

SENSIBILIDADE ÀS TOXINAS *KILLER* DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES COM CANDIDOSE E DE INDIVÍDUOS NORMAIS

Antonio Olavo Cardoso JORGE ***
Juliana Campos JUNQUEIRA*
Márcia Marcelino ROMERO*
Clélia Aparecida de Paiva MARTINS*

- **RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e classificar pela sensibilidade as toxinas *killer*, espécies de *Candida* da cavidade bucal de indivíduos com saúde e de pacientes com candidose. Os dados foram submetidos a análise estatística, utilizando-se o teste exato de Fisher para comparar diferenças significantes no número de biotipos *killer* entre os dois grupos de indivíduos estudados. A presença de leveduras foi observada na saliva de 260 indivíduos com saúde bucal, dos quais 100 amostras (38,46%) foram positivas para *Candida* ssp, sendo 97% *Candida albicans*. A partir de amostras de 36 pacientes com candidose, foram isoladas 7 espécies de *Candida*. O emprego do sistema *killer* possibilitou diferenciar 14 biotipos de *Candida* nos pacientes com candidose e 4 biotipos em indivíduos sem lesões na cavidade bucal.
- **PALAVRAS-CHAVE:** *Candida*; *Candida albicans*; candidose, toxinas *killer*.

Introdução

* Departamento de Biotecnologia e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

** Departamento de Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade de Taubaté – Unitaú – 12020-040 – Taubaté – SP.

Espécies de *Candida* ocorrem comumente na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente.²⁰ Essas leveduras vivem geralmente em condições saprófitas, estabelecendo um estado de equilíbrio ecológico na microbiota bucal.^{1,3,8} Modificações desse equilíbrio favorecem o desenvolvimento da ação patogênica por fungos do gênero *Candida*, produzindo candidose.^{7,16}

Como o gênero *Candida* é de grande interesse odontológico, muitos métodos que permitem a caracterização dessas leveduras, além do nível de espécie, estão sendo desenvolvidos. Esses métodos incluem aqueles baseados em características fenotípicas e genotípicas das cepas. Entre os fenotípicos estão a biotipagem, morfotipagem, tipagem por toxinas *killer*, resistotipagem, e como genotípicos, a cariotipagem e o uso de enzimas de restrição.^{9,13,19}

As toxinas *killer* são, também, denominadas fator *killer*, proteínas *killer* ou outros nomes menos usados como zimocina e micocina.² Essas toxinas são substâncias protéicas secretadas por algumas cepas de leveduras que têm efeitos letais sobre outros fungos e uma variedade de bactérias.¹⁷ Leveduras *killer* são imunes à ação das suas próprias toxinas, mas podem ser sensíveis às proteínas *killer* produzidas por outros organismos.^{14,15}

Polonelli et al.,¹³ em 1983, selecionaram, entre 54 leveduras, 9 pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*, produtoras de toxinas *killer*. Eles preconizaram um método de biotipagem de espécies de *Candida*, denominado sistema *killer*, codificado em três dígitos, baseado na sensibilidade de uma cepa testada, ante as toxinas produzidas.

O sistema *killer* pode ser empregado como marcador epidemiológico de leveduras, para verificar a origem e a disseminação de determinada amostra de *Candida* na população. Assim o objetivo do presente trabalho foi isolar espécies de *Candida* na cavidade bucal de pacientes com candidose e de indivíduos com saúde bucal e verificar a sensibilidade dessas espécies às toxinas *killer*.

Material e método

Foram selecionados para estudo dois grupos de indivíduos. No primeiro, foram incluídos 260 alunos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP e do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté – Unitau. Nenhum deles era portador de prótese ou aparelho ortodôntico, assim como de doença periodontal e lesões de cárie ativa, clínica-

mente evidentes. Para o isolamento das cepas, foram coletados 2 mL de saliva sem estimulação, da qual alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco), acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol (Quemeticina Succinato – Carlo Erba) por mL.

O segundo grupo foi formado por 36 pacientes atendidos na Clínica de Prótese, total do Curso de Odontologia da Universidade de Taubaté. Todos eram usuários de prótese total superior e inferior e apresentavam lesões compatíveis com candidose eritematosa crônica. As amostras foram coletadas com “swab” embebido em solução fisiológica esterilizada e foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol.

A identificação das leveduras isoladas foi realizada segundo Sand-vén¹⁸ por meio das seguintes provas: formação de tubo germinativo em soro estéril de coelho, produção de clamidósporos e pseudo-hifas em ágar fubá Twe- en 80, fermentação e assimilação de açúcares.

O estudo do fenômeno *killer* foi desenvolvido conforme metodologia de Polonelli et al.,¹³ utilizando-se as cepas produtoras enumeradas na Tabela 1. Foram considerados sensíveis os cultivos que produziram halo incolor ao redor da cepa padrão, e resistentes os que apresentaram crescimento em torno desta.

Tabela 1 – Cepas padrão utilizadas no teste de sensibilidade às toxinas *killer*

Amostra do fungo	Procedência	Número	k
<i>Hansenula</i>	Stumm	1.034	k1
<i>Pichia</i> sp	Stumm	1.034	k2
<i>Hansenula anomala</i>	Um Milano	–	k3
<i>Hansenula anomala</i>	CBS	5.759	k4
<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn UN	866	k5
<i>Hansenula californica</i>	Ahearn WC	40	k6
<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn WC	41	k7
<i>Hansenula dimennae</i>	Ahearn WC	44	k8
<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn WC	51	k9

Os resultados da biotipagem foram designados por meio do esquema proposto por Polonelli et al.,¹³ composto por 3 dígitos, cada um representando uma combinação dos resultados obtidos no “triplet” de três cepas, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Modelos de biotipos *killer*, segundo Polonelli et al.

Atividade do 1° “triplet”				Atividade do 2° “triplet”				Atividade do 3° “triplet”			
leveduras				leveduras				leveduras			
k1	k2	k3	Código	k4	k5	k6	Código	k7	k8	k9	Código
+	+	+	1	+	+	+	1*	+	+	+	1*
+	+	-	2*	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

* Amostra correspondente ao biotipo 211.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste exato de Fisher para comparação da presença de diferentes biotipos *killer* isolados de indivíduos com saúde e de pacientes com candidose ($p \leq 0,05$).

Resultados

A presença de leveduras foi observada em 260 indivíduos sadios, dos quais 100 (38,46%) apresentavam *Candida* na saliva. A espécie predominante foi *Candida albicans*, seguida de *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*. A partir das 36 cepas isoladas de pacientes com candidose, foram identificadas 7 espécies de *Candida*, mas *Candida albicans*, também, foi a mais freqüente nesse grupo (Tabela 3).

Entre as espécies isoladas dos indivíduos saudáveis, foram encontrados 4 biotipos *killer*: 111 (51%), 211 (39%), 212 (9%) e 287 (1%). Entre as oriundas dos pacientes com candidose, observou-se maior variedade de biotipos, predominando o 111 (41,66%) e o 211 (25,00%). Além desses, foram identificados mais 12 biotipos que não foram observados nas amostras isoladas de pacientes normais (Tabela 4). O número de biotipos de *Candida* (14) encontrado nos pacientes com candidose mostrou diferença significativa em relação aos encontrados (4) nos pacientes com saúde bucal.

Tabela 3 – Espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis e com candidose

Espécies	Indivíduos			
	Saudáveis		Candidose	
	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	97	97	23	63,89
<i>C. tropicalis</i>	2	2	4	11,11
<i>C. guilliermondii</i>	1	1	1	2,78
<i>C. Kefyr</i>	–	–	2	5,55
<i>C. parapsilosis</i>	–	–	1	2,78
<i>C. glabrata</i>	–	–	4	11,11
<i>C. krusei</i>	–	–	1	2,78
TOTAL	100	100	36	10,00

Nas amostras de *Candida albicans* isoladas, foram encontrados 11 biotipos, com predomínio do 111 (51,66%), seguido dos biotipos 211 (34,16%) e 212 (7,50%) (Tabela 5). Foram observados 3 biotipos nas amostras de *Candida tropicalis*: 211 (60%), 784 (20%) e 468 (20%); 2 biotipos nas amostras de *Candida glabrata*: 211 (75%) e 466 (25%); 2 biotipos nas amostras de *Candida kefyri*: 111 (50%) e 141 (50%). Nas amostras de *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, foram identificados, respectivamente, os biotipos 111, 211 e 887.

Tabela 4 – Distribuição das amostras de *Candida* de acordo com o biotipo *killer*

Biotipos	Pacientes sadios		Pacientes com candidose		Total das amostras	
	Amostras	%	Amostras	%	Amostras	%
111	51	51,00	15	41,64	66	47,51
122	0	–	1	2,78	1	0,74
141	0	–	1	2,78	1	0,74
181	0	–	1	2,78	1	0,74
188	0	–	1	2,78	1	0,74
211	39	39,00	9	25,00	48	35,27

Continuação

	Pacientes sadios	Pacientes com candidose	Total das amostras
--	------------------	-------------------------	--------------------

Biotipos	Amostras	%	Amostras	%	Amostras	%
212	9	9,00	0	–	9	6,60
241	0	–	1	2,78	1	0,74
287	1	1,00	0	–	1	0,74
411	0	–	1	2,78	1	0,74
466	0	–	1	2,78	1	0,74
468	0	–	1	2,78	1	0,74
784	0	–	1	2,78	1	0,74
871	0	–	1	2,78	1	0,74
885	0	–	1	2,78	1	0,74
887	0	–	1	2,78	1	0,74
TOTAL	100	100,00	36	100,00	136	100,00

Tabela 5 – Biotipos *killer* encontrados nas amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes saudáveis e com candidose

Biotipos	Amostras	%
111	62	51,68
122	1	0,83
181	1	0,83
188	1	0,83
211	41	34,18
212	9	7,50
241	1	0,83
287	1	0,83
411	1	0,83
871	1	0,83
885	1	0,83
TOTAL	120	100,00

Discussão

Dos 260 indivíduos saudáveis pesquisados no presente trabalho, foram encontradas leveduras em 38,46% deles, resultado semelhante ao de Burford-Mason et al.⁴ e Wray et al.²² *Candida albicans* foi identificada a partir

de 97% das amostras, resultado superior ao relatado por Stenderup²¹ que descreveu isolamento dessa espécie em 60% a 70% das amostras.

A biotipagem das 136 amostras de várias espécies de *Candida*, realizada no presente trabalho, evidenciou 16 diferentes modelos *killer*, e entre as 120 amostras de *Candida albicans* podem-se observar 11 biotipos. Caprilli et al.,⁵ Candido et al.,⁶ Pires et al.¹¹ e Oliveira et al.¹⁰ registraram, respectivamente, 7, 23, 10 e 2 diferentes biotipos, utilizando o mesmo grupo de cepas padrão *killer* na biotipagem de *Candida albicans*.

Na verificação do fenômeno *killer* entre as amostras de diferentes espécies de *Candida*, o biotipo mais encontrado foi o 111 (47,79%), indicando que a maior parte das espécies de *Candida* testadas foi sensível a todas as toxinas *killer* produzidas pelas cepas padrão estudadas. O biotipo 211 também foi observado em grande percentual (35,29%), revelando que muitas das amostras estudadas foram resistentes apenas à toxina produzida pela cepa K3.

Entre as amostras de *Candida albicans* estudadas no presente trabalho, os biotipos predominantes foram 111 (51,66%) e 211 (34,16%), resultados semelhantes ao de Caprilli et al.⁵ que encontraram os biotipos 111 (78%) e 211 (13%) nas amostras de *Candida albicans* isoladas de diferentes espécimes clínicos, incluindo a cavidade bucal.

Por outro lado, o biotipo mais freqüente nas observações de Candido et al.⁶ foi o 211 (47,30%), seguido do 111 (22,60%); esses autores estudaram amostras de *Candida albicans* da cavidade bucal e de outros materiais biológicos. O biotipo 211 também foi predominante nos resultados de Pires et al.,¹¹ que realizaram a biotipagem de várias amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids).

Em outros trabalhos, os biotipos 111 e 211 não foram predominantes. Pizzolitto et al.¹² encontraram o biotipo 888 em 87,20% das amostras de *Candida albicans* isoladas de diferentes materiais biológicos, e Oliveira et al.¹⁰ observaram o biotipo 811 em 95,80% das amostras de *Candida albicans* da mucosa bucal de pacientes com câncer. Neste trabalho, os biotipos 888 e 811 não foram identificados.

Outros biotipos encontrados em nossos resultados, porém em menor porcentagem, foram 122, 141, 181, 188, 212, 241, 287, 411, 466, 468, 784, 871, 885, 887. Pires et al.¹⁴ evidenciaram os biotipos 111, 237, 657, 663, 678, 688, 876, 887 e 888. Dessa forma, apenas 2 biotipos foram coincidentes entre nossos resultados e dos autores citados: 111 e 887. Observa-se que a variabilidade dos biotipos é grande de acordo com os autores, estando apenas o 111 e o 211 presentes em vários trabalhos.

O uso do sistema *killer* para observação da sensibilidade das amostras de *Candida* isoladas da cavidade bucal dos pacientes estudados mostrou-se de grande utilidade para verificação da origem e disseminação de amostras de *Candida* ou mesmo como marcador epidemiológico de leveduras. Salienta-se que o método *killer* é de fácil execução e interpretação, uma vez que a leitura deste torna-se evidente pela formação ou não de halo ao redor da amostra semeada.

A maior variabilidade de biotipos *killer* foi verificada em pacientes com candidose. Assim, sugere-se que novos estudos sobre esse assunto sejam realizados, principalmente estudando-se amostras isoladas de pacientes com candidose, para obtenção de novos dados e possível confirmação da maior variabilidade ao fenômeno *killer* nas leveduras que estavam produzindo candidose.

Conclusão

- Entre as 100 amostras de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes saudáveis, ocorreu predominância dos biotipos 111 em 51% e 211 em 39%.
- Para os pacientes com candidose, os biotipos predominantes foram o 111 em 41,66% e 211 em 25% dos casos.
- Nas amostras de *Candida albicans* de pacientes sadios e com candidose, os biotipos mais encontrados foram 111 em 51,66% e 211 em 34,16%.
- Todos os isolados foram sensíveis a pelo menos uma cepa produtora de toxina *killer*.
- Nas amostras isoladas de pacientes com candidose, foi encontrado número maior e estatisticamente significativo de biotipos *killer*.
- O emprego do sistema *killer* possibilitou diferenciar 11 biotipos de *Candida albicans* encontrados na cavidade bucal.

JORGE, A. O. C. et al. Sensitivity to the *killer* toxins in *Candida* yeast isolated of oral cavity from healthy patients and oral candidosis patients. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.29, n.1-2, p.71-80, 2000.

- **ABSTRACT:** *The purpose of this work was to isolate, identify and classify by sensitivity to the killer toxins in Candida yeast from the oral cavity of the healthy and candidosis patients. The results were submitted to statistic analysis, using Fischer's exact test to compare meaningful differences in the number of killer biotypes between the 2 studied groups. The presence of yeast was observed in the saliva of 260 individuals with healthy mouth, from which 100 samples (38.46%) presented the Candida species, being 97% Candida albicans. In 36 samples of patients with candidosis 7 Candida species were isolated. By using killer system it was possible to distinguish 14 biotypes in patients with oral candidosis and 4 biotypes in individuals with healthy mouth.*
- **KEYWORDS:** Candida; Candida albicans; candidosis; killer toxins.

Referências bibliográficas

- 1 ARENDORF, T. M., WALKER, D. M. *Candida albicans*: its association with dentures, plaque and the oral mucosa. *J. Den. Assoc. S. Afr.*, v. 35, p.563-9, 1980.
- 2 BENDOVA, O. The killer phenomenon in yeasts. *Folia Microbiol.*, v.31, p.422-33, 1986.
- 3 BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand*, v.48, p.61-9, 1990.
- 4 BURFORD-MASON, A. P. et al. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in health subjects. *J. Med. Vet. Mycol*, v.26, p.456, 1988.
- 5 CAPRILLI, F. et al. Amplification of the killer system for differentiation of *Candida albicans* strains. *Mycosen*, v.28, p.569-73, 1985.
- 6 CANDIDO, R. C. et al. Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema killer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.28, p.321-4, 1995.
- 7 FONSECA, J. B. Candidíases: aspectos de interesse odontológico. In: LACAZ, C. S. *Candidíases*. São Paulo: EPU, Edusp, 1980. p.130-45.
- 8 JORGE, A. O. C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, v.11, p.279-85, 1997.
- 9 ODDS, F. C., ABBOT, A. B. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia*, v.18, p.301-17, 1980.

- 10 OLIVEIRA, E. E. et al. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31, p.523-7, 1998.
- 11 PIRES, M. F. C. et al. *Candida albicans* byotypes isolated from the oral cavity of HIV positive patients. *Rev. Microbiol.*, v.27, p.46-50, 1996.
- 12 PIZZOLITTO, E. I. Vaginite recorrente: epidemiologia, identificação, biotipagem, sorotipagem, proteinase e testes de sensibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida albicans*. São Paulo, 1994. 133p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- 13 POLONELLI, L. et al. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.17, p.774-80, 1983.
- 14 _____. Production of yeast killer toxin in experimentally infected animals. *Mycopathol.*, v.110, p.169-75, 1990.
- 15 _____. Yeast Killer Systems. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.10, p.369-400, 1997.
- 16 SAMARANAYAKE, L. P. et al. Oral carriage of *Candida* species and coliforms in patients with burning mouth syndrome. *J. Oral. Pathol.*, v.18, p.233-5, 1989.
- 17 SAMARANAYAKE, L. P., MACFARLAND, T. W. *Oral candidosis*. London: Wright, 1990. p.57.
- 18 SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeasts isolates. *Acta Odontol. Scand*, v.48, p.27-36, 1990.
- 19 SCHERER, S., STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, p.675-9, 1987.
- 20 STENDERUP, A. Ecology of yeast epidemiology of yeast infections. *Acta Derm. Venereol Suppl.*, p.27-37, 1986.
- 21 _____. Oral micology. *Acta Odontol. Scand.*, v.48, p.3-10, 1990.
- 22 WRAY, D. et al. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. *Br. Dent. J.*, v.168, p.326-9, 1990.