

# Atividade enzimática, produção de *slime* e sensibilidade a antifúngicos de *Candida sp*

Enzymatic activity, *slime* production and antifungal agent sensitivity of *Candida sp*

Jaqueline Otero Silva<sup>1</sup>, Joseane Cristina Ferreira<sup>2</sup>  
e Regina Célia Candido<sup>2</sup>

## RESUMO

A habilidade de *Candida spp* secretar enzimas extracelulares e *slime* tem sido associada como fatores de patogenicidade. Do total de 37 cepas de *Candida sp*, 100% foram produtoras de proteinase, 83,8% fosfolipase, 64,9% *slime* e 100% sensíveis ao fluconazol e itraconazol. Foram encontradas 17 tipagens (enzima/*slime*). Esta metodologia apresentou um bom índice discriminatório ( $D=0,93$ ) podendo ser utilizado na caracterização fenotípica das leveduras.

**Palavras-chaves:** Antifúngicos. *Candida sp*. Fosfolipase. Proteinase. *Slime*.

## ABSTRACT

Ability of *Candida spp* to secrete extracellular enzymes and *slime* has been associated as pathogenicity factors. Out of a total of 37 strains of *Candida sp*, 100% were proteinase producers, 83.8% were phospholipase producers, 64.9% were *slime* producers and 100% were sensitive to fluconazole and itraconazole. Seventeen typings (enzymes/*slime*) were found. This methodology presented a good discrimination rate ( $D = 0.93$ ) and could be used for phenotypic characterization of yeasts.

**Key-words:** Antifungal agents. *Candida sp*. Phospholipase. Proteinase. *Slime*.

Entre os fungos, *Candida sp* é o gênero predominante na microbiota humana sendo, *Candida albicans* a espécie mais frequente.

Em *Candida albicans*, a formação do tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa, a variabilidade fenotípica (switching), a produção de toxinas, a aderência à superfície celular e a produção de enzimas extracelulares, constituem os fatores que contribuem para o desencadeamento da infecção por este patógeno<sup>2</sup>.

Os testes de sensibilidade aos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos gradativamente nos últimos anos, devido ao aparecimento de cepas resistentes *in vivo* e *in vitro*<sup>5</sup>.

O presente estudo tem como objetivo verificar a produção de proteinase, fosfolipase e *slime* de *Candida sp* isoladas de diferentes sítios corpóreos do homem e ainda verificar o perfil de sensibilidade às drogas fluconazol e itraconazol.

**Organismos testados.** Selecionou-se para investigação 37 leveduras sendo, 31 *Candida albicans* e 6 *Candida parapsilosis*

obtidas de amostras biológicas de diferentes sítios anatômicos (fezes, vagina e boca) de 17 pacientes voluntários e atendidos através do Sistema de Saúde Integral da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

**Pesquisa de proteinase e fosfolipase.** O estudo da proteinase foi realizado segundo a metodologia descrita por Ruchel cols<sup>8</sup> e o estudo da fosfolipase, segundo Prince cols<sup>7</sup>, sendo as leituras realizadas após 7 e 5 dias, respectivamente. A presença da atividade da proteinase foi verificada pela formação de um halo transparente e de fosfolipase pela formação de um halo opaco ao redor da colônia. A atividade enzimática de ambas as enzimas foi medida de acordo com a técnica de Prince cols<sup>7</sup> através do valor da zona de precipitação (PZ). Para tanto, as atividades enzimáticas PZ foram medidas dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia somado à zona de precipitação. Os resultados foram apresentados em código sendo o valor 1 quando  $PZ=1,0$  (sem atividade enzimática), valor 2 quando  $0,63 < PZ < 1,0$  (atividade enzimática moderada) e valor 3 quando  $PZ \leq 0,63$  (forte atividade enzimática).

1. Laboratório 1 de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP. 2. Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

**Endereço para correspondência:** Dra Jaqueline Otero Silva. Rua Minas 877, Campos Elíseos, 14085-410 Ribeirão Preto, SP  
Tel: 55 16 3625-5046; Fax 55 16 3635-7994  
e-mail:jaquelineos@ig.com.br

Recebido para publicação em 2/8/2006

Aceito em 19/3/2007

**Produção de *slime*.** Foi realizado o método qualitativo em tubo de acordo com a técnica descrita por Christensen cols<sup>3</sup> e modificada segundo Ozkan cols<sup>6</sup>, 2005<sup>13</sup>. Considerou-se aderência negativa (código=0), fracamente positiva (código=1), moderadamente positiva (código=2) ou fortemente positiva (código =3).

**Tipagem (enzima/*slime*).** Foi codificada com algarismos contendo 3 dígitos. O primeiro representando a fosfolipase, o segundo a proteinase e o terceiro a produção de *slime*. O índice de diversidade (D) da metodologia foi realizada de acordo com Hunter e Gaston<sup>4</sup>.

**Teste de sensibilidade.** As leveduras foram avaliadas quanto à sensibilidade ao fluconazol com concentrações testes variando de 64 a 0.25µg/mL (Pfizer, Sandwich, UK) e itraconazol com concentrações variando de 16 a 0.03µg/mL (Jansen, Reerse, Belgium). O teste foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, segundo documento do *National Committee Clinical Laboratory Standarts* (NCCLS) M27-A2, 2002<sup>5</sup> utilizando como cepa controle *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

A Tabela 1 mostra que 100% das cepas de *Cândida albicans* produziram as enzimas proteinase e fosfolipase sendo que, 68,8% e 32,3% apresentaram forte atividade para as respectivas enzimas. Estes resultados estão dentro dos parâmetros encontrados na literatura<sup>19</sup>.

**Tabela 1 - Tipagem enzima/*slime* de *Candida sp* nos diferentes sítios anatômicos de 17 pacientes.**

Paciente	Tipagem enzima/ <i>slime</i>		
	bucal	fecal	vaginal
1	230	230	-
2	231	230	-
3	230	230	-
4	233	223	-
5	131	-	121
6	331	323	331
7	331	330	-
8	123	122	-
9	231	320	220
10	230	230	-
11	323	220	-
12	221	232	331
13	232	-	331
14	-	233	321
15	-	231	230
16	-	133	133
17	-	221	220

Não foram encontradas cepas de *Candida parapsilosis* produtoras de fosfolipase corroborando com os resultados de Candido cols<sup>1</sup>. No entanto, Shimizu<sup>9</sup> verificou atividade de fosfolipase em *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilhiermondii* e *Candida krusei*.

Quanto à produção de *slime*, 35,1% foram negativas, 35,1% fracamente positivas, 8,1% moderadamente positivas e 21,6% fortemente positivas. Todos os isolados de *Candida parapsilosis* produziram este fator de patogenicidade (Tabela 1). Ozkan cols<sup>13</sup> encontraram em cepas provenientes de sangue, 80,5% de produção de *slime* sendo que 89,4% das *Candida parapsilosis* apresentaram esta atividade

Todas as leveduras foram sensíveis aos antifúngicos fluconazol e itraconazol apresentando concentrações inibitórias mínimas que variaram de 0,125 a 0,5 e de 0,03 a 0,06, respectivamente. Não encontramos correlação entre atividade de *slime* e resistência aos antifúngicos testados corroborando com resultados de Ozkan cols<sup>6</sup>. Yücesoy cols<sup>10</sup> ao investigar a produção de biofilme de várias cepas de *Candida* encontraram diferenças significativas entre atividade biofilme e sensibilidade ao fluconazol.

A Tabela 1 mostra a diversidade fenotípica, representada pelo encontro de 17 diferentes tipagens (enzima/*slime*), sugerindo ocorrer uma facilidade de adaptação das cepas nas diferentes localizações anatômicas. No entanto, 5 pacientes apresentaram cepas com o mesmo perfil (enzima/*slime*) em diferentes localizações. Esta metodologia apresentou um bom índice de diversidade (D=0,93) podendo ser utilizado na caracterização fenotípica das leveduras e, portanto, servir como um marcador epidemiológico de infecções por *Candida*.

## REFERÊNCIAS

1. Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33: 437-442, 2000.
2. Chakrabarti A, Navak N, Talwar P. *In vitro* proteinases production by *Candida* species. Mycopathologia 114:163-168, 1991.
3. Christensen GD, Simpson A, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infection and Immunity 37: 318-326, 1982.
4. Hunter PH, Gaston MA. Numerical index of the discrimination ability of typing systems: na application of Simpson's index of diversity. Journal of Clinical Microbiology 26: 2465-2466, 1998.
5. National Committee Clinical Laboratory Standarts (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS document M27-A2, Wayne, PA, 2002.
6. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanei A, Abbasoglu U, Kustimu S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100: 319-324, 2005.
7. Prince ME, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 20:7-14, 1982
8. Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia 20: 233-244, 1982.
9. Shimizu MT. Fosfolipase em espécies de *Candida*. Revista de Microbiologia 20: 338, 1989.
10. Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 24: 360, 2003.