

CD DE RESUMOS

IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA E I ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA APLICADA



**DE 17/11 A 20/11/2010
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE / RS - BRASIL**

APOIO



PROPG



COMISSÃO ORGANIZADORA

Carolina De Marco Veríssimo

Luciana Senter

Michele Mann

Francielle Bucker

Ismael Pretto Sauter

Éder Moraes Soucedo

Ana Maris Carlesso

Simone Pieniz

Priscila Pauly Ribas

Manuela Bruxel

Raquel Damasceno

Martha Oliveira

Tiane Martin de Moura

PRODUÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE CANDIDA NA SALIVA DE USUÁRIOS DE APARELHO ORTODÔNTICO FIXO

Amanda Gomes Faria^{1,2}; Dariane de Castro Pereira^{1,2}; Igor Oliveira Palagi de Souza^{1,2}; Julyana Pezzi de Oliveira^{1,2}; Rosana Fernanda Fogaça²; Alexandre Meneghello Fuentefria³;

¹Estudante da Faculdade de Farmácia da UFRGS; ²Grupo de Pesquisa em Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRGS; ³Professor do Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, coordenador do Grupo de Pesquisa em Micologia; E-mail: alexmf77@gmail.com

Resumo – Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por causar boa parte de infecções fúngicas no homem, sendo *Candida albicans* a espécie predominante. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras do gênero *Candida*, e a capacidade que estas leveduras têm de produzir biofilme e hemólise. Foram isoladas e identificadas 70 amostras de *Cândida*, e avaliada a capacidade de formar biofilme e hemólise promovida por estas. A espécie predominante foi *C. albicans* (63%), seguida por *C. glabrata* (13%). A espécie que foi maior produtora de biofilme foi *C. glabrata* (56%). Nenhum dos isolados apresentou halo de hemólise. O aumento dos diagnósticos de candidíase em pacientes com algum tipo de prótese oral é decorrente da emergente patogenicidade das cepas das diversas espécies de *Candida*.

Palavras-chave: candidíase oral; biofilme; hemólise.

Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são constituintes da microbiota da mucosa oral, intestinal e vaginal, permanecendo nestes habitats como colonizantes até encontrarem condições apropriadas para se multiplicarem, expressarem fatores de virulência, invadirem a mucosa e causarem infecção. As principais espécies de interesse clínico neste gênero são *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, *C. guilliermondi* e *C. kefyr* (COLOMBO et al. 2006, LEWIS et al. 2009).

Diversos fatores são citados como responsáveis pela ocorrência de candidíase oral, podendo ser relacionado com o indivíduo ou com a própria levedura. A capacidade de aderência dessas leveduras, é um dos fatores associados ao potencial de virulência presente nestas (LYON et al., 2010). Este fator determina a capacidade que esta levedura tem de produzir biofilme (GAPARETTO et al., 2005).

Levando-se em consideração que o aparelho ortodôntico fixo (AOF) muitas vezes causa lesões no paciente e a dificuldade desses pacientes em fazer a correta higienização da cavidade oral, há um aumento considerável no oportunismo das leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral (ATASSI et al., 2010; Salerno et al., 2010). Baseado neste contexto, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras oriundas de indivíduos usuários e não-usuários de AOF, assim como avaliar a capacidade destes microrganismos em formar biofilme e a capacidade hemolítica dos mesmos.

Materiais e Métodos

Isolamento e Identificação: A saliva de pacientes sintomáticos e assintomáticos foi coletada com um swab, que foi posteriormente incubado por 24h em caldo sabouraud com

cloranfenicol, seguido de plaqueamento em ágar sabouraud, também acrescido de cloranfenicol, e incubado a 32°C durante 48 h. Com o crescimento do fungo leveduriforme, confirmado pelo exame direto, foi feita semeadura em meio cromogênico (CHROMagar® Candida), o qual foi incubado a 32°C por 72 h, onde identificou-se *C. albicans* como colônias verdes, *C. krusei* como colônias rosas, *C. tropicalis* como colônias azuis, *C. glabrata* como colônias lilás e colônias brancas como outras espécies de *Candida* (PFALLER 1996).

Formação de Biofilme: Para verificar a produção de biofilme foi feita a avaliação em triplicata pela técnica proposta por Stepanovic (2000) modificada em microplacas utilizando *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo. A formação de biofilme foi quantificada em espectrofotômetro a 450nm e classificado como forte, médio, fraco ou não formador de biofilme, de acordo com os pontos de corte validados pela técnica.

Capacidade Hemolítica: Para determinação da produção de hemólise, fez-se a partir de uma colônia pura, a semeadura em uma placa de ágar sangue de acordo com a técnica proposta por França (2010). A capacidade hemolítica foi observada a partir da formação de um halo de hemólise em torno do crescimento da colônia fúngica.

Resultados e Discussão

Das 70 amostras de *Candida* testadas até o momento, 63% são *C. albicans*, 13% *C. glabrata*, 4,3% *C. tropicalis*, 8,7% *C. krusei* e 11% são *Candida* não-*albicans*. A formação de biofilme foi observada em graus variáveis entre os isolados, sendo 30% dos isolados fraco produtor de biofilme; 13% médio produtor de biofilme; 4% forte produtor de biofilme e 53% dos isolados foi não produtor de biofilme. *C. glabrata* foi a espécie que apresentou maior formação de biofilme (56%) e *C. albicans* foi a que apresentou menor formação de biofilme, sendo 66% não formador de biofilme. No teste de hemólise, realizado em ágar sangue para observação da presença de halos de hemólise indicativos de potencial capacidade de infecções na corrente sanguínea, não foi observada a produção de hemólise em nenhum dos isolados.

Tabela 1. Percentagens da capacidade de formação de biofilme das leveduras isoladas da mucosa oral de portadores de AOF.

Faixa de OD	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. não-albicans</i>	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
> 0,280	1	1,4	1	1,4						
0,170 - 0,279	6	8,5			1	1,4			2	3
0,070 - 0,170	12	17	5	7	1	1,4	1	1,4	2	3
< 0,070	28	40	3	4,4	4	5,7	1	1,4	2	3
Total	47		9		6		2		6	

Formação de biofilme: Forte:> 0,280; Médio 0,170-0,279; Fraco 0,070-0,170; Não formador < 0,070

O uso de artefatos protéticos, como próteses e aparelhos ortodônticos, favorecem a colonização de microrganismos oportunistas, em potencial as espécies virulentas *Candida*. O aumento dos diagnósticos de candidíase em pacientes com algum tipo de prótese oral é decorrente da emergente patogenicidade das cepas das diversas espécies de *Candida* (ATASSI et al., 2010).

C. albicans é a espécie mais frequente segundo Schelenz et al. (2010), ocorrendo em 74% dos indivíduos estudados. Os dados deste trabalho confirmam a prevalência de *C. albicans*, correspondendo a 63% dos isolados. A segunda mais isolada foi *C. glabrata* com 13% dos isolados, concordando também com os resultados encontrados por Schelenz et al. (2010) e Zomorodian et al. (2010). Foram também isoladas *C. tropicalis*, *C. krusei*, porém em menor quantidade. Onze por cento das leveduras isoladas neste trabalho foram identificadas como *Candida* não-*albicans*.

Quanto à aderência 47% destes isolados foram capazes de produzir biofilme, concordando com os dados de Ciok et al. (2009). *C. glabrata* foi a espécie que mais produziu biofilme com (56%), demonstrando que os biofilmes produzidos por esta espécie possuem maior quantidade de proteínas de resposta ao estresse podendo contribuir para uma maior resistência aos antifúngicos (SENEVIRATNE et al., 2010). Estes dados sugerem que a maioria das leveduras do gênero *Candida* estudadas não tem a capacidade de aderirem às células do hospedeiro, não ocasionando o quadro de candidíase oral, com isto estas leveduras não apresentam resistência aos tratamentos com antifúngicos convencionais (RUKAYADI et al., 2010).

Do total de 70 isolados de *Candida* sp. analisados, 100% não promoveram hemólise, discordando dos resultados achados por França et al. (2010). Este dado mostra que as leveduras estudadas não têm a capacidade de secretar fatores hemolíticos com o objetivo de obter hemoglobina como fonte de ferro para sua sobrevivência, com isto não têm a capacidade de causar candidíase em outras partes do corpo do indivíduo (FRANÇA et al., 2010; NEGRI et al., 2010).

Conclusões

Das 70 cepas, 63% são *C. albicans*, 13% *C. glabrata*, 4,3% *C. tropicalis*, 8,7% *C. Krusei* e 11% são *Candida* não-*albicans*. 30% dos isolados é fraco produtor de biofilme; 13% médio produtor de biofilme; 4% forte produtor de biofilme e 53% dos isolados foi não produtor de biofilme, tendo *C. glabrata* como maior produtora de biofilme. Nenhum dos isolados foi capaz de utilizar hemácia como fonte de ferro para sua sobrevivência.

Apoio

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PIBIC/UFRGS.

Referências

- ATASSI, F. et al. Oral Hygiene Status among Orthodontic Patients. J Contemp Dent Pract. 2010 Jul 1;11(4):E025-32.
- AZEVEDO, R.V. et al. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. Rev. Microbiol., São Paulo, v. 30, n. 4, p. 335-341, 1999.
- CIOK, P. E. et al. The evaluation of relationship between the prigin of *Candida* sp. and the ability of biofilm formation on surface of different biomaterials. Med Dosw Mikrobiol. 2009;61(3):273-80.
- COLOMBO, A.L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. Journal of Clinical Microbiology 44, 2816-2823, 2006.
- FRANÇA, E.J.G. et al. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. Ver. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 43(3):318-321, mai-jun, 2010.
- GASPARETTO, A. et al. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. Acta Sci. Health Sci. Maringá, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005
- LEWIS, R.E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. 2009. Current Medical Research Opinion 25, 1732-40.
- LYON, J.P. et al. Inhibition of Virulence Factors of *Candida* spp. by Different Surfactants. Mycopathologia.2010
- NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. Mycopathologia. 2010 Mar;169(3):175-82

PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases* 22 (suppl 2): S89-S94, 1996.

RUKAYADI, Y. et al. In vitro activity of xanthorrhizol against *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* biofilms. *Med Mycol.* 2010

SALERNO, C. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Aug 15.

SCHELENZ, S. et al., Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J Oral Pathol Med.* 2010

SENEVIRATNE, C.J. et al. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics.* 2010 Apr;10(7):1444-54.

STEPANOVIC, S. et al. A **modified** microtiter-plate test for quantification of staphylococcal **biofilm formation**. *Journal of Microbiological Methods.* 2000

TAMURA, N.K. et al. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 156, n. 4, p. 269-272, 2003.

ZOMORODIAN, K. et al. *Assessment of Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2010