

---

## CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE CEPAS DE *Candida* ISOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDÍASE VAGINAL

---

Evandro Leão Ribeiro,<sup>1</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva,<sup>1</sup> Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes,<sup>1</sup> Soraya Cristina da Silva<sup>1</sup> e Ailton José Soares<sup>2</sup>

### RESUMO

As 63 cepas de *Candida*, previamente isoladas de 120 mulheres com suspeita clínica de candidíase vaginal atendidas na cidade de Goiânia-GO e identificadas segundo Kregen-Van RIJ, foram caracterizadas fenotipicamente quanto aos aspectos morfológicos, biológicos e sorológicos. Nos 57 isolados de *C. albicans* verificou-se com maior incidência o morfotipo 5330 dentre os sete morfotipos presenciados. Nas 4 cepas de *C. krusei* foram detectadas os morfotipos 0000, 5230 e 5330 e, nos dois cultivos de *C. tropicalis*, os morfotipos, 5220 e 5240. A biotipagem de Odds & Abbott mostrou os biotipos 377 e 777 nos isolados de *C. albicans*. Nas cepas de *C. krusei* e de *C. tropicalis* detectou-se o biotipo 677. Quanto à sorotipagem dos isolados de *C. albicans* houve o predomínio do sorotipo A em 56 (98,2%) das cepas.

UNITERMOS: Fenotipagem. Candidíase vaginal. *Candida spp.*

### INTRODUÇÃO

Em busca de melhor caracterização e individualização dos isolados de *Candida*, várias metodologias de tipagem fenotípica têm sido desenvolvidas, diante da necessidade de informações de caráter epidemiológico, de auxílio na identificação precisa do patógeno e suas relações filogenéticas (20, 22). A caracterização fenotípica das cepas de *Candida* compreende o estudo de aspectos morfológicos, biológicos e sorológicos das leveduras.

O modelo de morfotipagem para os isolados de *Candida* é baseado nas diferenças morfológicas entre as colônias de espécie de *Candida*

---

1 Professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (DMIPP/IP-TSP/UFG.)

2 Técnico de Laboratório do DMIPP/IPTSP/UFG.

Endereço para correspondência: Rua Delenda Rezende de Melo esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO.

Recebido para publicação em 26/09/97. Revisto em 29/05/98. Aceito em 29/06/98.

*albicans*, mantida em meio de ágar-extrato de malte (19, 11). Estas diferenças morfológicas são analisadas quanto à presença, ao tamanho e à textura de franjas na borda da colônia, além da sua topografia de superfície (9, 10, 11, 19).

Outro método de tipagem de leveduras é a biotipagem de Odds & Abbott (17). Este consiste em uma série de testes bioquímicos que permite a identificação de 512 biotipos diferentes de acordo com o comportamento das leveduras do gênero *Candida* diante de testes de tolerância a pH, produção de enzimas, assimilação de substâncias e resistência a drogas e corantes.

Estruturalmente, os isolados de *Candida albicans* apresentam a parede celular constituída de complexos proteínas-polissacarídios, nos quais a fração manana atua como fator antigênico celular. De acordo com esta propriedade imunológica, as cepas de *Candida albicans* são classificadas nos sorotipos A e B (2, 8, 23).

Considerando os aspectos assinalados, este trabalho objetivou verificar as características fenotípicas apresentadas pelas leveduras do gênero *Candida*, isoladas de mulheres com suspeita clínica de candidíase vaginal, quando submetidas aos métodos de tipagem morfológica, biológica e sorológica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *Candida* - As 63 cepas de *Candida*, isoladas e identificadas segundo Kregen-van Rij(13) neste estudo, foram provenientes de 120 mulheres com suspeita clínica de candidíase vaginal atendidas na Santa Casa de Misericórdia de Goiânia. Foram utilizadas ainda duas outras cepas de *Candida albicans*, respectivamente sorotipos A e B, obtidas da Micoteca do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP).

### Marcadores fenotípicos

Morfotipagem - Realizada em meio de ágar-extrato de malte, mediante semeadura de duas cepas de *Candida* (inóculo com turbidez ajustada em 3 na escala de Mc Farland) em cada placa de Petri com swabs esterilizados. Após a incubação das placas a 25°C por dez dias, a leitura foi feita com base nos aspectos macromorfológicos da franja e na topografia da colônia através do modelo proposto por Hunter et al. (10,11), conforme sumarizado no quadro 1.

Quadro 1. Modelo de tipificação de morfotipos de espécies de *Candida*, segundo Hunter et al.

Ordem dos dígitos		Valores
1ª Franja - Distribuição	Ausente	0
	Descontínua ( $\leq$ 20% da margem)	1
	Descontínua (20 a 50% da margem)	2
	Descontínua (60 a 90% da margem)	3
	Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leque	5
	Contínua, com filamentos paralelos	7
2ª Franja - Comprimento	Ausente	0
	Igual ou menor a 2 mm	2
	Entre 3 a 5 mm	3
	Igual ou maior a 6 mm	5
3ª Franja - Textura	Ausente	0
	Muito grosseira	1
	Grosseira	2
	Intermediária	3
	Fina	4
4ª Superfície - Topografia	Lisa	0
	Nodular	1
	Escavada	2
	Crateriforme	4
	Crateriforme com dobras e pregas	5
	Dobras e pregas	6
	Pêlos	8

Biotipagem - Feita através da inoculação das suspensões de cepas de *Candida* (inóculo com turbidez ajustada em 3 na escala de Mc Farland) pelo inoculador de Steers nos nove meios de análise da biotipagem de Odds & Abbott (17). Após a incubação a 37°C por períodos variáveis, a leitura foi realizada e o resultado traduzido pela somatória de cada tríade de testes, sendo considerados positivos os cultivos desenvolvidos nos meios de pH 1,4; 5 flucitossina, cloreto de sódio, ácido bórico, uréia, sorbose e citrato de sódio; e naqueles que produziram colônias de tamanho igual ou maior do que 2 mm de diâmetro em presença de safranina. A produção de proteinase foi verificada através da técnica de Staib (18). A expressão numérica dos resultados foi alcançada de acordo com os valores apresentados no quadro 2.

Quadro 2. Modelo de biotipagem (Odds & Abbott)

Ordem dos dígitos	Provas	Valores
1º	Resistência ao pH 1,40	1
	Produção de proteinase	2
	Resistência a 5 - fluorcitosina	4
2º	Assimilação da uréia	1
	Assimilação da sorbose	2
	Tolerância ao cloreto de sódio	4
3º	Assimilação do citrato	1
	Resistência ao ácido bórico	2
	Resistência à safranina	4

Sorotipagem - Executada a partir da inoculação de 1,0 ml da suspensão de *Candida albicans*, previamente sorotipada como sorotipo A, via veia marginal da orelha em coelhos albinos em diferentes dosagens e tempos (quadro 3), fez-se sangria dos animais uma semana após a última inoculação, obtendo-se, assim, o anti-soro A. Misturou-se o anti-soro obtido com igual volume de suspensão de *Candida albicans* previamente sorotipada como B. O anti-soro absorvido é considerado monoespecífico para *Candida albicans* sorotipo A. A reação de aglutinação entre o anti-soro obtido e a suspensão de células de *C. albicans* desconhecida permitiu classificar as cepas em sorotipos A e B (2, 8).

Quadro 3 - Indução imunológica para produção de anti-soro A em coelhos

Dias	Concentração de leveduras/ml.
1º	5.10 <sup>5</sup>
4º	5.10 <sup>5</sup>
7º	2.10 <sup>6</sup>
10º	4.10 <sup>6</sup>
13º	8.10 <sup>6</sup>
16º	2.10 <sup>7</sup>
19º	5.10 <sup>7</sup>

## RESULTADOS

### Morfotipagem

O estudo das 63 cepas de *Candida*, isoladas de secreção vaginal de mulheres com candidíase, permitiu a identificação de nove morfotipos

diferentes. Em isolados de *Candida albicans*, observou-se predomínio do morfotipo 5330; *Candida tropicalis* mostrou os morfotipos 5220 e 5240; e *Candida krusei* apresentou também predomínio do morfotipo 5330 (Tabela 1).

### Biotipagem

O sistema de biotipagem de Odds & Abbott (17) possibilitou identificar três diferentes biotipos para os isolados de *Candida* de mulheres com candidíase vaginal. Os biotipos 377 (19,3%) e 777 (80,7%) foram detectados nas cepas de *Candida albicans*. Em *Candida krusei* e *Candida tropicalis* verificou-se o biotipo 677 em todos os cultivos (Tabela 1).

### Sorotipagem

Das 57 cepas de *Candida albicans* isoladas da secreção vaginal de mulheres com candidíase, 56 (98,2%) foram classificadas como sorotipo A e uma (1,8%) como sorotipo B (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos códigos obtidos através de tipagens fenotípicas realizadas em 63 cepas de espécies de *Candida* isoladas de mulheres com candidíase

Espécies	Morfotipagem		Biotipagem		Sorotipagem	
	Códigos	Nº de Cepas (N)	Códigos	Nº de Cepas (N)	Códigos/Tipos	Nº de Cepas (N)
<i>C. albicans</i>		(57)		(57)		(57)
	0000	03 (5,3%)	377	11 (19,3%)	A	56 (98,2%)
	3220	02 (3,5%)	777	46 (80,7%)	B	01 (1,8%)
	5230	07 (12,3%)				
	5320	08 (14,0%)				
	5330	23 (40,3%)				
	5530	11 (19,3%)				
	7330	03 (5,3%)				
<i>C. krusei</i>		(04)		(04)		
	0000	01 (25,0%)	677	04 (100,0%)		
	5230	01 (25,0%)				
	5330	02 (50,0%)				
<i>C. tropicalis</i>		(02)		(02)		
	5220	01 (50,0%)	677	02 (100,0%)		
	5240	01 (50,0%)				

## DISCUSSÃO

O emprego da tipagem fenotípica nas leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade vaginal de mulheres com candidíase, teve como finalidade caracterizar cada cepa de *Candida* envolvida nesta infecção fúngica através da expressividade dos fenótipos leveduriformes (4, 18). Já os

métodos genotípicos, baseados na cariotipagem eletroforética unidirecional e em campo pulsante, na hibridação com sondas de ácido desoxirribonucléico (DNA), no emprego de reação em cadeia de polimerase (PCR) ou também na associação destas técnicas, têm sido comumente empregados para melhor diferenciação das leveduras fenotipicamente indistinguíveis (27).

As diferenças de modelos de morfotipagem, em relação aos isolados de *Candida* oriundos das mucosas oral e vaginal, devem-se provavelmente às características próprias de cada colônia fúngica (1, 4, 5, 10), embora a inibição da expressão fenotípica do fungo por ação terapêutica previamente empregada possa também influenciar no padrão de morfotipagem das leveduras (4, 9, 12, 15). Entre 63 cultivos de *Candida* isolados neste estudo evidenciaram-se nove morfotipos diferentes, havendo predominância do modelo 5330 entre as cepas de *Candida albicans* e *Candida krusei*. Nos trabalhos de Cândido (4) e Caramalac (5), com isolados de *Candida albicans* da cavidade vaginal, foram encontrados principalmente os morfotipos 0000 e 5446, 0000 e 7330, respectivamente.

A formação de franjas por cepas de *Candida* cultivadas em meio de ágar-extrato de malte, apontada como um atributo fúngico de patogenicidade, foi observada em 95,2% das leveduras. A produção de franjas nestas cepas, oriundas de pacientes com candidíase vaginal, confirma esta possível associação (1, 4, 5, 9, 10, 11, 19).

Quanto à biotipagem de Odds & Abbott (17), empregada na identificação dos isolados de *Candida*, procedentes de mulheres com candidíase vaginal, presenciaram-se três biotipos diferentes. As 57 cepas de *Candida albicans* apresentaram os biotipos 377 e 777 e *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, o biotipo 677. Odds & Abbott (17) encontraram 45 biotipos fazendo análise de 85 cultivos de *Candida* isolados das cavidades oral e vaginal e Cândido (4), analisando 100 isolados de *Candida albicans* provenientes de diversos materiais clínicos, obteve 26 biotipos, apresentando, portanto, em ambos os casos, um número de biotipos muito mais elevado do que os obtidos em nosso estudo. No entanto Loschagin-Pizzolitto et al. (14) detectaram quatro biotipos em cepas de *Candida albicans* isoladas de secreção vaginal e Caramalac (5), cinco biotipos com predominância do biotipo 777 (62,0%) em secreção vaginal de parturientes, resultados bem semelhantes aos aqui registrados.

Estudos realizados na Europa e na América, incluindo Brasil, mostraram que a maioria dos isolados de *Candida albicans*, provenientes de pacientes com diversas formas clínicas de infecção, pertencem ao sorotipo A com um índice de frequência oscilando entre 66,8 e 97,9% (1, 3, 5, 16, 20, 22). O alto índice de cepas de *Candida albicans* identificadas, neste estudo, como pertencentes ao sorotipo A (98,2%), concorda com os registros de Garcia & Siqueira (7) e Loschagin-Pizzolitto et al. (14), que, classificando isolados também procedentes de cavidade vaginal, obtiveram,

respectivamente, 86,2% e 100% de cepas de *Candida albicans* sorotipo A. A prevalência de qualquer um destes sorotipos A ou B, em cepas de *Candida albicans* isoladas, independente do sítio anatômico, parece sofrer influência da área geográfica da população amostrada, bem como das alterações químicas e antigênicas que a fração manana possa apresentar na célula fúngica (6, 18, 21).

## SUMMARY

Phenotypical characteristics of *Candida* strains isolated from patients with vaginal candidiasis

Sixty-three strains of *Candida* were isolated from 120 females patients with clinical symptoms of vaginal candidiasis (city of Goiânia – GO), and classified according to KREGEN-Van RIJ. The strains were then phenotypically characterised in conformity with morphological, biological and serological aspects. Morphotype 5330 had the highest incidence in the 57 isolates of *C. albicans*, in the *C. krusei* strain we detected morphotypes 0000, 5230 and 5330 and in the two cultures of *C. tropicalis* morphotypes 5220 and 5240. Biotype analysis according to Odds & Abbott showed biotypes 377 and 777 in the *C. albicans* isolates and biotype 677 in the *C. krusei* and *C. tropicalis* strains. Serotype A was predominant in 98,2% (n=56) of the *C. albicans* strains.

KEYWORDS: Phenotyping. Vaginal candidiasis. *Candida* spp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Barreto de Oliveira, M.T. *Leveduras isoladas da mucosa bucal de portadores sadios, pacientes com SIDA e neoplasias*. Produção de exoenzimas e tipagem de amostras de *Candida albicans*. São Paulo, 1993, 107 p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas - USP.
02. Biquet, J.; Tran Vanky, P.; Andrie, S. Étude électrophoretique et immunochimique comparée des antigènes de quelques levures du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*). *Mycopathologia*, 17: 239-254, 1962.
03. Brawnner, D. L. Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1020-1025, 1991.
04. Cândido, R. C. *Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos. São Paulo, 1991, 167 p. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina.
05. Caramalac, D. A. Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidos: tipagem das amostras de *Candida albicans*. São Paulo, 1995. 123p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas - USP.
06. Chattaway, F. W. & Holmes, M.R. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, 51: 367-376, 1988.

07. Garcia, A. L. & Siqueira, A. M. Isolamento, identificação e sorotipagem de *Candida albicans* a partir de secreção vaginal. *Rev. Inst. Med. trop.*, 30: 270-273, 1988.
08. Hanseclaver, H. F. & Mitchell, W. O. Antigenic relationships of *Torulopsis glabrata* and seven species of the genus *Candida*. *J. Bacteriol.*, 79: 677-81, 1960.
09. Hunter, P.R. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Crit. Rev. Microbiol.*, 17: 417-34, 1991.
10. Hunter, P.R. & Fraser, C. A. M. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 2156-60, 1989.
11. Hunter, P.R.; Fraser, C. A. M.; Mackenze, D. W. R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *J. Med. Microbiol.*, 28: 85-91, 1989.
12. Korting, H. C.; Ollert, M.; Georgii, A.; Froschl, M. *In vitro* susceptibilities and biotypes of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 2626-31, 1988.
13. Kreger-van Riij, N. J. W. *The yeast: a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1984, 1082 p.
14. Loschagin-Pizzolitto, E.; Cunha, L. A.; Mendes-Giannini, M. J. Sorotipagem e biotipagem de *Candida albicans* isoladas em secreções vaginais. *Rev. Microbiol.*, 22 (Supl 1): 92-8, 1991.
15. Millon, L.; Manteaux, A.; Reboux, G.; Drobacheff, C.; Monod, M. Barale, T.; Michel-Briand, Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1115-8, 1994.
16. Neely, A. N.; Odds, F. C.; Basatia, B. K.; Holder, I. A. Characterization of *Candida* isolates from pediatric burn patients. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 1645-9, 1988.
17. Odds, F. C. & Abbott, A. B. A Simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia*, 18: 301-17, 1980.
18. Odds, F. C.; Brawner, D. L.; Staudinger, J.; Magee, P. t.; Soll, D. R. Typing of *Candida albicans* strains. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30 (Supl 1): 87-94, 1992.
19. Phongpaichit, S.; Mackenzie, D. W. R.; Fraser, C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. *Epidem. Inf.*, 99: 421-8, 1987.
20. Ricci, T. A.; Moraes, R.A.; Carvalho, R. X.; Toscano, E.; Branco, F. C.; Melhem, M. S. C.; Giudice, M. C.; Mendes Gianni, M. J. Diferenças entre cepas de *Candida albicans* de pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida e de indivíduos aparentemente normais. *Rev. Microbiol.*, 22 (Supl 1): 84, 1991.
21. Silveira, F. R. X.; Birman, E. G.; Paula, C. R.; Batista, J. M. Proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers). *Rev. Iber. Micol.*, 10: 105-8, 1993.
22. Stevens, D. A.; Odds, F. C.; Sheres, S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. *Rev. Infect. Dis.*, 12: 258-66, 1990.
23. Sweet, C. E. & Kaufman, L. Application of agglutinins for rapid and accurate identification of medically important *Candida* species. *Appl. Microbiol.*, 19: 830-6, 1970.