al.*, 1998, Hamilton *et al.*, 1999) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Mendes-

Giannini *et al.*, 1994, Vicenti *et al.*, 1994; Hanna *et al.*, 2000; Andreotti *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006).

Glicoproteínas presentes na superfície de fungos que apresentam características de adesão à matriz endotelial e que estão envolvidas na patogenicidade foram descritas para diversos fungos patogênicos. *Coccidioides immitis* possui um gene SOWgp que codifica uma glicoproteína de parede celular, que medeia sua adesão com as proteínas de matriz extracelular (laminina>fibronectina>colágeno). Uma cepa mutante, nocaute para o gene Sowgp é menos virulenta que a cepa selvagem e essa característica foi restaurada na cepa mutante no qual o gene foi reconstituído, o que sugere a modulação da resposta imune por essa adesina (Hung *et al.*, 2002). Brandhorst *et al.* (1999) usaram de estratégia semelhante e descreveram que o antígeno imundominante WI-1 do fungo dimórfico *Blastomyces dermatitidis* está envolvido na adesão e virulência, pois a deleção do gene que codifica para WI-1 extinguiu a virulência em camundongos, prejudicou a ligação e a entrada do fungo nos macrófagos e também perda da aderência ao tecido epitelial. Porém, essas propriedades foram restabelecidas nas cepas mutantes que tiveram o gene restaurado.

No sistema *P. brasiliensis* o entendimento das interações entre o fungo com os tecidos do hospedeiro depende do estudo dos diferentes passos que permeiam o processo de colonização, especialmente a adesão celular à proteínas do hospedeiro. A susceptibilidade do hospedeiro depende em parte do dano epitelial que expõe a membrana basal. Levando-se em consideração a arquitetura da matriz extracelular, temos que a membrana basal logo abaixo do epitélio e células endoteliais podem ser expostas por injúria tecidual, aumentando o acesso para a laminina e o colágeno tipo IV. Depois disso, uma vez que o fungo transpassa a membrana basal encontra a fibronectina e colágeno tipo I no espaço intersticial. Se o fungo ganhar acesso ao espaço intravascular, ele encontrará fibronectina plasmática (Gil *et al.*, 1996).

Para verificarmos se a molécula de 65 kDa de *C. albicans* estava relacionada à adesão do fungo à matriz endotelial foi realizado ensaio de Western blot com a molécula purificada. Verificamos que ela se adere à fibronectina, componente de matriz endotelial, sugerindo possível papel de adesão da molécula de 65 kDa de *C. albicans*, indicando mecanismos de sobrevivência e virulência, e que o reconhecimento da fibronectina poderia ser o primeiro passo no ataque, migração e subsequente invasão.

Concluimos esse trabalho mostrando que o teste de ELISA de inibição é útil para detecção da molécula de 65 kDa de *Candida albicans* circulante em soro de pacientes com candidemia. O teste mostrou ser sensível, detectando nanogramas da proteína circulante nos soros de pacientes com diagnóstico de candidemia ( ocasionadas por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) e, em alguns casos, em soros com pré-diagnóstico de candidemia por hemocultura. O teste pode ser otimizado realizando análise de soros sequenciais dos pacientes, porque o rápido clareamento do antígeno da circulação pode gerar um resultado falso-positivo quando é analisado apenas uma única amostra de soro. A detecção da molécula de 65 kDa mostrou ser uma nova opção para o diagnóstico das candidemia causadas por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, possibilitando diagnóstico precoce e o acompanhamento da fungemia nos pacientes.



## 6. Referências Bibliográficas

- Abi-Said D., E. Anaissie, O. Uzun, H. Pinzcowski, and S. Vartivarian.** 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* **24**: 1122-8.
- Ahmad S., Z. Khan, A. S. Mustafa, and Z. U. Klan.** 2002. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* **40**: 2483-9.
- Ahmad, S., Z. Khan, E. Mokaddas, and Z. U. Khan.** 2004. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. *J Med Microbiol* **53**: 633-7.
- Alexander J. W., S. T. Boyce, and G. F. Babcock.** 1990. The process of microbial translocation. *Ann of Surgery* **212**: 496-510.
- Al-Jasser, A. M., and N. A. Elkhizzi.** 2004. Distribution of *Candida* species among bloodstream isolates. *Saudi Med J* **25**: 566-9.
- Alonso-Valle, H., O. Acha, J. D. Garcia-Palomo, C. Farinas-Alvarez, C. Fernandez-Mazarrasa, and M. C. Farinas.** 2003. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**: 254-7.
- Anaissie, E. J., J. H. Rex, O. Uzun, and S. Vartivarian.** 1998. Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia. *Am J Med* **104**: 238-45.
- Andreotti, P. F., J. L. Monteiro da Silva, A. M. Bailao, C. M. Soares, G. Benard, C. P. Soares, and M. J. Mendes-Giannini.** 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **7**: 875-81.
- Arancia, S., A. Carattoli, L. La Valle, A. Cassone, and F. De Bernardis.** 2006. Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in Real Time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples. *Molecular and cellular probes* **25**: 263-8.
- Bailey, J. W., E. Sada, C. Brass, and J. E. Bennett.** 1985. Diagnosis of systemic candidiasis by latex agglutination for serum antigen. *J Clin Microbiol* **21**: 749-52.
- Baker, R.D.** 1962. Leukopenia and therapy in leukemia as factors predisposing to fatal mycosis. *Am J Clin Pathol* **37**: 358-9.
- Ballantyne, D. S., and J. R. Warmington.** 2000. Purification of native enolase from medically important *Candida* species. *Biotechnol Appl Biochem* **31**: 213-8.
- Banderhorts, L., P. L. Botha, and M. N. Janse Van Rensburg.** 1991. The incidence of hospital fungal infections - yeast fungemia. *S Afr Med J* **79**: 302-3.
- Banerjee, S. H., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, W. J. Maston, and the National Nosocomial Infections Surveillance System.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *Am J Med* **91**: 86S-9S.
- Battafarano, D. F., B. Jefferies, C. K. McAllister, and J. W. Kelly.** 1991. The lack of utility of the latex agglutination test for detection of *Candida* antigen in the diagnosis of systemic candidiasis. *Military Med* **156**: 283-5.

- Beck-Sagué, C. M., W. R. Jarvis, and the National Nosocomial Infections Surveillance.** 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* **167**: 1247-51.
- Behrman, H.T.** 1950. Pruritus vulvae due to aureomycin. *JAMA* **5**: 144-5.
- Benjamin, D. K., E. DeLong, C. M. Cotton, H. P. Garges, W. J. Steinbach, and R. H. Clark.** 2004. Mortality following blood culture in premature infants: increased with Gram-negative bacteremia and candidemia, but not Gram-positive bacteremia. *J Perinatol* **24**: 175-80.
- Berkhout, C. M.** 1923. Les genres *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* et *Torula*. *Typewritten translation by E. A. R. F. Baudet. Thesis, Utrecht University.*
- Biguet, J., P. Tranvanky, A. Andrieu, and J. Fruit.** 1964. Analyse immunoélectroforétique d'extraits cellulaires et de milieu de culture d' *Aspergillus fumigatus*, par des immunosérums expérimentaux et de sérums de malades atteints d'Aspergillome bronco-pulmonaire. *Ann Inst Pasteur, Paris.* **107**: 72-97.
- Blakesley R. W., and J. A. Boezi.**1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry* **82**: 580-2.
- Blot, S. I., K. H. Vandewoude, E. A. Hoste, and F. A. Colardyn.** 2002. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med* **113**: 480-5.
- Blum H., H. Beier, and H. J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-9.
- Bodey, G. P.** 1966. Fungal infections complicating acute leukemia. *J Chronic Dis* **19**: 667-87.
- Bodey, G. P.** 1984. Candidiasis in cancer patients. *Am J Med* **77**: 13-9.
- Bodey, G. P.** 1993. What's new in fungal infection in leukemic patients. *Leuk Lymphoma* **11 Suppl 2**:127-35.
- Bogen, E., and J. Kessel.** 1937. Monilial meningites. *Arch Pathol* **23**: 990-5.
- Borg, M., and R. Ruchel.** 1988. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* **56**: 626-31.
- Borg von-Zepelin M., M. H. Eiffert, M. Kann, and R. Ruchel.** 1993. Changes in the spectrum of fungal isolates: results from clinical specimens gathered in 1987/1988 compared with those in 1991/1992 in the University Hospital, Göttingen, Germany. *Mycoses* **36**: 249-53.
- Borst, A., M. A. Leverstein-Van Hall, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2001. Detection of *Candida* spp. in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diagn Microbiol Infect Dis* **39**:155-60.
- Bougnoux, M. E., C. Hill, D. Moissenet, M. Feuilhade de Chauvin, M. Bonnay, I. Vicens-Sprael, F. Pietri, M. McNeil, L. Kaufman, J. Dupouy-Camet J., et al.** 1990. Comparison of antibody, antigen, and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. *J Clin Microbiol* **28**: 905-9.
- Bouza E., and P. Muñoz.** 2008. *Epidemiology of candidemia in intensive care units. Int J Antimicrob Agents* **2**: 87-91.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

- Branchini, M. L., M. A. Pfaller, J. Rhine-Chalberg, T. Frempong, and H. D. Isenberg.** 1994. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* **32**: 452-6.
- Brandhorst, T. T., M. Wuthrich, T. Warner, and B. Klein.** 1999. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. *J Exp Med* **189**: 1207-16.
- Brawner, D. L., G. L. Anderson, and K. Y. Yuen.** 1992. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. *J Clin Microbiol* **30**: 149-53.
- Brooks, R. G.** 1989. Prospective study of *Candida* endophthalmitis in hospitalized patients with candidemia. *Arch Intern Med* **149**: 2226-8.
- Brown, P.C., and R. A. Calderone.** Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. *J Bacteriol* **135**: 1472-4.
- Buchman, T. G., M. Rossier, W. G. Merz, and P. Charache.** 1990. Detection of surgical pathogens by *in vitro* DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by *in vitro* amplification of a fungus-specific gene. *Surgery* **108**: 338-46.
- Buckley, H. R., M. D. Richardson, E. G. V. Evans, and L. J. Wheat.** 1992. Immunodiagnosis of invasive fungal infection. *J Med Vet Mycol* **30**: 249-60.
- Budey, G.P.** 1966. Fungal infections complicating acute leukemia. *J. Chron Dis* **19**: 667-9.
- Buford-Mason, A. P., R. C. Matthews, and J. R. Williams.** 1987. Transient abrogation of immunosuppression in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis following vaccination with *Candida albicans*. *J Infect* **14**:147-57.
- Burnie, J. P., and J. D. Williams.** 1985. Evaluation of the Rameo látex agglutination test in the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol* **4**: 98-101.
- Camargo, Z., P., R. Berzaghi, C. C. Amaral, and S. H. Marques-da-Silva.** 2003. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med Mycol* **41**: 539-542.
- Campbell, C.C., and S. Saslaw.** 1949. Enhancement of growth of certain fungi by streptomycin. *Proc Soc Exp Biol Med* **70**: 562-4.
- Carlisle, R.N., R. E. Millet, C. T. Cho, and T. S. Vats.** 1978. Primary cutaneous aspergillosis in a leukemia child. *Arch. Dermatol* **114**: 78-80.
- Casadevall, A., J. Mukherjee, and M. D. Scharff.** 1992. Monoclonal antibody based ELISAs for cryptococcal polysaccharide. *J Immunol Methods* **154**: 27-35.
- Casadevall, A.** 1997. Antibodies and fungi: an evolving paradigm with opportunities for the development of new antifungal therapies and vaccines. *Rev Iberoam Micol* **14**: 2-3.
- Cassone, A., F. De Bernardis, C. M., Ausiello, M. J. Gomez, M. Boccanera, R. La Valle, and A. Torosantucci.** 1998. Immunogenic and protective *Candida albicans* constituents. *Res Immunol* **149**: 289-92.
- Cawson, R. A., and K. C. Rajasingham.** 1972. Ultrastructural features of the invasive phase of *Candida albicans*. *Br J Dermatol* **87**: 435-43.

- Cerikcioglu, N., U. O. Hasdemir, T. San, E. Salik, and G. Soyletir.** 2004. Simple and reliable detection of slime production of *Candida* spp. directly from blood culture bottles: comparison of visual tube method and transmission electron microscopy. *Mycopathologia* **158**: 279-84.
- Chaturvedi, A.K., A. Kavishwar, G.B. Shiva Keshava, and P. K.Shukla.** 2005. Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. *Clin Diag Lab Immunol* **12**: 1063–8.
- Chibana, H., and Y. Mikami.** 2003. Genomic analysis in *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **44**: 81-5.
- Chryssanthou, E., B. Andresson, B. Petrini, S. Lofdahl, and J. Tollemar.** 1994. Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* **26**: 479-85.
- Cocchi, P., S. Mori, and A. Ravina.** 1973. Myeloperoxidase-deficient leucocytes in streptococcal infections. *Helv Paediat Acta* **28**: 79-81.
- Collins, R.N., P. A. Braum, S. H. Zinner, and E. H. KassH.** 1968. Risk of local and systemic infection with polyethylene intravenous catheters. *N Engl J Med* **279**: 340-4.
- Colombo, A. L., and T. Guimarães.** 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev S Brasil Med Trop* **36**: 599-607.
- Colombo, A.L., M. Nucci, R. Salomão, M. I. Branchini, R. Richtmann, A. Derossi, and S. Wey.** 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**: 281-6.
- Colombo, A.L., M. Nucci, B.J. Park, S. A. Nouér, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. D. Warnock, and J. Morgan.** 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* **44**: 1816-23.
- Colombo A.L., Thompson L., and J. R. Graybill.** 2008. *The north and south of candidemia: Issues for Latin America. Drugs Today (Barc)* **44**: 1-34.
- Costa, S.F., I. Marinho, E. A. Araújo, A. E. Manrique, E. A. S. Medeiros, and A. S. Levin.** 2000. Nasocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hospit Infect* **45**: 69-72.
- Cotter, G., R. Weedle, and K. Kavanagh.** 1998. Monoclonal antibodies directed against extracellular matrix proteins reduce the adherence of *Candida albicans* to HEp-2 cells. *Mycopathologia* **141**: 137-42.
- Coulot, P., J. P. Bouchara, G. Renier, V. Annaix, C. Planchenault, G. Tronchin, and D. Chabasse.** 1994. Specific interaction of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immun* **62**: 2169-77.
- Crampin, A. C., and R. C. Matthews.** 1993. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J Med Microbiol* **39**: 233-8.
- D'Antonio, D, G. Fioritoni, A. Iacone, S. Betti, P. Fazii, M. Dell'Isola, R. Di Gianfilippo, A. Di Silverio, S. Ubezio, C. Zeccara, M. Mosca, and G. Torlontano.** 1992. Hepatosplenic infection caused by *Candida parapsilosis* in patients with acute leukemia. *Mycoses* **35**: 311-3.

**da Silva S.H.M., D. M. Grosso, D. Lopes, A. L. Colombo, M. H. Blotta, F. Queiroz-Telles, and Z. P. Camargo.** 2004. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4480-6.

**Davis, A.T., R. D. Brunning, and P. G. Quie.** 1971. Polymorphonuclear leukocyte myeloperoxidase deficiency in a patient with myelomonocytic leukemia. *N Engl J Med* **285**: 789-91.

**De Bernardis, F., C. Girmenia, M. Boccanera, D. Adriani, P. Martino, and A. Cassone.** 1993. Use of a monoclonal antibody in a dot immunobinding assay for detection of a circulating mannoprotein of *Candida* spp. in neutropenic patients with invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* **31**: 3142-6.

**Dennis, J.E., K. H. Rhodes, R. D. Cooney, and G. D. Roberts.** 1980. Nosocomial *Rhizopus* infection (zygomycosis) in children. *J. Pediatr* **96**: 824-6.

**de Lima, R. F., G. V. Schaffer, and M. Borba Cde.** 2003. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. *Microbes Infect* **5**: 933-8.

**de Lozier, J. B., C. W. Stratton, and J. R. Potts.** 1987. Rapid diagnosis of *Candida* species in surgical patients. *Am Surg* **53**: 600-2.

**de Mattos Grosso, D. S.R. Almeida, M.M. and J.D. Lopes.** 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun* **71**: 6534-2.

**de Repentigny, L, and E. Reiss.** 1984. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev Infect Dis* **6**: 301-12.

**de Repentigny L.** 1992. Serodiagnosis of candidiasis, aspergillosis, and cryptococcosis. *Clin Infect Dis* **14**: S11-S22.

**Diamond, R.D., R. Krzesicki, and J. Wellington.** 1978. Damage to pseudohyphal forms of *Candida albicans* in the absence of serum *in vivo*. *J Clin Invest*, **61**: 349-52.

**DiazGranados C. A., A., Martinez, C., Deaza, and S., Valderrama.** 2008. An outbreak of *Candida* spp. bloodstream infection in a tertiary care center in Bogotá, Colombia. *Braz J Infect Dis* **12**: 390-4.

**Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Bruggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller.** 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* **40**: 1298-302.

**Diekema, D. J., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. P. Wenzel, and M. A. Pfaller.** 1997. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **29**: 147-53.

**Diekema, D. J., M. A. Pfaller, and R. N. Jones.** 2002. Age-related in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Intern J Antimicrobiol Agent* **20**: 412-8.

**Diekema, D. J., and M. A. Pfaller.** 2004. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**: 624-6.

- Downing, J. G., and N. F. Conant.** 1945a. Medical progress: mycotic infections. *N Engl J Med* **233**: 153-6.
- Downing, J. G., and N. F. Conant.** 1945b. Medical progress: mycotic infections. *N Engl J Med* **233**: 181-90.
- Dromer, F., J. Charreire, A. Contrepolis, C. Carbon, and P. Yeni.** 1987. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect Immun* **55**: 749-52.
- Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, and R. P. Wenzel.** 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**: 239-44.
- Edwards, J.E., R. Lehrer, E. R. Stiehm, T. J. Fisher, and L. Young.** 1978. Severe candidal infections: clinical perspective, immune defense mechanisms, and current concepts of therapy. *Ann Intern Med* **89**: 91-4.
- Ellepola, A. N., S. F. Hurst, C. M. Elie, and C. J. Morrison.** 2003. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol* **18**: 379-88.
- Emmons, C. W., K. R. Drehmel, S. M. Smith, and E. J. Utz.** 1963. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet.** 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**: 685-702.
- Epstein, J. B., L. H. Kimura, T. W. Menard, E. L. Truelove, and N. N. Persall.** 1982. Effect of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Arch Oral Biol* **27**: 469-71.
- Erlich, H., T. Bugawan, A. B. Begovich, S. Scharf, R. Griffith, R. Saiki, R. Higuchi, and P. S. Walsh.** 1991. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. *Eur J Immunogenet* **18**: 33-55.
- Fasahat, A., A. Mustafa, and Z. Khan.** 2007. Comparative evaluation of (1,3)- $\beta$ -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infectious Diseases* **7**: 112-9.
- Flahaut, M., D. Sanglard, M. Monod, J. Bille, and M. Rossier.** 1998. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* **36**: 395-401.
- Foley, G. E., and W. D. Jr. Winter.** 1949. Increased mortality following penicillin therapy of chick embryos infected with *Candida albicans* var. *stellatoidea*. *J Infect Dis*: **85**: 228-31.
- Franklyn, K. M., J. R. Warmington, A. K. Ott, and R. B. Ashman.** 1990. An immunodominant antigen of *Candida albicans* shows homology to the enzyme enolase. *Immunol Cell Biol* **68**: 173-8.
- Freeman, H. E.** 1952. Pigmented hairy tongue accompanying antibiotherapy. *Arch Dermatol* **65**: 99-105.
- Freitas-da-Silva, G., and M. C. Roque-Barreira.** 1992. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* **30**: 381-5.

- Fricker-Hidalgo, H., F. Chazot, B. Lebeau, H. Pelloux, P. Ambroise-Thomas, and R. Grillot.** 1998. Use of simulated blood cultures to compare a specific fungal medium with a standard microorganism medium for yeast detection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 113-6.
- Fujita, S, B. A. Lasker, T. J. Lott, E. Reiss, and C. J. Morrison.** 1995. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* **33**: 962-7.
- Fung, J. C., S. T. Donta, and R. C. Tilton.** 1986. *Candida* detection system (CAND-TEC) to differentiate between *Candida albicans* colonization and disease. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 542-7.
- Garber, E. D.** 1960. The host as a growth medium. *Ann N Y Acad Sci* **88**: 1187-94.
- Gartenberg, G., E. Bottone, G. Keusch, and I. Weitzman.** 1978. Hospital-acquired mucormycosis (*Rhizopus rhizopodiformis*) of skin and subcutaneous tissue. *N Engl J Med* **299**: 1115-9.
- Gausewitz, P. L., F. S. Jones, and G. Jr. Worley.** 1951. Fatal generalized moniliasis report of a case. *Am J Clin Pathol* **21**: 41.
- Gaur, N. K., S. A. Klotz, and R. L. Henderson.** 1999. Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect Immun* **67**: 6040-7.
- Gaur, N. K., and S. A. Klotz.** 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **65**: 5289-94.
- Geha, D. J., and G. D. Roberts.** 1994. Laboratory detection of fungemia. *Clin Lab Med* **14**: 83-97.
- Girmeria, C., P. Martino, F. De Bernardis, and A. Cassone.** 1997. Assessment of detection of *Candida* mannoproteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 903-6.
- Girmeria, C., P. Martino, F. De Bernardis, G. Gebtile, M. Boccanera, M. Monaco, G. Antonucci, and A. Cassone.** 1996. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin Infect Dis* **23**: 506-14.
- Gil, M. L., M. C. Penalver, J. L. Lopez-Ribot, J. E. O'Connor, and J. P. Martinez.** 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* **64**: 5239-47.
- Godoy, P., I. N. Tiraboschi, L. C. Severo, B. Bustamante, B. Calvo, D. A. Da Matta, and A. L. Colombo.** 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**: 401-5.
- Goldani, L. Z., and O. S. Mario.** 2003. *Candida topocalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J infect* **46**: 150-60.
- Gómez, B. L., J. I. Figueroa, A. J. Hamilton, S. Diez, M. Rojas, A. M. Tobón, R. J. Hay and A. Restrepo.** 1998. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. *J Clin Microbiol* **36**: 3309-16.

- Gomez, M. J., A. Torosantucci, S. Arancia, B. Maras, L. Parisi, and A. Cassone.** 1996. Purification and biochemical characterization of a 65-kilodalton mannoprotein (MP65), a main target of anti-*Candida* cell-mediated immune responses in humans. *Infect Immun.* **64**: 2577–83.
- Graham, G.S.** 1920. The neutrophilic granules of the circulating blood in health and disease - a preliminary report. *N Y State J Med* **20**: 46-9.
- Gruhn, J. G., and J. Sanson.** Mycotic infections in leukemic patients at autopsy. *Cancer* **16**: 61-6.
- Hadley, S., W. W. Lee, R. Ruthazer, and S. A. Jr. Nasraway.** 2002. Candidemia as a cause of septic shock and multiple organ failure in nonimmunocompromised patients. *Crit Care Med* **30**: 1808-14.
- Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock.** 2004. 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. *J Clin Microbiol* **42**: 1519-27.
- Hamilton, A. J., L. Jeavons, S. Youngchim, N. Vanittanakom, and R. J. Hay.** 1998. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffe* conidia. *Infect Immun* **66**: 6024-6.
- Hamilton, A. J., L. Jeavons, S. Youngchim, and N. Vanittanakom.** 1999. Recognition of fibronectin by *Penicillium marneffe* conidia via a sialic acid-dependent process and its relationship to the interaction between conidia and laminin. *Infect Immun* **67**: 5200-5.
- Hellinger, W. C., J. J. Cawley, S. Alvarez, S. F. Hogan, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, and F. R. Cockerill.** 1995. Clinical comparison of the isolator and BacT/Alert aerobic blood culture systems. *J Clin Microbiol* **33**: 1787-90.
- Hamilton, A. J.** 1998. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis *marneffe*; current status and future trends. *Med Mycol* **36**: 351-64.
- Hanna, S. A., J. L. Monteiro da Silva, and M. J. Giannini.** 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect* **2**: 877-84.
- Herent, P., D. Stynen, F. Hernando, J. Fruit, and D. Poulain.** 1992. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* **30**: 2158-64.
- Hermans, P. E., and W. R. Wilson.** 1980. Immunoglobulin in deficiency-pathogenesis and types of infections, in *Proc. 1st In. Symp. Infections in The Immunocompromised Host – Pathogenesis, Prevention and Therapy*, Verhoef, J., Peterson, P.K. and Quie, P., Eds. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam **5**: 121-9.
- Hitzig, W.H.** The Swiss type of agamaglobulinemia, in *Immunologic Deficiency Diseases in Man*. Bergsma, D. and Good, R. A., Eds., National Foundation-March of Dimes, Birth Defects, **4**: 82-6.
- Holmes, A. R., R. D. Cannon, M. G. Shepherd, and H. F. Jenkinson.** 1994. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* **32**: 228-31.
- Hopfer, R. L., P. Walden, S. Setterquist, and W. E. Highsmith.** 1993. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* **31**: 65-75.
- Horn, R., B. Wang, T. Kiehn, and D. Armstrong.** 1985. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset and results of therapy. *Rev Infect Dis* **7**: 646-55.



**Howlett, J. A., and C. A. Squier.** 1980. *Candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. *Infect Immun* **29**: 252-60.

**Hung, C. Y., J. J. Yu, K. R. Seshan, U. Reichard, and G. T. Cole.** 2002. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory Fungal pathogen. *Infect Immun* **70**: 3443-56.

**Hutter, R. V. P., and H. S. Collins.** 1962. The occurrence of opportunistic fungus infection in a cancer hospital. *Lab Invest* **11**: 1035-8.

**Iannini, P. B., G. D. Arai, and F. M. LaForce.** 1977. Vascular clearance of blastospore and pseudomycelial phase *Candida albicans*. *Sabouraudia* **15**: 201-5.

**Ikegami, K., K. Ikemura, T. Shimazu, M. Shibuya, H. Sugimoto, T. Yoshioka, and T. Sugimoto.** 1988. Early diagnosis of invasive candidiasis and rapid evaluation of antifungal therapy by combined use of conventional chromogenic limulus test and a newly developed endotoxin specific assay. *J. Trauma* **28**: 1118–1126.

**Ishikawa, T., A. C. Dalton, and C. E. Arbesman.** 1972. Phagocytosis of *Candida albicans* by eosinophilic leukocytes. *J Allergy Clin Immunol* **49**: 311-5.

**Iwen, P. C., D. M. Kelly, E. C. Reed, and S. H. Hinrichs.** 1995. Invasive infection due *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *Clin Infect Dis* **20**: 342-7.

**Jacquinet, P. M., Y. Plancke, B. Sendid, G. Gtrecker, and D. Poulain.** 1998. Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patients sera and distribution over *Candida* species. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 131-8.

**Jansons, V. K., and W. J. Nickerson.** 1970. Induction, morphogenesis and germination of the clamydospore of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **104**: 910-5.

**Jordan, J. A.** 1994. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* **32**: 2962-7.

**Kagaya, K. and T. Fukasawa.** 1981. Murine defense mechanism against *Candida albicans* infection. II. Opsonisation, phagocytosis and intracellular killing of *C. albicans*. *Microbiol Immun* **25**: 807-11.

**Kanda, H., K. Kubo, K. Hamasaki, Y. Kanda, A. Nakao, T. Kitamura, T. Fujita, K. Yamamoto, and T. Mimura.** 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1-->3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int* **60**: 319-23.

**Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, L. A. Conn, B. A. Perkins, D. S. Stephens, W. S. Baughman, A. I. Reinold, G. A. Rothrock, M. A. Pfaller, R. W. Pinner, and R. A. Hjeeh.** 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of population based active surveillance. *Clin Infect Dis* **29**: 1164-70.

**Kennedy, M. J., and P. A. Volz.** 1983. Dissemination of yeasts after gastrointestinal inoculation in antibiotic-treated mice. *Sabouraudia* **21**: 27-33.

**Kennedy, M. J., and P. A. Volz.** 1985. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect. Immun* **49**: 654-8.

**Kernbaum, S., and R. Bastin.** 1974. Corticoïdes et fonctions phagocytaires des polynucleaires neutrophiles humains. *Nouv. Pesse Med* **3**: 2386-91.

- Keye, J. D. Jr., and W. E. Magee.** 1956. Fungal diseases in a general hospital: a study of 188 patients. *Am J Clin Pathol* **26**: 1235-8.
- Keys, T., A. Haldorson, K. Rhodes, G. Roberts, and E. Fifer.** 1978. Nosocomial outbreak of *Rhizopus* infections associated with elastoplast wound dressings. *Minn Morbid Mortal Week Rep* **27**: 33-7.
- Khan, Z. U., and A. S. Mustafa.** 2001. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res* **156**: 95-102.
- Klebanoff, S. J., and R. A. Clark.** 1978. *The Neutrophil: Function and Clinical Disorders*. Elsevier/North Holland, New York.
- Klis, F. M.** 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-69.
- Kohno, S.** 1991. Serological diagnosis of deep-seated mycosis. *Asian Med J* **34**: 460-6.
- Komshian, S. V., A. K. Uwaydah, J. D. Sobel, and L. R. Crane.** 1989. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis* **11**: 379-90.
- Kottom, T. J., and A. H. Limper.** 2003. Microarray analysis of lung epithelial responses to *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* **50**: 629-73.
- Kozel, T. R., R. R. Brown, and G. S. Pfrommer.** 1987. Activation and binding of C3 by *Candida albicans*. *Infect Immun* **55**: 1890-3.
- Krcmery V., and A. J. Barnes,** 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* **50**: 243-60.
- Kreger-van Rij, N. J. W.** 1984. *The Yeasts. A taxonomic study*. 3rd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers.
- Kunstadter, R. H., H. MacLean, and J. Greengard.** 1952. Mycotic endocarditis due to *Candida albicans*, *JAMA* **149**: 829-31.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- LaForce, F. M., D. M. Mills, K. Iverson, R. Cousins, and E. D. Everett.** 1975. Inhibition of leukocyte candidacidal activity by serum from patients with disseminated candidiasis. *J Lab Clin Med* **86**: 657-62.
- Langerson and talice.** 1932. *Ann. de parasitologie humaine et comp.* **10**: 1-8.
- Latge, J. P.** 1995. Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*. *Curr Top Med Mycol* **6**: 245-81.
- Law, E. J., O. Kim, D. Stieritz, and B. G. MacMillan.** 1972. Experience with systemic candidiasis in the burned patient. *J Trauma* **12**: 543-5.
- Le Pape, P., and F. Deunff.** 1987. Antigène glycoprotéique circulant d'*Aspergillus fumigatus* détection dans le serum de souris par une technique ELISA. *Bull Soc Mycol Med* **16**: 169-72.
- Lee, F. J. S.** 1992. Modified protocol for yeast DNA mini-preparation. *Bio Techniques* **5**: 677-81.

**Lehrer, R. I., and M. J. Cline.** 1971. Leukocyte candidacidal activity and resistance to systemic candidiasis in patients with cancer. *Cancer* **27**: 1211-14.

**Lehrer, R. I., and M. J. Cline.** 1969a. Leucocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of mieloperoxidase in resistance to *Candida albicans*. *J Clin Invest* **48**: 1478-85.

**Lehrer, R. I. and M. J. Cline.** 1969b. Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. *J Bacteriol* **98**: 996-1001.

**Lehrer, R. I.** 1969. Antifungal effects of peroxidase systems. *J. Bacteriol* **99**: 361-68.

**Lehrer, R. I.** 1971. Measurement of candidacidal activity of specific leukocyte types in mixed cell populations. II. Normal and chronic granulomatous disease eosinophils. *Infect Immun* **3**: 800-7.

**Lehrer, R. I.** 1972. The fungicidal activity of human leukocytes, in *Phagocytic Mechanisms in health and Disease*. Willians, R.C. Jr. And Fudenberg, H.H., Eds. Intercontinental Medical, New York, **7**: 151-8.

**Lehrer, R. I.** 1975. The fungicidal mechanism of human monocytes. I. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidacidal machanisms. *J Clin Invest* **55**: 338-45.

**Lehrer, R. I., L. G. Ferrari, and J. Petterson-Delafield.** 1977. The fungicidal activity of rabbit macrophages (abstract). *Clin Res* **25**: 490-7.

**Lehrer, R. I., L. S. Goldberg, M. A. Apple, and N. P. Rosenthal.** 1972. Refractory megaloblastic anemia with mileoperoxidase-deficient neutrophils. *Am Intern Med* **76**: 447-51.

**Lehrer, R. I., K. M. Ladra, and R. B. Hake.** 1975. Nonoxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes: demosntration of components with candidacidal activity in human, rabbit and guinea pig leucocytes. *Infect Immun* **11**: 1226-32.

**Lemieux, C., G. St-Germain, J. Vincelette, L. Kaufman, and L. de Repentigny.** 1990. Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* **28**: 249-53.

**Leroy O., Gangneux J. P., Montravers P., Mira J. P., Gouin F., Sollet J. P., Carlet J., Reynes J., Rosenheim M., et al.** 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**: 1612-8.

**Levin, A. S., S. F. Costa, N. S. Mussi, M. Basso, S. I. Sinto, C. Machado, D. C. Geiger, M. C. Villares, A. Z. Chhreiber, A. A. Baroneand M. L. Branchini.** 1998. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of health care works. *Diagn Microbiol Infect Dis* **30**: 243-9.

**Levy, I.** 1998. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis* **26**:1086-8.

**Liljemark, W. F., and R. J. Gibbons.** 1973. Suppression of *Candida albicans* by human oral streptococci in gnotobiotic mice. *Infect Immun* **8**: 846-9.

**Lipnik, M. J., A. M. Kligman, and R. Strauss.** 1952. Antibiotics and fungus infections. *J Invest Dermatol* **18**: 247-60.

- Luzzati, R., G. Amalfitano, L. Lazzarini, F. Soldani, S. Bellino, M. Solbiati, M. C. Danzi, S. Vento, G. Todeschini, C. Vivenza, and E. Concia.** 2000. Nosocomial candidemia in non-neutropenic patients at an Italian tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 602-7.
- Lyon, F. L., R. F. Hector, and J. E. Domer.** 1986. Innate and acquired immune responses against *Candida albicans* in Congenic B10.D2 mice with deficiency of the C5 complement component. *J Med Vet Mycol* **24**: 359-64.
- MacMillan, B. G., E J. Law, and I. A. Holder.** 1972. Experience with *Candida* infections in the burn patient. *Arch Surg* **104**: 509-513.
- Macphail, G. L., G. D. Taylor, M. Buchanan-Chell, C. Ross, S. Wilson, and A. Kureishi.** 2002. Epidemiology, treatment and outcome of candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. *Mycoses* **45**:141-5.
- Maksymiuk, A. W., S. Thongprasert, R. Hopfer, M. Luna, V. Fainstein, and G. P. Bodey.** 1984. Systemic candidiasis in cancer patients. *Am J Med* **77**: 20-7.
- Mangiaracine, A.** 1951. Oral moniliasis following antibiotic therapy – a warning. *N Engl J Med* **244**: 655-8.
- Marcilla, A., C. Monteagudo, S. Mormeneo, and R. Sentandreu.** 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology* **145**: 695-701.
- Marques da Silva, S. H. A. L. Colombo, M .H. S. L. Blotta, F. Queiroz-Telles, J. D. Lopes, and Z. P. Camargo.** 2005. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody detection in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **43**: 4680-83.
- Marques da Silva, S.H., A. L. Colombo, M. H. Blotta, J. D. Lopes, F. Queiroz-Telles, and Z. P. Camargo.** 2003. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* **41**: 3675-80.
- Marques da Silva, S. H., F. Queiroz-Telles, A. L. Colombo, M. H. S. L. Blotta, J. D. Lopes, and Z. P. Camargo.** 2004. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J Clin Microbiol* **42**: 2419-24.
- Marques da Silva, S. H. A. L. Colombo, M .H. S. L. Blotta, F. Queiroz-Telles, J. D. Lopes, and Z. P. Camargo.** 2005. Diagnosis of Neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody detection in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **43**: 4680-83.
- Marques da Silva, S. H., A. L. Colombo, M. H.S. L. Blotta, J. D. Lopes, F. Queiroz-Telles, A. B. Baltazar, J. S. Lopes, and Z. P. Camargo.** 2006. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. *Clin Vacin Immunol* **13**: 1363-6.
- Marrie, T. J., and J. W. Costerton.** 1981. The ultrastructure of *Candida albicans* infections. *Can J Microbiol* **27**: 1156-64.
- Martins, T. B., T. D. Jaskowski, C. L. Mouritsen, and H. R. Hill.** 1995. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* **33**: 940-3.
- Mason, A. B., M. E. Brandt, and H. R. Buckley.** 1989. Enolase activity associated with a *C. albicans* cytoplasmic antigen. *Yeast* **5**: S231–S240. *Contrib. Microbiol Immunol* **3**: 138-68.

- Matthews, R. C., and J. P. Burnie.** 1988. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. *J Clin Microbiol* **26**: 459-63.
- McMahon, J. P., J. Wheat, M. E. Sobel, R. Pasula, J. F. Downing, and W. J. Martin, 2nd.** 1995. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J Clin Invest* **96**: 1010-7.
- Meads, M., W. P. Rowe, and N. M. Haslam.** 1951. Alterations in the bacterial flora of the throat during oral therapy with aureomycin. *AMA Arch Intern Med* **87**: 533-40.
- Mendes-Giannini, M. J., L. C. Ricci, M. A. Uemura, E. Toscano, and C. W. Arns.** 1994. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* **32**: 189-97.
- Mendes-Giannini, M. J., P. F. Andreotti, L. R. Vincenzi, J. L. da Silva, H. L. Lenzi, G. Benard, R. Zancope-Oliveira, H. L. de Matos Guedes, and C. P. Soares.** 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **8**: 1550-9.
- Meunier-Carpinter, F. T., E. Kiehn, and D. Armstrong.** 1981. Fungemia in the immunocompromised host. *Am J Med* **71**: 363-70.
- Meunier, F., and J. Klastersky.** 1988. Recent developments in prophylaxis and therapy of invasive fungal infections in granulocytopenic cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* **24**: 539-44.
- Merz, W G., Karp, J. E., D. Schron, and R. Saral.** 1986. Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. *J Clin Microbiol* **24**: 581-4.
- Meuwissen, H. J., M. S. Rhee, R. I. Rynes, and R. J. Pikerling.** 1982. Phagocytosis, chemiluminescence, and intracellular killing of fungi by phagocytes from subjects with deficiency of the second component of complement. *Int Arch Allerg Appl Immunol* **68**: 22-7.
- Meyer, S. A.** 1984. *Candida* Berhout. In: Kreger-van Rij, N.J.W., The Yeasts. A taxonomic study. 3rd ed. Amsterdam, Elsevier.
- Miller, S. E., and W. R. Finnerty.** 1979. Age-related physiological studies comparing *Candida albicans* chlamydo spores to yeast. *Can J Microbiol* **25**: 765-70.
- Miller, M. E., and U. R. Nilsson.** 1970. A familial deficiency of the phagocytosis-enhancing activity of serum related to dysfunction of the fifth component of complement (C5). *N Engl J Med* **282**: 354-60.
- Miller, S.E., B. O. Spurlock, and G. E. Michaels.** 1974. Electron microscopy of young *Candida albicans* chlamydo spores. *J Bacteriol* **119**: 992-7.
- Misaki, H., H. Iwasaki, and T. Ueda.** 2003. A comparison of the specificity and sensitivity of two *Candida* antigen assay systems for the diagnosis of deep candidiasis in patients with hematologic diseases. *Mes Sci Monit* **9**: MT1-MT7.
- Mitsutake, K., S. Kohno, T. Miyazaki, Y. Yamamoto, K. Yanagihara, H. Kakeya, A. Hashimoto, H. Koga, and K. Hara.** 1995. Detection of (1-3)-beta-D-glucan in a rat model of aspergillosis. *J Clin Lab Anal* **9**: 119-22.

- Mitsutake, K., T. Miyazaki, T. Tashiro, Y. Yamamoto, H. Kakeya, T. Otsubo, S. Kawamura, M. A. Hossain, T. Noda, Y. Hirakata, and S. Kohno.** 1996. Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and  $\beta$ -D-glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* **34**: 1918-21.
- Miyakawa, Y., T. Mabuchi, K. Kagaya, and Y. Fukazawa.** 1992. Isolation and characterization of a species specific DNA fragments for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 894-900.
- Miyake, Y., Y. Fuyita, S. Minagi, and H. Suginaka.** 1986. Surface hydrophobicity and adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Microbios* **46**: 7-14.
- Miyakawa, Y., T. Mabuchi, and Y. Fukazawa.** 1993. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**: 3344-7.
- Miyazaki, T., S. Kohno, K. Mitsutake, S. Maesaki, K. I. Tanaka, N. Ishikawa, and K. Hara.** 1995. Plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* **33**: 3115-18.
- Miyazaki, T., S. Kohno, H. Koga, M. Kaku, K. Mitsutake, S. Maesaki, A. Yasuoka, K. Hara, S. Tanaka, and H. Tamura.** 1992. G test, a new direct method for diagnosis of *Candida* infection: comparison with assays for betaglucan and mannan antigen in a rabbit model of systemic candidiasis. *J Clin Lab Anal* **6**: 315-18.
- Miyasaki, S. H., J. B. Hicks, D. Greenspan, I. Polacheck, L. A. MacPhail, T. C. White, N. Agabian, and J. S. Greenspan.** 1992. The identification and tracking of *Candida albicans* isolates from oral lesions in HIV-seropositive individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* **5**: 1039-46.
- Miyazaki, T., S. Kohno, K. Mitsutake, H. Yamada, A. Yasuoka, S. Maesaki, M. Kaku, H. Koga, and K. Hara.** 1992. Combination of conventional and endotoxin-specific limulus tests for measurement of polysaccharides in sera of rabbits with experimental systemic candidiasis. *Tohoku J. Exp. Med.* **168**: 1-9.
- Montes, L. F., and V. S. Constantine.** 1968. Cytochemical demonstration of aminopeptidase in *Candida albicans*. *J Invest Dermatol* **51**: 1-3.
- Moreli, R., and L. T. Rosenberg.** 1971. The role of complement in the phagocytosis of *Candida albicans* by mouse peripheral blood leukocytes. *J Immunol* **107**: 476-9.
- Mukherjee, J., L. S. Zuckier, M. D. Scharff, and A. Casadevall.** 1994. Therapeutic efficacy of monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan alone and in combination with amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 580-7.
- Na, B.K., and C.Y. Song.** 1999. Use of monoclonal antibody in diagnosis of candidiasis caused by *Candida albicans*: detection of circulating aspartyl proteinase antigen. *Clin Diag Lab Immunol* **6**: 924-9.
- Nickerson, W. J., and Z. Mankowski.** Role of nutrition in the maintenance of the yeast-shape in *Candida albicans*. *Am J Bot* **40**: 584-7.
- Niesters, H. G., W. H. Goessens, J. F. Meis, and W. G. Quint.** 1993. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol* **31**: 904-10.
- Nosanchuk, J. D., J. N. Steenbergen, L. Shi, G.S. Jr. Deepe, and A. Casadevall.** 2003. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest* **112**: 1164-5.
- Nucci, M., and A. L. Colombo.** 2002. Risk factors for breakthrough candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 209-11.

**Nucci, M., M. I. Silveira, N. Spector, F. Silveira, E. Velasco, C. A. Martins, A. Derossi, A. L. Colombo, and W. Pulcheri.** 1998. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of *non-albicans* species. *Mycopathology* **141**: 65-8.

**Obayashi, T., M. Yoshida, T. Mori, H. Goto, A. Yasuoka, H. Iwasaki, H. Teshima, S. Kohno, A. Horiuchi, A. Ito, and et al.** 1995. Plasma (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* **345**: 17-20.

**Odds, F. C.** 1979. Problems in the laboratory assessment of antifungal activity. *Postgrad Med J* **55**: 677-80.

**Odds, F. C., and E. G. Evans.** 1980. Distribution of pathogenic yeasts and humoral antibodies to *Candida* among hospital inpatients. *J Clin Pathol* **33**: 750-6.

**Ozato, K., and I. Uesaka.** 1974. The role of macrophages in *Candida albicans* infection *in vitro*. *Jpn J Microbiol* **18**: 29-33.

**Pappas, P. G., J. H. Rex, J. Lee, R. J. Hamill, R. A. Larsen, W. Powderly, C. A. Kauffman, N. Hyslop, J. E. Mangino, S. Chapman, H. W. Horowitz, J. E. Edwards, and W. E. Dismukes.** 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* **37**: 634-43.

**Penalver, M. C., J. E. O'Connor, J. P. Martinez, and M. L. Gil.** 1996. Binding of human fibronectin to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* **64**: 1146-53.

**Pereira, C. A. P.** 1997. Impacto da implementação de métodos automatizados em hemoculturas na evolução clínica de pacientes com infecções da corrente sanguínea. São Paulo. Tese- Doutorado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

**Persi, M. A., and J. C. Burnham.** 1981. Use of tunic acid as fixative a -mordant to improve the ultrastructural app appearance of *Candida albicans* blastospores. *Sabouraudia* **19**: 1-9.

**Peterson, E. M., and R. A. Calderone.** 1977. Growth inhibition of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages. *Infect Immun* **15**: 910-5.

**Pfaller, M.A, R. N. Jones, G. V. Doern, A.C. Fluit, J. Verhoef, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman, and R. J. Hollis.** 1999. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). *Diagn Microbiol Infect Dis* **35**: 19-25.

**Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, A. S. Messer, A. Houstoun, S. Coffman, and R. J. Hollins.** 2000. Bloodstream surveillance program in North América and Latin América, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 747-51.

**Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema.** 2004. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* **42**: 3142-6.

**Pfaller, M. A.** 1995. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect* **30**: 329-38.

**Pfaller, M. A.** 1996. Nosocomial candidiases: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22**: S89-S94.

- Phillips, P., A. Dowd, P. Jewesson, G. Radigan, M. G. Tweeddale, A. Clarke, I. Greere, and M. Kelly.** 1990. Non-value of antigen detection immunoassays for diagnosis of candidemia. *J Clin Microbiol* **28**: 2320–6.
- Pittet, D., N. Li, R. F. Woolson, and R. P. Wenzel.** 1997. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* **24**: 1068-78.
- Poulain, D., G. Tronchin, J. F. Dubremetz, and J. Biguet.** 1978. Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: Study of this constitutive layers by use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann Microbiol* **129**: 141-4.
- Price, M. F., M. T. LaRocco, and L. O. Gentry.** 1994. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood cultures over a 5-year period. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1422-4.
- Quie, P. G.** 1976. Infection associated with phagocytic cell deficiencies, in *Infection and The Compromised host*, Allen, J.C., Ed., Williams & Willkins, Baltimore. **81**: 122-45.
- Rand, K., H. Houck, and M. Wolff.** 1994. Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **8**: 215-22.
- Reiches, A. J.** 1951. Antibiotic sensitivity and moniliasis. *Arch Dermatol Syphilo* **64**: 604-9.
- Reiss, E., and C. J. Morrison.** 1993. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* **6**: 311-23.
- Reiss, E., L. Stockman, R. J. Kuykendall, and S. J. Smith.** 1982. Dissociation of mannan-serum complexes and detection of *Candida albicans* mannan by enzyme immunoassay variations. *Clin Chem* **28**: 306-10.
- Richet, H., P. Roux, C. Des Champs, Y. Esnault, and A. Andreumont.** 2002. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* **8**: 405-12.
- Rinaldi, M. G.** 1993. Biology and pathogenicity of *Candida* especies, p-1-20. In G.P. Bodey (ed.), *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Reven Press, New York.
- Rogers, T., and E. Balish.** 1980. Immunity of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **44**: 660-3.
- Rodrigues, M. L., F. C. dos Reis, R. Puccia, L. R. Travassos, and C. S. Alviano.** 2003. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microb Pathogen* **34**: 65-71.
- Saiman, L., E. Ludington, J. D. Dawson, J. E. Patterson, S. Rangel-Frausto, R. T. Wiblin, H. M. Blumberg, M. Pfaller, M. Rinaldi, J. E. Edwards, R. P. Wenzel, and W. Jarvis.** 2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* **20**: 1119-24.
- Sanchez, V., J. A. Vazquez, D. Barth-Jones, L. Dembry, J. D. Sobe, and M. J. Zervos.** 1993. Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: an epidemiologic study. *Am J Med* **94**: 577-82.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.



- Saito, T., K. Senda, S. Takakura, N. Fujihara, T. Kudo, Y. Inuma, M. Tanimoto, and S. Ichiyama.** 2003. Detection of bacteria and fungi in BacT/Alert standard blood-culture bottles. *J Infect Chemother* **9**: 227-32.
- Schumacher, H.R., D. A. Ginns, and W. J. Warren.** 1964. Fungus infection complicating leukemia. *Am J Med Sci* **247**:313-5.
- Seelig, M. S.** 1968. The rationale for preventing antibacterial-induced fungal overgrowth. *Med Times* **96**: 689-710.
- Sendid, B., M. Tabouret, J. L. Poirot, D. Mathieu, J. Fruit, and D. Poulain.** 1999. New enzyme immunoassay for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* **37**: 1510-7.
- Sendid, B., D. Caillot, B. Baccouch-Humbert, L. Klingspor, M. Grandjean, A. Bonnin, and D. Poulain.** 2003. Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* **41**: 4551-8.
- Shannon, J. L., and A. H. Rothman.** 1971. Transverse septum formation in budding cells of the yeast-like fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **106**: 1026-9.
- Shigei, J. T., J. A. Shimabukuro, M. T. Pezzlo, L. M. de la Maza, and E. M. Peterson.** 1995. Value of terminal subcultures for blood cultures monitored by BACTEC 9240. *J Clin Microbiol* **33**: 1385-8.
- Silverman, S., Jr., L. Luangjarmekorn, and D. Greenspan.** 1984. Occurrence of oral *Candida* in irradiated head and neck cancer patients. *J Oral Med* **39**: 194-6.
- Silva-Hunter, M.** 1970. Yeasts. in *Manual of Clinical Microbiology*. Blair J., Lennette E.H. and Truant, J.P., Eds. Williams & Wilkins. Baltimore **352**: 123-9.
- Smith, C.B.** 1958. Candidiasis: pathogenesis, host resistance and predisposing factors, in *Candidiasis*. Bodey, G.P. and Fainstein, V. Eds. Raven, New York **53**: 232-7.
- Smith, C., D. and M. L. Goodman.** 1975. Improved culture method for the isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* from contaminated specimens. *Amer J Clin Path* **63**: 276-280.
- Sogin, M. L., and J. H. Gunderson.** 1987. Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. Evolutionary implications. *Ann N Y Acad Sci* **503**: 125-39.
- Soll, D.R.** 1985. *Candida albicans*, in *Fungal Dimorphism, with Emphasis on Fungi Pathogenic for Humans*. Szaniszló, P J Ed Plenum, New York.
- Stamos, J. K., and A. H. Rowley.** 1995. Candidemia in a pediatric population. *Clin Infect Dis* **20**: 571-5.
- Stanley V. C., and R. Hurley.** 1969. The growth of *Candida* species in cultures of mouse peritoneal macrophages. *J Pathol* **97**: 357-9.
- Stevens, D. A.** 2002. Molecular epidemiology of *Candida*. *J Clin Microbiol* **40**:2710-6.
- St-Germain, G., M. Laverdiere, R. Pelletier, P. Rene, A. M. Bourgault, C. Lemieux, and M. Libman.** 2008. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **19**: 55-62.
- Stone, H. H.** 1974. Studies in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of *Candida* sepsis in children. *J Pediatr Surg* **9**: 127-33.

**Strausbaugh, L. J., D. L. Sewell, T. T. Ward, M. A. Pfaller, T. Heitzman, and R. Tjoelker.** 1994. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* **32**: 2299-300.

**Sutter, V. L., and S. M. Finegold.** 1974. The effect of antimicrobial agents on human faecal flora: studies with cephalixin, cyclacillin and clindamycin. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **3**: 229-40.

**Tamura, M., K. Watanabe, Y. Mikami, K. Yazawa, and K. Nishimura.** 2001. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. *J Clin Microbiol* **39**: 4309-15.

**Tarrand, J. J., C. Guillot, M. Wenglar, J. Jackson, J. D. Lajeunesse, and K. V. Rolston.** 1991. Clinical comparison of the resin-containing BACTEC 26 Plus and the Isolator 10 blood culturing systems. *J Clin Microbiol* **29**: 2245-9.

**Tarttersall, M. H.** 1975. Aggressive cancer treatment and its role in predisposing to infection. *Eur J Cancer* **11**: 9-11.

**Tashdjian, C. L., E. F. Toni, K. C. Hsu, M. S. Seelig, M. B. Cuesta, and P. J. Kozinn.** 1971. Immunofluorescence studies of *Candida* in human reticuloendothelial phagocytes: implications for immunogenesis and pathogenesis of systemic candidiasis. *Am J Clin Pathol* **56**: 50-4.

**Taylor, H., and J. A. Rundle.** 1952.A. Acute moniliasis of the urinary tract, *Lancet* **1**: 1236-9. 1952.

**Telenti, A., and G. D. Roberts.** 1989. Fungal blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**: 825-31.

**Telenti, A., J. M. Steckelberg, L. Stockman, R. S. Edson, and G. D. Roberts.** 1991. Quantitative blood cultures in candidemia. *Mayo Clin Proc* **66**: 1120-3.

**Tinghitella, T. J., and M. D. Lamagdeleine.** 1995. Assessment of Difco ESP 384 blood culture system by terminal subcultures: failure to detect *Cryptococcus neoformans* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **33**: 3031-3.

**Torack, R.M.** 1957.Fungus infections associated with antibiotic and steroid therapy. *Am J Med* **22**: 872-9.

**Torosantucci, A., C. Bromuro, M. J. Gomez, C. M. Ausiello, F. Urbani and A.Cassone.** 1993. Identification of a 65-kDa mannoprotein as a main target of human cell-mediated immune response to *Candida albicans*. *J Infect Dis* **168**: 427-435.

**Torosantucci, A., M. J. Gomez, C. Bromuro, J. Casalnuovo, and A. Cassone.** 1991. Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial form of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol.* **29**: 361-372.

**Torosantucci, A., C. Palma, M. Boccanera, C. M. Ausiello, G. C. Spagnoli, and A. Cassone.** 1990. Lymphoproliferation and cytotoxic responses of human peripheral blood mononuclear cells to mannoprotein constituents of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **136**: 664-72.

**Tortorano, A. M., E. Biraghi, A. Astolfi, C. Ossi, M. Tejada, C. Farina, S. Perin, C. Bonaccorso, C. Cavanna, A. Raballo, and A. Grossi.** 2002. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. *J Hosp Infect* **51**: 297-304.

**Tortorano, A. M., J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, C. C. Kibbler, O. Faure, E. Biraghi, E. Canton, K. Zimmermann, S. Seaton, and R. Grillot.** 2004. Epidemiology of candidaemia in

Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 317-22.

**Tronchin, G., M. Pihet, L. M. Lopes-Bezerra, and J. P. Bouchara.** 2008. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol* **46**: 749-72.

**Upton, A., W. Leisenring, and K. A. Marr.** 2006. (1->3) beta -D-glucan assay in the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* **42**: 1054-6.

**Van Deventer, A. J., H. J. van Vliet, W. C. Hop, and W. H. Goessens.** 1994. Diagnostic value of anti-*Candida* enolase antibodies. *J Clin Microbiol* **32**: 17-23.

**Vanden-Bergh, M. F., P. E. Verweij, and A. Voss.** 1999. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn Microbiol Infect* **34**: 221-7.

**Viscoli, C., E. Castagnola, M. Giacchino, S. Cesaro, E. Properzi, F. Tucci, R. M. Mura, P. Alvisi, G. Zanazzo et al.** 1999. Bloodstream infections in children with cancer: a multicentre surveillance study of the Italian Association of Paediatric Haematology and Oncology. Supportive Therapy Group-Infectious Diseases Section. *Eur J Cancer* **35**: 770-4.

**Verduyn Lunel, F. M., J. F. Meis, and A. Voss.** 1999. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**: 213-20.

**Vicentini, A. P., J. L. Gesztesi, M. F. Franco, W. de Souza, J. Z. de Moraes, L. R. Travassos, and J. D. Lopes.** 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* **62**: 1465-9.

**Voss, A., J. L. le Noble, F. M. Verduyn Lunel, N. A. Foudraine, and J. F. Meis.** 1997. Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. *Infection* **25**: 8-11.

**Viudes, A., J. Peman, E. Canton, P. Ubeda, J. L. Lopez-Ribot, and M. Gobernado.** 2002. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 767-74.

**Wahyuningsih, R., H. J. Freisleben, H. G. Sountag, and P. Schnitzler.** 2000. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* **38**: 3016-21.

**Walsh, T. J., and S. J. Chanock.** 1998. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Curr Clin Top Infect Dis* **18**: 101-53.

**Wasylnka, J. A., and M. M. Moore.** 2000. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect Immun* **68**: 3377-84.

**Walsh, T. J., and J. H. Rex.** 2002. All catheter-related candidemia is not the same: assessment of the balance between the risks and benefits of removal of vascular catheters. *Clin Infect Dis* **34**: 600-2.

**Walsh, T. J., J. W. Hathorn, J. D. Sobel, W. G. Merz, V. Sanchez, S. M. Maret, H. R. Buckley, M. A. Pfaller, R. Schaufele, et al.** 1991. Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med* **324**: 1026-31.

- Weems, J. J. Jr.** 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* **14**: 756-66.
- Weiner, M. H., and M. Coats-Stephen.** 1979. Immunodiagnosis of systemic aspergillosis. I. Antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental infection. *J Lab Clin Med* **93**: 111-9.
- Wenzel, R. P.** 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* **20**: 1531-4.
- Wey, S. B., M. Mori, M. A. Pfaller, R. F. Woolson, and R. P. Wenzel.** 1988. Hospital acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. *Arch Inter Med* **148**: 2642-5.
- Wingard, J. R., J. D. Dick, W. G. Merz, G. R. Sandford, R. Saral, and W. R. Burns.** 1982. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect Immun* **37**: 833-6.
- Wingard, J. R.** 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* **20**: 115-25.
- Winner, H. I. and P. Hurley.** 1964. Pathogenicity in the genus *Candida*. *Mycopathol Mycol Appl* **24**: 337-42.
- Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-17.
- Wolf, F.W.** 1952. Moniliasis pneumonia following aureomycin therapy. *Lancet* **1**: 1236-41.
- Wolfson, J. S., A. J. Sober, and R. H. Rubin.** 1985. Dermatologic manifestation of infections in immunocompromised patients. *Medicine* **64**: 115-9.
- Wong, P. N., S. K. Mak, K. Y. Lo, G. M. Tong, and A. K. Wong.** 2000. A retrospective study of seven cases of *Candida parapsilosis* peritonitis in CAPD patients: the therapeutic implications. *Perit Dial Int* **20**: 76-9.
- Wybel, R. E.** 1952. Mycosis of cervical spinal cord following intrathecal penicillin therapy; report of a case simulating cord tumor. *AMA Arch Pathol* **53**: 167-73.
- Yamaguchi, H.** 1974. Effect of biotin insufficiency on composition and ultrastructure of cell wall of *Candida albicans* in relation to its mycelial morphology. *J Gen Appl Microbiol* **20**: 217-9.
- Yamaguchi, H., Y. Kanda, and M. Osmi.** 1974. Dimorphism in *Candida albicans*. II. Comparison of fine structure of yeast-like and filamentous phase growth. *J Gen Appl Microbiol* **20**: 101-5.
- Yamura, D. L., C. Rotstein, L. E. Nicole, and S. Loannou.** 1999. Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease register, 1992-1994. *Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society. CMAJ* 1999; **160**: 493-9.

**Year, H., B. Sendid, N. Francois, D. Camus, and D. Poulain D.** 2001. Contribution of serologic tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 864-70.

**Zimmerman, L. E.** 1950. *Candida and Aspergillus* endocardites: with comments on the role of antibiotics in dissemination of fungus disease. *Arch Pathol* **50**: 591-5.

**Zoller, L., I. Kramer, R. Kappe, G. Sonntag.** 1991. Enzyme immunoassays for invasive *Candida* infections: reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **29**: 1860-7.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)