
***Candida albicans* DE MUCOSA VAGINAL:
MORFOTIPAGEM E PRODUÇÃO DE PROTEINASE**

Tatiana Dias Lima,¹ Orionalda de Fatima Lisboa Fernandes,¹ Lucia Kioko Hasimoto e Souza,¹ Xisto Sena Passos¹ e Maria do Rosário Rodrigues Silva¹

RESUMO

Cinquenta e seis isolados de *Candida albicans* obtidos de mucosa vaginal de mulheres com (n = 30) e sem (n = 26) sintomatologia de candidíase foram identificados pela produção de tubo germinativo em soro bovino fetal e de clamidoconídios em ágar farinha de milho através da assimilação e fermentação de carboidratos. Esses isolados foram submetidos à morfotipagem (características morfológicas da colônia) e testados quanto à produção de proteinase. O morfotipo com código 5.340 (franjas contínuas, de 3 a 5 mm de comprimento, de textura e superfície lisas) foi o mais comumente observado nos dois grupos de mulheres estudadas. Foi verificada, entretanto, a presença de franjas descontínuas, considerada por representar um fator de virulência, em 8 (26,6%) isolados de *C. albicans* obtidos de mulheres com sintomas de candidíase vaginal e em apenas 1 (3,8%) dentre os provenientes de mulheres assintomáticas. Esse resultado sugere que as características do morfotipo podem servir como indicador de risco para candidíase. Com relação à atividade enzimática dos isolados, 96,4% das 56 amostras apresentaram produção de proteinase. Os valores de proteinase obtidos neste trabalho não indicaram correlação entre a presença dessa enzima e a capacidade de produzir infecção.

DESCRITORES: *Candida albicans*. Virulência. Morfotipagem. Proteinase.

INTRODUÇÃO

A candidíase é uma infecção fúngica primária ou secundária que envolve espécies do gênero *Candida*, sendo *C. albicans* o agente etiológico mais comum. No homem em condições normais, *C. albicans* faz parte da

1. Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

Endereço para correspondência: Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes Rua Delenda Rezende de Melo, esq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO. E-mail: orionlisboa@ig.com.br

Recebido para publicação em 6/6/2003. Revisto em 27/2/2004. Aceito em 8/3/2004.

microbiota (15, 19). A candidíase vaginal é considerada um problema de saúde pública por afetar um número elevado de mulheres em todo o mundo. Aproximadamente de 10% a 55% das mulheres em idade reprodutiva apresentam colonização de *Candida* na vagina, sítio que pode permanecer por longo período sem que se manifeste a sintomatologia da doença, sendo necessária a participação de vários fatores inerentes ao microrganismo e ao hospedeiro para transformar a levedura colonizadora em agente patogênico (13, 22).

Entre os fatores inerentes ao microrganismo, destacam-se a aderência a células do hospedeiro, a produção e secreção de enzimas hidrolíticas, proteinases e fosfolipases, bem como a transição morfológica de levedura a filamento, determinantes importantes na patogenicidade de *C. albicans* (4, 5, 11, 16). A atividade de proteinase exibida por *C. albicans* tem sido considerada um dos fatores de virulência de maior gravidade por facilitar a invasão dos tecidos hospedeiros pelas células fúngicas, e conseqüentemente a implantação e evolução da doença (1, 6, 10, 20).

Nos últimos anos muitos trabalhos têm sido realizados visando caracterizar e individualizar as leveduras do gênero *Candida*. Em virtude da necessidade de informações sobre a transmissão e a recorrência desse agente, metodologias de tipagem também vêm sendo empregadas para avaliar o comportamento não somente da espécie, mas também de subpopulações da espécie (3, 12, 21). A formação de diferentes texturas das franjas produzidas nas bordas das colônias e a topografia da superfície dessas colônias representam um fenômeno da variação morfológica expressa por diferentes isolados de *C. albicans* permitindo a sua distinção (2, 9, 17).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar *C. albicans* obtidas de processos infecciosos e de mucosa vaginal hígida, através de morfotipagem e produção de proteinase.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 56 isolados de *Candida*, sendo 30 obtidos da mucosa vaginal de pacientes com candidíase e 26 de mulheres carreadoras do fungo. Todos os isolados foram identificados através da produção de tubo germinativo em soro bovino fetal e de clamidoconídios em ágar farinha de milho através de provas de assimilação e fermentação de carboidratos (8).

Morfotipagem

A suspensão de leveduras obtida de colônias de *C. albicans* crescidas em ágar sabouraud dextrose a 25°C por 48 horas foi padronizada na escala 3 de MacFarland. Semeou-se a suspensão em estrias de aproximadamente 5 mm de

largura por 25 mm de comprimento na superfície de placas contendo ágar extrato de malte incubadas a 25°C por 10 dias.

Após esse período, foram avaliados os aspectos macromorfológicos das colônias, como a presença de franjas e as características da sua superfície, aplicando-se a codificação de quatro dígitos de acordo com o modelo de tipificação aplicado por Hunter et al. (1989).

Pesquisa de proteinase

Para a detecção da produção de proteinase, utilizou-se o procedimento descrito por Rùchel et al. (1982) (18), que emprega a albumina. As placas contendo os inóculos semeados em pontos equidistantes foram incubadas a 37°C durante quatro dias. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo ao redor da colônia da levedura.

A atividade enzimática (PZ) foi determinada de acordo com a técnica de Price et al. (1982) (14), através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp). Os resultados foram interpretados da seguinte forma:

PZ = 1,0 = ausência de atividade enzimática;

PZ \geq 0,64 < 1,0 = atividade enzimática positiva;

PZ < 0,64 = atividade enzimática fortemente positiva.

RESULTADOS

A morfotipagem dos isolados de *C. albicans* obtidos da mucosa vaginal de pacientes com candidíase permitiu a identificação de 13 morfotipos diferentes, com o predomínio do morfotipo 5.340 (franjas contínuas, de 3 a 5 mm de comprimento, de textura e superfície lisas), observado em 30% (9/30) dos isolados. Entre as 26 amostras de *C. albicans* isoladas de mulheres sem candidíase, 6 morfotipos foram identificados, com predominância também do morfotipo 5.340 em um percentual de 53,8% (14/26) dos isolados. Os morfotipos de *C. albicans* obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 1.

Todos os isolados de *C. albicans* observados na mucosa vaginal foram produtores de proteinase em diferentes graus. Naqueles obtidos de mulheres com candidíase, os valores de PE variaram de 0,31 a 0,8. Já as leveduras obtidas de mucosa vaginal de mulheres sem candidíase apresentaram atividade de proteinase com valores de PZ variando de 0,35 a 1,0. A interpretação da atividade proteolítica dos isolados de *C. albicans* com base nos valores de PZ encontra-se na Tabela 2, onde se observa que, em ambos os grupos, predominavam amostras com atividade proteolítica fortemente positiva.

Tabela 1. Morfotipos de 56 isolados de *C. albicans* obtidos da mucosa vaginal de mulheres com e sem candidíase

Morfotipos	Com candidíase		Sem candidíase	
	nº	%	nº	%
5.340	09	30,0	14	53,8
5.540	03	10,0	-	-
5.525	01	3,30	-	-
1.325	01	3,30	-	-
5.325	01	3,30	-	-
5.345	01	3,30	01	3,8
1.521	01	3,30	-	-
1.320	01	3,30	-	-
5.240	05	16,6	08	30,8
1.224	01	3,30	-	-
5.341	02	6,70	-	-
1.340	03	10,0	01	3,8
1.241	01	3,30	-	-
5.525	-	-	01	3,8
5.225	-	-	01	3,8

Tabela 2. Atividade proteolítica de isolados de *C. albicans* obtidos de mucosa vaginal de mulheres com e sem candidíase

Proteinase	Com candidíase		Sem candidíase	
	Nº	%	Nº	%
Positiva	13	43,3	9	34,6
Fortemente positiva	17	56,7	17	65,4
Ausente				
Total	30	100	26	100

DISCUSSÃO

A presença do morfotipo 5.340 em porcentagem significativa das amostras de *C. albicans*, independente de sua origem (microbiota normal ou agente de infecção), mostrou que não foi possível, através da metodologia usada, distinguir os isolados entre causadores de infecção ou não. Candido et al. (1998) observaram a predominância desse mesmo morfotipo em *C. albicans* isoladas de próteses dentárias e saliva, o que sugere ser ele um componente da microbiota humana normal.

A técnica de morfotipagem, além de utilizada para estudos epidemiológicos como possível marcador fenotípico, pode ser usada também como determinante de virulência, devido à presença de franjas descontínuas caracterizada pelo primeiro dígito (n^{os} 1, 2 e 3) do sistema de tipagem (3, 7). Neste trabalho, dentre os isolados de pacientes com candidíase da mucosa vaginal, oito (26,6%) tinham como primeiro dígito o morfotipo que contém o número 1 (franjas descontínuas em 20% da margem), e somente um (3,8%) foi detectado em amostras de mulheres sem candidíase. Esse dado sugere uma

possível associação positiva entre a presença de franjas descontínuas e maior virulência de amostras causadoras de infecção.

A atividade da proteinase exibida por *C. albicans* como fator de virulência, fato citado por diferentes pesquisadores, não foi observada neste estudo. *C. albicans* isoladas de mucosa vaginal assintomática apresentaram percentual de atividade proteolítica semelhante àquele observado em isolados de pacientes com lesões de mucosa vaginal. Esses resultados indicam que outros fatores, além da proteinase, provavelmente interferiram na patogenicidade do fungo.

Os resultados obtidos permitiram concluir que, além dos dois métodos empregados, outras técnicas devem ser utilizadas concomitantemente, para que haja uma adequada caracterização do isolado.

ABSTRACT

Candida albicans isolated from vaginal secretion: morphotype and proteinase production

Fifty six strains of *Candida albicans* were isolated from women with and without clinical symptoms of vaginal candidiasis. The *C. albicans* isolated from vaginal mucosa were identified by production of germ-tube in fetal calf serum, of chlamidospores on corn meal agar and by assimilation of carbon sources. These isolates were submitted to morphotyping (morphological characteristics of the colony) and tested to proteinase production. Morphotype 5340 was the most frequently observed in both groups, but a discontinuous fringe, considered to be a probable virulence factor, was observed in 8 (26.6%) of the *C. albicans* isolated from women with symptoms of candidiasis. Morphotyping may serve as a risk indicator for candidiasis. In relation to enzyme production, 96.4% of the 56 isolates presented proteinase activity. The results observed did not support positive correlation of proteinase as a virulence factor.

KEYWORDS: *Candida albicans*. Virulence. Morphotyping. Proteinases.

REFERÊNCIAS

1. Borg M, Rùchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* sp during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 53:626-631, 1988.
2. Candido RC, Azevedo RVP, Ito IY, Fischman O, Zaror L. *Candida albicans* morphotypes from oral cavity in several families. *Bol Micol* 13:17-21, 1998.
3. Candido RC, Toloi MRT, Franceschini AS, Garcia FR, Zaros L. Fosfolipasa, proteinasa y morfotipos de *Candida albicans* aislada de vagina y ano. *Rev Chil Cs Med Biol* 8: 25-29, 1998.
4. Chaffin WL, Ribot, JLL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Reviews* 62:130-180, 1998.

5. Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* 279:1355-1358, 1998.
6. Hube B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15: 65-68, 1998.
7. Hunter PR, Fraser CAM, Mackenzie DWR. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *J Med Microbiol* 28:85-91, 1989.
8. Kurtzman CO, Fell JW. *The yeasts: a taxonomic study*. New York, 1055, pp, 1998.
9. Maffei CM, Paula CR, Mazzocato TS, Franceschini S. Phenotype and genotype of *C. albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis. *Mycopathologia* 137: 87-94, 1997.
10. Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, Auler ME, Marques SAV, Pires MFC, Gambale W, Paula CR. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brasil. *Mycopathologia* 154:63-69, 2001.
11. Mendes-Giannini MJS, Ricci TA, Hanna AS, Salina MA. Fatores envolvidos na patogênese fúngica. *Rev Ciênc Farm São Paulo* 18: 207-229, 1997.
12. Merz WG. *Candida albicans* strain delineation. *J Clin Microbiol* 3:321-334, 1990.
13. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 31:S2-S5, 1994.
14. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:7-14, 1982.
15. Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, Ribot JLL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 18:163-170, 2001.
16. Ray TL, Payne CD. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role of *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* 56:1942-1947, 1988.
17. Ribeiro EL, Silva MRR, Fernandes OFL, Silva SC, Soares AJ. Características fenotípicas de cepas de *Candida* isoladas de pacientes com candidíase vaginal. *Rev Patol Trop* 27:35-42, 1998.
18. Röchel R, Tegelle R, Trost MA. Comparison of secretory proteinase from different strains of *C. albicans*. *Sabouraudia* 20:233-244, 1982.
19. Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol* 17:73-81, 2000.
20. Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* 114:712-717, 2000.
21. Silva MRR, Fernandes OFL, Costa MR, Costa TR, Gambale W, Paula CR. Biotype of *Candida albicans* isolates from AIDS patients. *Rev Patol Trop* 31:195-202, 2002.
22. Sobel JD. Genital candidiasis. In Bodey GP, ed. *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. USA: Raven Press, 225-227, 1993.