

# CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E PERFIL DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* OBTIDAS EM AULAS PRÁTICAS

Tertuliano Alves PEREIRA NETO<sup>1\*</sup>

Marcelo Santos da SILVA<sup>2</sup>

Raquel Maria Lima LEMES<sup>3</sup>

<sup>1 e 2</sup>Graduando em Biomedicina - Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

<sup>2</sup>Doutora. Professora de Bacteriologia Clínica e Micologia Clínica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

\* Autor correspondente: tertuliano1@yahoo.com.br

**Recebido em: 29/10/2013 - Aprovado em: 22/12/2013 - Disponibilizado em: 15/01/2014**

**RESUMO:** A colonização com posterior infecção por leveduras depende dos fatores associados à virulência que o microrganismo produz, como a produção de enzimas extracelulares e a formação de *slime*. Dessa forma, objetivou-se nesse estudo investigar a produção de exoenzimas (fosfolipase e proteinase) e *slime*, seguida da codificação das amostras de acordo com esses fatores, e identificação pelo meio cromogênico CHROMagar™ *Candida*, 22 leveduras do gênero *Candida* obtidas de aulas práticas de Micologia Clínica, armazenadas no Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Clínica - UNIFAL-MG, sendo 4 amostras de ambiente, 10 de unha, 1 de mucosa oral e 7 de origem desconhecida. Para fosfolipase e proteinase foi determinado o Pz (razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo somado ao diâmetro da colônia), que permitiu classificar através de seu valor as amostras que apresentaram atividade de uma ou ambas as enzimas, sendo que 13 (59,1%) tiveram atividade moderada de proteinase e 16 (72,2%) forte atividade de fosfolipase. A produção de *slime* foi determinada em leitor de ELISA com filtro de 570 nm e foi positiva em 5 (22,7%) amostras. O CHROMagar™ *Candida* identificou 14 (63,6%) amostras, sendo 6 (27,2%) *Candida parapsilosis* e 8 (36,4%) *Candida glabrata*. Por fim, a codificação das amostras revelou 9 grupos de cepas e permitiu a observação da produção dos fatores associados a virulência tanto em amostras obtidas de ambiente quanto de colonização, o que reforça as formas de transmissão dessas leveduras.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Candida*. Exoenzimas. *Slime*. Colonização. Virulência.

**ABSTRACT:** The colonization and subsequent yeast infection depends on the associated virulence factors that the organism produces, as the production of extracellular enzymes and the formation of slime. Therefore, this study aimed to investigate the production of exoenzymes (phospholipase and proteinase) and slime, then the encoding of samples according to these factors, and identification by chromogenic medium CHROMagar™ *Candida*, 22 *Candida* species obtained from practical lessons of Clinical Mycology, stored in the Bank of Microorganisms of the Clinical Microbiology Laboratory - UNIFAL-MG, which were 4 environmental samples, 10 nail, 1 oral mucosa and 7 of unknown origin. To phospholipase and proteinase was determined the Pz (ratio between the diameter of the colony and the diameter of the halo plus the diameter of the colony), that allowed to sort through its value the samples that showed activity of one or both enzymes, which 13 (59.1%) had moderate proteinase activity and 16 (72.2%) had strong phospholipase activity. The slime production was determined in an ELISA reader with 570 nm filter and was positive in 5 (22.7%) samples. The CHROMagar™ *Candida* identified 14 (63.6%) samples, which 6 (27.2%) were *Candida parapsilosis* and 8 (36.4%) were *Candida glabrata*. Finally, the encoding of the samples revealed 9 groups of strains and allowed the observation of the production of associated virulence factors both in samples obtained from the environment as colonization, which reinforces the modes of transmission of these yeasts.

**KEYWORDS:** *Candida*. Exoenzymes. Slime. Colonization. Virulence.

## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* têm o meio ambiente (ar, alimentos, fômites, pisos e outras superfícies) como reservatório e também colonizam objetos (cateteres e

próteses) e a pele e mucosas do homem.

Portanto, os indivíduos podem ser colonizados através de contatos entre si e com objetos previamente contaminados (ANAISSIE & BODEY, 1989). A capacidade

que uma levedura apresenta em aderir, infectar e causar doença é definida como potencial de virulência ou patogenicidade (TAMURA *et al*, 2007).

Fatores como capacidade de aderência, produção de toxinas e enzimas, interação com hormônios e metabolização do ferro são os principais fatores associados à virulência que levam pacientes susceptíveis às infecções (GUÉHO, 1994), que segundo Hazen (1995), são aqueles que utilizam antibióticos de largo espectro, equipamentos respiratórios, apresentam ulcerações de pele e defeitos das células imunes, neutropenia e fazem uso de esteróides e quimioterápicos.

As proteinases e fosfolipases são exoenzimas hidrolíticas que constituem um dos principais fatores de virulência das leveduras (CANDIDO, AZEVEDO & KOMESU, 2000). Essas enzimas extracelulares favorecem a invasão tecidual através da destruição das membranas celulares dos hospedeiros. Estudos indicam que a elevação do potencial patogênico das leveduras tem relação entre o aumento na síntese e a atividade destas enzimas extracelulares (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

O biofilme é formado por uma associação de microrganismos, onde, praticamente, não existem em sua forma livre, se agrupando em tecidos, próteses, cateteres e outras superfícies. Essa associação de microrganismos oferece vantagens, como

maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e ação de antimicrobianos (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

De acordo com Kurtzmann & Fell (1998), os métodos convencionais para identificação das espécies de *Candida* são bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, e morfológicos como a capacidade de produzir clamidoconídios em ágar Corn-meal. Entretanto, meios cromógenos de cultura com capacidade de diferenciar as principais espécies de *Candida* de interesse clínico têm sido comercializados e amplamente utilizados (BOUCHARA *et al*, 1996).

Dessa forma objetivou-se nesse estudo investigar os fatores associados à virulência de leveduras obtidas de alunos e/ou meio ambiente em aulas práticas da disciplina de Micologia Clínica da Universidade Federal de Alfenas e codificar as cepas analisadas de acordo com a produção desses fatores investigados..

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

As amostras trabalhadas são pertencentes ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Ao todo foram testadas 22 amostras, e como cepa controle foi utilizada a *Candida*

*albicans* ATCC 10231 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION).

## 2.2. Manutenção das amostras

As amostras foram semeadas em Ágar Sabouraud dextrosado contendo cloranfenicol 500 mg/L para observação de viabilidade e pureza, posteriormente mantidas em microtubos tipo *eppendorff* contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) e armazenadas à 4°C.

## 2.3. Pesquisa de fatores de virulência

### 2.3.1. Fosfolipase

A produção de fosfolipase foi verificada segundo Oliveira *et al.* (1998) usando o método descrito por Price *et al.* (1982). Foi utilizado o ágar Sabouraud dextrose suplementado com 1 M NaCl e 5mM CaCl<sub>2</sub> e 8% de emulsão de gema de ovo-telurito. Colônias de *Candida* spp. previamente (48 horas) semeadas em ágar Sabouraud dextrosado foram suspensas em solução salina, obedecendo ao padrão de turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, duas alíquotas da suspensão, de 20 µL cada, foram inoculadas em pontos equidistantes em placa contendo o meio supracitado (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Após o inóculo as placas foram incubadas a 37°C por 3 a 5 dias. Cada amostra de levedura foi testada em duplicata (KOTHAVADE & PANTHAKI, 2003).

### 2.3.2. Proteinase

A produção de proteinase foi verificada segundo Oliveira *et al.* 1998, usando o método descrito por Ruchel *et al.*, 1982. O ágar proteinase (YCB-BSA) foi composto por, parte A: meio Yeast Carbon Base, 5,85g; albumina bovina fração V, 1,0g; Protovit, 1,25 mL; água destilada, 50 mL (esterilizados por filtração) e parte B: ágar simples, 7,5g e água destilada, 450 mL (esterilizados por autoclavagem) (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Na superfície do meio foram inoculados duas alíquotas de 20 µL cada, da suspensão de leveduras, obedecendo ao padrão de turbidez de 0,5 na escala de McFarland, em pontos equidistantes. Logo após as placas foram incubadas a 37°C por sete dias. Todas as amostras foram testadas em duplicata (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

#### 2.3.2.1. Coloração com solução de azul de cresil brilhante

Após sete dias de incubação, o diâmetro das colônias foi medido antes do uso do corante e o diâmetro da zona clara (proteinase) ao redor das colônias foi mensurado após a coloração. As placas foram coradas com azul brilhante a 0,5% (preparado com 10% [v/v] de ácido acético e 45% [v/v] de etanol) por 20 minutos a temperatura ambiente e descoradas três vezes com solução descorante (10% [v/v] de ácido acético e 45% [v/v] de etanol) por 20 minutos a 37°C e uma

vez com água por 20 minutos a 37°C (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

### 2.3.3. Leitura e interpretação dos testes de fosfolipase e proteinase

A atividade de fosfolipase foi determinada pelo raio do diâmetro da zona de precipitação ao redor das colônias e a de proteinase pela relação do diâmetro da zona clara com o diâmetro da colônia. Para a observação dos halos esperou-se a completa secagem das placas realizando a leitura através de lupa utilizando auxílio de um paquímetro para aferição dos halos (KOTHAVADE & PANTHAKI *et al.*, 2003). Foram medidas as atividades enzimáticas (Pz) através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo somado ao diâmetro da colônia. Quanto menor o Pz, maior a atividade enzimática. Os valores adotados foram:  $Pz = 1$  (ausência de atividade enzimática);  $0,64 \leq Pz < 1$  (atividade enzimática moderada);  $Pz \leq 0,63$  (forte atividade enzimática) (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

### 2.4. Slime

As amostras suspensas em salina foram lavadas com tampão PBS (phosphate buffered saline) e posteriormente ressuspensas em caldo RPMI-1640 em uma concentração de 105 UFC. Em seguida foram inoculadas em microplaca de 96 poços, juntamente com o controle negativo (RPMI-

1640), todas em duplicata. A microplaca foi incubada a 37°C por 48 horas. Para a realização da leitura deste teste utilizou-se a metodologia de WAKIMOTO *et al.* (2004) modificada. Após o tempo de incubação da microplaca, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com água destilada para remoção de células não aderidas. Solução de cristal violeta a 0,5 % foi adicionada aos poços por 20 minutos. As placas foram lavadas com água destilada e adicionou-se 200 microlitros de álcool a 96°GL em cada poço. A formação de biofilme foi avaliada em um leitor de ELISA e considerada positiva quando a densidade óptica a 570 nm fosse maior ou igual a 0,2.

### 2.5. Identificação pelo meio de CHROMAgar™ Candida

O meio foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante e as placas mantidas sob refrigeração até o momento do uso. A inoculação das amostras de leveduras na placa foi aleatória, utilizando apenas os números do Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Clínica de modo que não influenciasse na identificação cromogênica. Após a semeadura com auxílio de alça de níquel cromo, as placas foram incubadas a 35°C e a leitura realizada em até três (3) dias. Foram observadas a morfologia e cores das colônias crescidas nas placas. Segundo o fabricante, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram identificadas pela

produção de colônias de cores verde, azul e rosa, respectivamente (MURRAY *et al.*, 2005).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

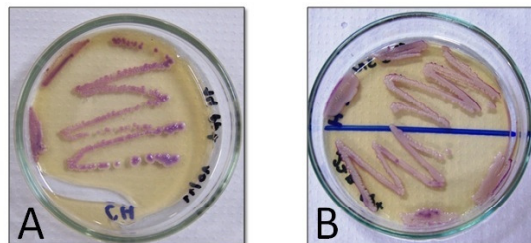
Foram analisadas 10 amostras de unha, 4 de ambiente, 1 de mucosa oral e 7 de origem desconhecida. Dentre as 22 amostras, o CHROMAgar™ *Candida* identificou apenas 14 (63,6%) divergindo do resultado obtido por Col, Savi & Onofre (2009) que identificaram 91,49% de suas amostras. Portanto, neste estudo 8 (36,4%) amostras não foram identificadas até espécie. A produção de pigmento apresentada pelas cepas em estudo foram rosa claro (*Candida* do complexo “*psilosis*”), púrpura (*C. glabrata*) e creme (*Candida* spp.).

Das amostras analisadas, seis (6) foram identificadas como *Candida* do complexo “*psilosis*” (27,2%) (figura 1A), oito (8) como *C. glabrata* (36,4%) (figura 1B) e oito (8) *Candida* spp. (36,4%). Os dados obtidos neste estudo compatibilizaram com os de Madhavan *et al.*, (2011) cuja sensibilidade de identificação de *C. glabrata* obteve 100%, e divergiu quanto a *Candida* do complexo “*psilosis*”, pois atingiu apenas 86%, e em nosso experimento todas as amostras identificadas como *Candida* do complexo “*psilosis*” foram confirmadas pelo microcultivo em ágar fubá.

Vale ressaltar que o elevado isolamento de *C. glabrata* merece atenção,

visto que esta espécie tem-se mostrado intrinsecamente resistente ao fluconazol (Araújo *et al.*, 2005).

**Figura 1** - Colônias em CHROMAgar™ *Candida*: (A) *C. parasilosis* e (B) *C. glabrata*.



Fonte: próprio autor

Em estudo realizado por Crocco *et al.*, (2004) foram isoladas de unhas, *C. albicans* (46 [78%]), *C. krusei* (9 [15,25%]), *C. tropicalis* (1 [1,67%]) e *Candida* spp. (3 [5,08%]). Estes dados divergem de nosso estudo (Tabela 1) que apresentou o isolamento de *C. glabrata* e *Candida* do complexo “*psilosis*” com quatro (4) amostras cada (40%) e duas (2) *Candida* spp. (20%), sendo esta última, cinco vezes maior que a taxa obtida pelo grupo de Crocco. A literatura relata que leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas nas unhas e que *C. albicans* é a espécie mais comum, e *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Candida* do complexo “*psilosis*” e *C. guilliermondii* são encontradas com menor frequência (Daniel *et al.*, 1998). Tais dados justificam a epidemiologia de Crocco *et al.* (2004), e também o isolamento de *Candida* do complexo “*psilosis*” em nosso estudo, mas não o de *C. glabrata*. No entanto, o isolamento destas espécies obtido neste

experimento, compatibiliza com os dados de Lima *et al.* (2007) que isolaram *Candida* do complexo “*psilosis*” em dez (33.3%) amostras, e *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* em quatro cada (13.3%), *C. pulcherrima* em 2 (6.6%), *C. famata* em 1 (3.3%) e *C. guilliermondii* em 1 (3.3%) em unhas de manipuladores de alimentos e com o grupo de Leite Jr. (2011) no isolamento *Candida* do complexo “*psilosis*” em unhas dos pés de militares.

A levedura isolada de mucosa oral foi identificada como *Candida* do complexo “*psilosis*” (100%), espécie não encontrada no estudo realizado por Menezes *et al.* (2005), em que identificaram *C. albicans* (45%), *C. tropicalis* (31%), *C. guilliermonddi* (17%), *C.*

*glabrata* (4,5%) e *C. stellatoidea* (1,5%) em suas amostras de mucosa oral.

Martins-Diniz *et al.*, (2005) realizaram um estudo investigando 91 amostras de mobiliário hospitalar, das quais 44% foram positivas para presença de leveduras. Observaram o predomínio do gênero *Candida* (70%), seguido pelo gênero *Trichosporon*. Dentre as espécies de *Candida*, *C. guilliermondii* prevaleceu (52%), seguida de *C. lusitaniae* (5,0%), *Candida* do complexo “*psilosis*” (3,0%) e *Candida* spp. (10%). Entretanto, não isolaram nenhuma espécie de *C. glabrata* conforme obtido neste estudo (1 [25%]), e nossos dados no isolamento de *Candida* spp. (3 [75%]) foram mais de sete vezes superior ao encontrado por este grupo.

**Tabela 1** – Distribuição das amostras analisadas de acordo com a espécie e origem

Espécie	Ambiente		Desconhecido		Mucosa oral		Unha		TOTAL
	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%	
<i>C. glabrata</i>	1	25,0	3	42,8	0	0	4	40,0	8
<i>Candida</i> do complexo “ <i>psilosis</i> ”	0	0,0	1	14,4	1	100,0	4	40,0	6
<i>Candida</i> spp.	3	75,0	3	42,8	0	0	2	20,0	8
<b>TOTAL</b>	4	100	7	100	1	100	10	100	22

\*n = número de amostras

Fonte: próprio autor

Obtivemos ainda, de sítio desconhecido, sete *C. glabrata* (42,9%); uma *Candida* do complexo “*psilosis*” (14,2%) e três *Candida* spp. (42,9%).

Com as leituras dos halos obtidos nos testes de proteinase e fosfolipase (figura 2), foram determinados o Pz (em mm) e a produção de *slime* (em transmitância). O menor Pz de proteinase (0,71 mm) foi obtido por uma cepa de *Candida* spp. (isolada de

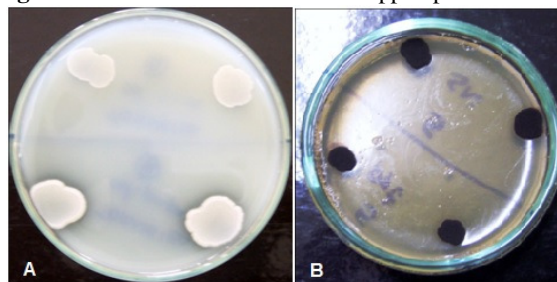
ambiente) e o maior (1,00 mm) por cepas de *C. glabrata* e *Candida* do complexo “*psilosis*”, ambas isoladas de unha. Na Tabela 2 é possível observar a distribuição da taxa de produção de atividade de proteinase de acordo com as espécies analisadas, onde a *Candida* do complexo “*psilosis*” (3 [50%]) foi inferior a obtida por Tavanti *et al* (2010) (66,1%) enquanto a de *C. glabrata* foi superior (8 [62,5%]) a encontrada por Corrêa *et al.*, 2009 em mucosa vaginal (1 [16,7%]).

62,5% (5) das amostras de *Candida* spp. apresentaram atividade de proteinase. Todas as amostras apresentaram atividade moderada desta enzima.

O menor Pz de fosfolipase foi (0,10 mm) produzido por cepas de (*C. glabrata*), *Candida* spp., *Candida* do complexo “*psilosis*”, *C. glabrata*, *Candida* spp., *Candida* spp. e *Candida* do complexo “*psilosis*”, e o maior (1 mm) pelas amostras de números *C. glabrata*, *Candida* spp., *C. glabrata*, *Candida* do complexo “*psilosis*”, *C. glabrata*, e *Candida* spp.. Cinco amostras (83,3%) de *Candida* do complexo “*psilosis*”, cinco (62,5%) *C. glabrata* de e seis (75%) de *Candida* spp. apresentaram atividade de fosfolipase neste estudo. Todas com forte atividade enzimática. Todas as amostras de *Candida* do complexo “*psilosis*” e *C.*

*glabrata* de mucosa vaginal trabalhadas no estudo de Corrêa *et al.* (2009) apresentaram ausência de atividade enzimática para fosfolipase divergindo das amostras deste estudo (Tabela 3). Estes dados foram superiores até os obtidos por *C. albicans* isoladas de mucosa oral (33%), segundo Menezes *et al.*(2005).

**Figura 2** - Colônias de *Candida* spp. apresentando



halo no teste de proteinase (A) e teste de fosfolipase (B).

Fonte: próprio autor

**Tabela 2** – Distribuição da taxa de produção de atividade de proteinase de acordo com as espécies analisadas.

Atividade de proteinase	<i>C. glabrata</i>		<i>C. do complexo “psilosis”</i>		<i>Candida</i> spp.		TOTAL
	n*	%	n*	%	n*	%	
Ausente	3	37,5	3	50,0	3	0	9
Moderada	5	62,5	3	50,0	5	100,0	13
Forte	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>100,0</b>	<b>6</b>	<b>100,0</b>	<b>8</b>	<b>100,0</b>	<b>22</b>

\*n = número de amostras

Fonte: próprio autor

A taxa de ausência de produção de *slime* foi de 77,3% (17) nas amostras analisadas, taxa esta duas vezes maior que o percentual apresentado por Silva *et al.*, (2007) foi de 35,1%. A produção de *slime* por *Candida* do complexo “*psilosis*” foi detectada em apenas uma amostra (1 [16,7%]), índice

extremamente inferior a detectada por Tavanti *et al.* (2010) (64.3%). *Candida glabrata* (3 [37,5%]) e de *Candida* spp. (1 [12,5%]) apresentaram produção de *slime*. Quanto a quantificação da produção de *slime*, Silva *et al.*, (2007) relataram 35,1% fracamente positivas, 8,1% moderadamente positivas e 21,6% fortemente positivas,

enquanto neste estudo obtivemos 25% (2) fracamente positivas, 29,2% (2) moderadamente positivas e 12,5% (1) fortemente positivas, conforme Tabela 4.

A Tabela 5 apresenta a codificação das amostras analisadas de acordo com os fatores de virulência produzidos ou não pelas cepas.

A codificação foi realizada empregando as letras A, F, M do alfabeto e os números 0, 1, 2 e 3, sendo o código composto por três 3 dígitos. A primeira letra é referente à atividade de proteinase, a segunda, à de fosfolipase e o número a seguir, à produção de *slime*. A letra A significa ausência de atividade enzimática, a F, forte atividade e a M, moderada atividade. Os números aplicados à produção de *slime* significam: 0, ausência de produção, 1, baixa produção, 2, moderada e 3, alta produção.

A codificação revelou nove (9) grupos. O grupo com maior número de amostras foi o MF0 com 8 cepas (36,5%), seguido de AF0 com 5 (22,8%) e AA0 com 3 (13,7%). Os grupos AF1 (origem desconhecida, *Candida* spp.), MA0 (unha, *Candida* spp.), MA2 (unha, *C. glabrata*), MA3 (unha, *C. glabrata*), MF1 (ambiente, *C. glabrata*) e MF2 (mucosa oral, *Candida* do complexo “*psilosis*”) apresentaram apenas uma cepa cada (4,5%).

Duas cepas que compõem o grupo MF0 são origem ambiental e duas são de origem desconhecida, sendo todas *Candida* spp.; 4 cepas foram obtidas de unha, sendo duas identificadas como *C. glabrata* e outras duas como *C. parapsilosis*.

**Tabela 3** – Distribuição da taxa de produção de atividade de fosfolipase de acordo com as espécies analisadas.

Atividade de fosfolipase	<i>C. glabrata</i>		<i>C. do complexo “psilosis”</i>		<i>Candida</i> spp.		TOTAL
	n*	%	n*	%	n*	%	
Ausente	3	37,5	1	16,7	2	25,0	6
Moderada	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
Forte	5	62,5	5	83,3	6	75,0	16
<b>TOTAL</b>	8	100,0	6	100,0	8	100,0	22

\*n = número de amostras

Fonte: próprio autor

**Tabela 4** - Distribuição das amostras analisadas de acordo com a espécie e taxa de produção de *slime*.

Atividade de fosfolipase	<i>C. glabrata</i>		<i>C. do complexo “psilosis”</i>		<i>Candida</i> spp.		TOTAL
	n*	%	n*	%	n*	%	
Ausente	5	62,5	5	83,3	7	87,5	17
Baixa	1	12,5	0	0	1	12,5	2
Moderada	1	12,5	1	16,7	0	0	2
Alta	1	12,5	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	8	100,0	6	100,0	100,0	100,0	22

\*n = número de amostras

Fonte: próprio autor



**Tabela 5** – Distribuição das amostras analisadas de acordo com a codificação obtida através dos fatores de virulência investigados.

Código	Número de amostras n (%)
MF0	8 (36,5)
AF0	5 (22,8)
AA0	3 (13,7)
AF1	1 (4,5)
MA0	1 (4,5)
MA2	1 (4,5)
MA3	1 (4,5)
MF1	1 (4,5)
MF2	1 (4,5)
<b>TOTAL</b>	<b>22 (100)</b>

Fonte: próprio autor

O grupo AF0 foi composto de 3 amostras de origem desconhecida (uma *Candida* do complexo “*psilosis*” e duas *C. glabrata*), e 2 amostras obtidas de unha (*Candida* do complexo “*psilosis*” e *Candida* spp.). O grupo AA0, foi composto por 2 amostras de *C. glabrata* (uma de sítio desconhecido e outra de ambiente) e 1 amostra de *Candida* do complexo “*psilosis*” (isolada de unha), sendo que nesse grupo todas as cepas apresentaram total ausência de virulência.

Portanto, os grupos contendo as cepas que apresentaram a maior produção de fatores de virulência foram os MF1 e MF2, contendo *C. glabrata* e *Candida* do complexo “*psilosis*”, respectivamente. Fidel Jr. *et al.*, (1999) relataram que *C. glabrata* não produziu fatores de virulência em modelos animais, divergindo deste estudo que

codificou uma cepa de ambiente altamente virulenta. De acordo com a literatura, esta espécie apresenta elevada taxa de mortalidade e rapidez da propagação.

#### 4. CONCLUSÕES

A identificação das leveduras através do o ágar CHROMAgar™ *Candida* mostrou-se bastante segura para a espécie *Candida glabrata*, se comparada ao método clássico e com os dados da literatura. A análise dos fatores associados à virulência mostrou que a leitura do teste de atividade das exoenzimas varia entre estudos analisados, além de ocorrer uma variação quantitativa na formação de *slime* pelas amostras empregadas no estudo.

Por fim a codificação das amostras através dos fatores associados à virulência revelou sua produção em amostras obtidas de ambiente e de colonização, o que reforça as formas de transmissão tanto por contato

indireto quanto por contato direto, além de ressaltar unhas como um reservatório importante de leveduras.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAÏSSIE, E, BODEY, G.P. Nosocomial fungal infections. Old problems and new challenges. **Infect Dis Clin North Am.** 3(4):867–882; 1989.

ARAÚJO, C. R. *et al.* Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMAgar™ *Candida*. Goiânia, GO. **Revista de Patologia Tropical.** 34(1): 37-42, 2005.

BOUCHARA, J.P. *et al.* Routine use of CHROMagar™ *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin Microbiol Infect.** 2: 202-208; 1996.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Brasília. v. 33, n. 5, p. 437-442; 2000.

CORRÊA, P. R. *et al.* Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 31(4): 177-81; 2009.

CROCCO, E. I. *et al.* Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An bras Dermatol.** Rio de Janeiro, 9 (6):689-697; 2004.

DANIEL, C. R. I. *et al.* *Candida* infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. **Dermatology.** 37: 904-907; 1998.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology.** 9, p. 327-335; 2001.

COL, A. P.; SAVI, D. C.; ONOFRE, S. B. Identificação das leveduras do gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMAgar® *Candida* obtidas de pacientes com infecção das vias urinárias. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** vol. 41(4): 279-281, 2009.

FIDEL JUNIOR *et al.* *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical microbiology reviews.** v. 12, n. 1, p. 80–96; 1999.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab.** v. 46 n. 3 p. 225-234; 2010.

GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; HOOG, G. S.; DUPONT, B. - *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses.** v. 37, p.3-10; 1994.

HAZEN, K.C.; New and Emerging Yeast Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews.** 8(4), 462-478, 1995.

KOTHAVADE, R. J.; PANTHAKI, M. H. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. **J Med Microbiol.** 1998; 47: 99–102. apud BORST, A.; FLUIT, A. C. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates

- involved in respiratory infections. **J Med Microbiol.** v. 52, p. 971–974, 2003.
- KURTZMANN, C. P.; FELL, J. W. **The yeast: a taxonomic study.** 4 ed. New York, Elsevier; 1998.
- LEITE JÚNIOR, D. P. *et al.* Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. **An Bras Dermatol.** 86(4):675-80; 2011.
- LIMA, K. M. *et al.* Espécies fúngicas isoladas a partir de unhas de manipuladores de alimentos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas,** v. 39(3): 193-196, 2007.
- MADHAVAN, P. *et al.* Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMAgar *Candida*<sup>TM</sup> as a primary identification method for various *Candida* species. **Tropical Biomedicine.** 28(2): 269–274; 2011.
- MARTINS-DINIZ, J. N *et al.* Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Rev Saúde Pública.** 39 (3):398-405; 2005.
- MENEZES, E. A. *et al.* Frequencia e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. **J Bras Patol Med Lab.** v. 41, n. 1, p. 9-13; 2005.
- MURRAY, C. K *et al.* Use of chromogenic medium in the isolation of yeasts from clinical specimens. **J Med Microbiol.** 54, 981–985; 2005.
- OLIVEIRA, E. E. *et al.* Toxinas killer de enzimas por *Candida albicans* isolated isoladas de mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. Bras. de Medicina Tropical.** v. 31, n. 6, p. 523-527, 1998.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia** 20:7-14, 1982.
- RUCHEL, J., TEGELER, R., TROST, M. A.. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia** 20:233-244, 1982.
- SILVA, J. O. *et al.* Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida sp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 40 (3): 354-355, 2007.
- TAMURA, N. K. *et al.* Fatores de virulência de *Candida spp.* isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.
- TAVANTI, A. *et al.* Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu strictu* strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiology.** 10:203; 2010.
- WAKIMOTO, N *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. Trop. Med. Hyg.** 71: 687-690; 2004.