

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ERIKA HELENA SALLES DE BRITO

UMA ABORDAGEM FENOTÍPICA E MOLECULAR EM LEVEDURAS DO
GÊNERO *CANDIDA* ISOLADAS DE CÃES

FORTALEZA-CE
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ERIKA HELENA SALLES DE BRITO

UMA ABORDAGEM FENOTÍPICA E MOLECULAR EM LEVEDURAS DO
GÊNERO *CANDIDA* ISOLADAS DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA-CE

2008

ERIKA HELENA SALLES DE BRITO

UMA ABORDAGEM FENOTÍPICA E MOLECULAR EM LEVEDURAS DO
GÊNERO *CANDIDA* ISOLADAS DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Marcos Fábio Gadelha Rocha, Prof. Dr.
Orientador - UECE

Francisco Marlon Carneiro Feijó, Prof. Dr.
Examinador - UFERSA

Gandhi Rádís Baptista, Prof. Dr.
Examinador – UFC

Luciana Magalhães Melo, Dra.
Examinadora - UECE

Maria Fátima da Silva Teixeira, Profa. Dra
Examinadora - UECE

Ao meu esposo, Glaumo Mota, o meu maior amor,
companheiro e amigo.

A minha sanchinha, Rosa Helena, sempre presente na
minha vida.

Ao querido Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, um
verdadeiro mestre,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve presente em minha vida, auxiliando e conduzindo os meus passos para o eterno aprendizado.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, que me acolheu ainda estudante de graduação e, ao longo de todos estes anos, contribuiu para minha formação profissional e pessoal, com uma orientação maravilhosa, baseada na amizade, compreensão, tolerância e respeito. Todas as palavras de agradecimento não seriam suficientes para descrever o imenso carinho, admiração e gratidão que sinto.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, exemplo de dedicação e profissionalismo. Obrigada pelo constante apoio, pelas palavras de conforto ditas em momentos tão difíceis ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pela excelente orientação no decorrer de todos estes anos de convivência.

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, por sua orientação e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, que, mesmo com todas suas ocupações, esteve sempre disposto a ajudar e colaborar com sua mente brilhante na solução de questões ao longo deste trabalho.

A todos os integrantes do Centro Especializado em Micologia Médica, em especial, a Raquel Fontenelle, Jéssica Medrano, Lydia Pantoja, Silviane Bandeira e Ana Karoline, companheiras de jornada e amigas fiéis, pelas palavras de carinho e ajuda prestada em todos os momentos quando precisei. Aos estudantes de iniciação científica - Erika Pacheco, Natanael Leitão e Juliane Lira - pela constante ajuda, carinho e respeito.

Aos amigos Terezinha e Daniel pela amizade, obsequiosidade, incentivo e auxílio, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às clínicas veterinárias, que gentilmente concordaram em colaborar com a presente pesquisa, em especial às veterinárias Karine Silva e Erika Kelly Santiago.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução da Universidade Estadual do Ceará, em especial à Dra. Luciana Magalhães Melo, cuja colaboração e conhecimentos cedidos foram essenciais para conclusão da presente tese, e à estudante Érica Albuquerque, por sua imensa frestinosidade.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, pela eficiência na solução de questões burocráticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela ajuda financeira ao longo deste doutorado.

Ao meu marido Glaumo Mota, por sua paciência diante de meu constante estresse e ausência, por entender a importância deste trabalho em minha vida e por ter estado ao meu lado sempre. Seu amor e admiração me incentivam a nunca desistir e ir sempre adiante.

A minha mãe, Rosa Helena Salles de Brito, por ter dedicado sua vida à formação de seus filhos. Sua dedicação, admiração e incentivo foram fundamentais para me fazer acreditar que esta conquista era possível.

Ao meu pai, Eurico Salvador de Brito, pelo apoio e incentivo, que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus melhores amigos: Eurico Júnior, Edla e Eveline, meus irmãos amados, com quem pude e sei que poderei sempre contar.

Aos meus avós, Pedro Salles e Quitéria, e as minhas tias Rosa Maria e Patrícia Salles, pela ajuda, admiração, carinho e incentivo.

Aos meus amigos Carolina Sidrim, Alex Fontenelle e Maria Tereza Ramos, pela amizade incondicional, extremamente importante ao longo desta jornada.

A todos os que participaram direta ou indiretamente de mais esta etapa da minha vida e que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Candida* é composto por leveduras que vivem como comensais na microbiota de homens e animais. Nos últimos anos, tem sido observado aumento considerável de relatos de enfermidades causadas por estas leveduras acometendo variadas espécies animais. Há relatos do surgimento de cepas resistentes a derivados azólicos, *in vitro*, mas ainda são poucos os estudos que abordam o perfil de sensibilidade de *Candida* spp., isoladas de animais, bem como o perfil genotípico destes isolados. Ademais, o gênero *Malassezia* também merece destaque na Medicina veterinária, especialmente a *M. pachydermatis*. Com este estudo, buscou-se conhecer a microbiota fúngica, por leveduras, em cães saudáveis, com ênfase nos aspectos fenotípicos e genotípicos de *Candida* spp. Para tanto, foram analisadas 203 amostras de boca, 110 de mucosa vaginal, 93 do prepúcio e 123 da região perianal de cães. As espécies de levedura isoladas foram identificadas por suas características fenotípicas, de forma manual e por sistema automatizado (VITEK 2), bem como pelo padrão genotípico (polimorfismo de tamanho dos fragmentos amplificados) das regiões ITS1 e ITS2 do DNAr. Foram avaliadas, também, cinco cepas de *C. albicans* e 3 *C. tropicalis*, oriundas da micoteca do CEMM. A técnica de microdiluição em caldo (CLSI; M27-A2, 2002), com modificações, foi empregada para avaliar a sensibilidade de *Candida* spp. e *M. pachydermatis* em relação ao cetoconazol (CET), itraconazol (ITC), fluconazol (FLC), anfotericina B (ANB) e caspofungina (CAS). De acordo com a identificação manual, três espécies de *Candida* foram encontradas: *C. parapsilosis* (n=17), isolada em todos os sítios anatômicos; *C. tropicalis* (n=3), na região perilabial, perianal e prepúcio; e *C. albicans* (n=2), presente somente na região perianal. Foram isoladas 207 cepas de *M. pachydermatis*, das quais 34,8% foram da região perianal, 32,4 % da região perilabial, 22,7% da mucosa vaginal e 10,1% do prepúcio. *Saccharomyces cerevisiae* (n=1) e *Rhodotorula* sp. (n=1) também foram encontradas. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do CET, ITC e FLC, contra as cepas de *Candida* spp., foram 0,03–16 µg/mL; 0,06 a >16 µg/mL; e 0,5–64 µg/mL, respectivamente. Todos os isolados deste gênero foram sensíveis a CAS e ANB. As 20 cepas de *M. pachydermatis* apresentaram CIM entre <0,03 – 0,25 µg/mL para CET e ITC, CIM = 8 µg/mL para FLC, CIM > 64 µg/mL para CAS e CIM = 0,25 µg/mL para ANB. A amplificação pela reação em cadeia da polimerase seguida de eletroforese em gel de agarose (PCR-AGE) permitiu a identificação de seis espécies diferentes. Percentuais de 96,7 e 86,7 de concordância foram encontrados entre PCR-AGE e VITEK *versus* método fenotípico manual, respectivamente. Este estudo demonstrou a presença de *Candida* spp., *M. pachydermatis*, *S. cerevisiae* e *Rhodotorula* sp. como parte da microbiota de cães saudáveis, e que, isolados de *C. albicans* e alguns de *C. tropicalis*, oriundos destes animais, apresentam resistência, *in vitro*, aos derivados azólicos testados. O PCR-AGE mostrou maior percentual de concordância com o método manual, além de ser mais rápido e sensível do que os demais métodos analisados, podendo o seu uso ser indicado para diagnóstico de rotina, de cepas de *Candida* spp. de origem veterinária.

Palavras-chave: Leveduras. *Candida*. Sensibilidade. Cães. PCR.

ABSTRACT

The *Candida* genus is composed of commensal yeasts that live in the microbiota of humans and animals. In recent years there has been a considerable increase in reports of diseases caused by these yeasts in various animal species. There are also reports of the emergence of strains that are resistant to azolic drugs *in vitro*, but few studies provide information on the sensitivity profile of *Candida* spp. isolated from animals, as well as the genotype profile of these isolates. The *Malassezia* genus also deserves attention in veterinary medicine, especially *M. pachydermatis*. This study examined the yeasts making up the fungal microbiota in healthy dogs, with emphasis on the phenotypes, genotypes and antifungal sensitivity of strains of *Candida* spp. To do this, 203 samples were analyzed from the mouth, 110 from the vaginal mucosa, 93 from the prepuce and 123 from the perianal region. The samples were inoculated in Sabouraud agar, Sabouraud agar with chloramphenicol, Sabouraud agar with chloramphenicol, and cycloheximide and Dixon's agar, and incubated at 37° C for 96 hours. The species were identified by their phenotypic characteristics (manual identification). The *Candida* strains were identified as to genotype by analysis of the ITS region of the DNA. At this time, 5 strains of *C. albicans* and 3 of *C. tropicalis* from the collection of the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) of Ceará State University were also analyzed. The broth microdilution method, recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (M27-A2, 2002), with modifications, was used to evaluate the sensitivity of *Candida* spp. and *M. pachydermatis* to ketoconazole (KTC), fluconazole (FLC), itraconazole (ITC), amphotericin B (AMB) and caspofungin (CAS). Three *Candida* species were found: *C. parapsilosis* (n=17), isolated from all the anatomical sites sampled; *C. tropicalis* (n=3), from the perilabial, perianal and prepuce regions; and *C. albicans* (n=2), only present in the perianal region. A total of 207 strains of *M. pachydermatis* were isolated, of which 34.8% came from the perianal region, 32.4 % from the perilabial region, 22.7% from the vaginal mucosa and 10.1% from the prepuce. *Saccharomyces cerevisiae* (n=1) and *Rhodotorula* sp. (n=1) were also found. The minimum inhibition concentration (MIC) values of KTC, ITC and FLC against the *Candida* spp. strains were 0.03–16 µg/mL, 0.06 to >16 µg/mL and 0.5–64 µg/mL, respectively. All the isolates of this genus were sensitive to CAS and AMB. The 20 *M. pachydermatis* strains had a MIC between <0.03 – 0.25 µg/mL for KTC and ITC, MIC = 8 µg/mL for FLC, MIC > 64 µg/mL for CAS and MIC = 0.25 µg/mL for AMB. According to PCR-AGE analysis, six patterns were recognized among the 33 fungal strains. The results revealed a 96.7 % and 86.7 % concurrent identification between PCR-AGE and VITEK methods versus the manual method, respectively. This study demonstrated that *Candida* spp., *M. pachydermatis*, *S. cerevisiae* and *Rhodotorula* sp. are present in the microbiota of healthy dogs and that isolates of *C. albicans* and some of *C. tropicalis* from these animals are resistant *in vitro* to the azolic derivatives tested. PCR-AGE showed a greater level of concordance with the traditional method, besides being more rapid and sensitive than the other methods examined, and is therefore indicated for routine diagnostic testing of *Candida* spp. strains of veterinary origin.

Keywords: Yeasts. *Candida*. Susceptibility. Dogs. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Blastocónidios de <i>Malassezia pachydermatis</i> , com formato oval e apresentando colarete.	19
Figura 02. Colônias de <i>M. pachydermatis</i> em ágar Dixon (A) e ágar Sabouraud (B).	19
Figura 03. Colônias de <i>Rhodotorula sp.</i>	21
Figura 04. Colônias de <i>Candida spp.</i>	30
Figura 05. Blastocónidios de levedura.	30
Figura 06. Microcultivo de levedura em placa de Petri.	31
Figura 07. Micromorfologia <i>Candida albicans</i> : A. Blastocónidios dispostos em cachos; B/C. Clamidoconónidios terminais.	31
Figura 08. Micromorfologia de <i>Candida tropicalis</i> : pseudomicélio com blastocónidios distribuídos em cadeias simples ou ramificadas.	32
Figura 09. Micromorfologia <i>Candida parapsilosis</i> : presença de células gigantes.	32
Figura 10. Teste da uréia positivo (A) e negativo (B).	33
Figura 11. Teste de tubo germinativo positivo para <i>C. albicans</i> .	33
Figura 12. Modelo para teste de assimilação de carboidratos (Auxonograma).	34
Figura 13. A. Teste de fermentação positiva para glicose (Gli), maltose (Mal) e galactose (Gal); B. Bolha de gás carbônico no interior do tubo de Durhan.	35
Figura 14. Aparelho VITEK 2.	36

- Figura 15.** Cartão para identificação de leveduras pelo sistema VITEK 2. 37
- Figura 16.** *Candida* spp. semeadas em CHROMagar: **A.** Cepas de *C. albicans* em verde e *C. tropicalis* em azul; **B.** Cepas de *C. tropicalis* em azul e *C. parapsilosis* em lilás. 38
- Figura 17.** Placa de 96 micropoços utilizada para teste de microdiluição em caldo. 39
- Figura 18.** Método de difusão em Ágar. 40
- Figure 1.** The percentage of samples from which various species of yeast were isolated from various anatomical sites in 203 dogs: oral mucosa ($n = 203$); vaginal mucosa ($n = 110$); prepuce ($n = 93$); and perianal region ($n = 123$). 65
- Figure 1.** Gels showing amplification by PCR-AGE and length variation in the ITS regions of *Candida* isolates from dogs. Lane 1: 100-bp DNA ladder; lane 2: *C. albicans*; lane 3: *C. rugosa*; lane 4: *C. parapsilosis*; lane 5: *C. krusei*; Lane 6: *S. cerevisiae*; lane 7: *C. tropicalis*. **A.** ITS1-ITS4. **B.** ITS3-ITS4. 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: The breeds, ages and sexes of the clinically normal dogs sampled in the study.	63
Tabela 2: The numbers and percentages of the various yeast species isolated from the various.	63
Tabela 3: The minimal inhibitory concentrations (MIC) of ketoconazole, itraconazole, fluconazole, caspofungin and amphotericin B effective in vitro against 22 isolates of <i>Candida</i> spp. and 20 isolates <i>M. pachydermatis</i> isolated from various anatomical sites of clinically normal dogs.	64
Tabela 1. Comparison of the manual, automated VITEK 2 and PCR-AGE methods in the identification of <i>Candida</i> spp. from dogs.	103
Tabela 2. Sensitivity of manual, VITEK 2 and PCR-AGE methods used to yeast identifications.	104
Tabela 3. PCR-AGE fragment lengths of <i>Candida</i> species from dogs.	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB	<i>Amphotericin B</i>
ANB	Anfotericina B
AP-PCR	<i>Arbitrarily primed PCR</i>
ARDRA	<i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
ATCC	<i>Americal Type Culture Collection</i>
CAS	Casposfungina/ <i>Casposfungin</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CET	Cetoconazol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA _r	Ácido desoxirribonucléico ribossômico
FLC	Fluconazol/ <i>Fluconazole</i>
ITC	Itraconazol/ <i>Itraconazole</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kg	Quilograma
KTC	<i>Ketoconazole</i>
mL	Mililitro
MOPS	Ácido 3 (N-morfolino) propanossulfônico
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-AGE	<i>Polymerase chain reaction- Agarose Gel Electrophoresis</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossômico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
µm	Micrômetro

μg

Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Leveduras de Interesse Veterinário	17
2.2. Gênero <i>Candida</i>	22
2.3. Espécies de <i>Candida</i> Presentes em Animais	23
2.3.1 Como Parte da Microbiota	23
2.3.2 Como Patógeno	25
2.4. Diagnóstico Laboratorial	29
2.5. Sensibilidade aos Antifúngicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	38
2.5.1 Resistência Antifúngica	43
2.6. Biologia Molecular no Estudo das Candidíases	45
3 JUSTIFICATIVA	50
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	51
5 OBJETIVOS	52
5.1. Objetivo Geral	52
5.2. Objetivos Específicos	52
6 CAPÍTULO 1:	53
The Anatomical Distribution and Antimicrobial Susceptibility of Yeast Species Isolated from Healthy Dogs.	
7 CAPÍTULO 2:	72
Candidose na Medicina Veterinária: um Enfoque Micológico, Clínico e Terapêutico.	
8 CAPÍTULO 3	94
PCR-AGE, automated and manual methods to identify <i>Candida</i> strains from veterinary sources: a comparative approach.	
9 CONCLUSÕES	114
10 PERSPECTIVAS	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXOS	134

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é composto por leveduras que vivem como comensais na microbiota de homens e animais. Em geral, não causam nenhum dano aos seus hospedeiros, entretanto, em virtude dos distúrbios nas proteções física, química e imunológica, estes microrganismos podem se tornar patogênicos e causar enfermidades, denominadas candidíases.

Outros gêneros de leveduras também são relacionados à microbiota de animais, tais como: *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Malassezia* entre outros, com especial destaque para *M. pachydermatis*, que é a espécie de levedura mais isolada da microbiota animal, bem como tem importante papel na rotina clínica veterinária, como agente patogênico de enfermidades diferentes.

Infecções por *Candida* spp. em animais são pouco frequentes, no entanto, nos últimos anos, tem sido observado aumento considerável de relatos de infecções por estas leveduras, com diferentes manifestações clínicas e acometendo variadas espécies animais, e, mais recentemente, casos de infecções por *Candida* sp. em animais livres de distúrbios imunológicos foram descritos. Ante este fato, o correto diagnóstico clínico-laboratorial se mostra de enorme importância, utilizando técnicas fenotípicas convencionais ou até mesmo métodos moleculares, que, apesar de mais rápidos e precisos, são pouco estudados e aplicados na Medicina veterinária.

De acordo com a literatura, a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente envolvida em casos de candidíases em animais. Outras espécies de *Candida*, no entanto, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, entre outras, também são citadas como agentes de tais infecções.

A identificação destas espécies pode ser feita por meio de análise fenotípica e já existem métodos comerciais disponíveis, no entanto, estas técnicas demandam no mínimo 48 horas para liberar o resultado e os bancos de dados dos sistemas automatizados são limitados. Dessa forma, a abordagem molecular apresenta-se mais sensível e específica do que procedimentos convencionais utilizados para detecção e identificação de fungos. Sua aplicação na Medicina veterinária, no entanto, é escassa, e, de forma geral, ainda se faz necessário o estabelecimento de padrões para a realização de tais testes na rotina laboratorial.

Diferentes drogas antifúngicas são utilizadas para o tratamento de candidíases em animais, mas a atividade destas drogas vai depender da sensibilidade da cepa, tendo sido relatados alguns casos de cepas pouco sensíveis ou até resistentes a derivados azólicos.

Em virtude da escassez de informações sobre *Candida* spp. oriundas de animais, no que diz respeito as suas características moleculares, perfil de sensibilidade as drogas antifúngicas, e considerando-se o potencial patogênico do gênero e o surgimento de cepas resistentes a derivados azólicos, *in vitro*, faz-se necessária uma abordagem acerca das características fenotípicas, genotípicas e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de *Candida* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leveduras de Interesse Veterinário

Diferentes espécies de levedura são citadas como constituintes da microbiota de animais saudáveis, estando presentes em diferentes sítios anatômicos, como pele, pavilhão auditivo, sistema gastrointestinal, entre outros. Dentre as espécies e gêneros descritos, estão *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sacharomices*, *Malassezia*, especialmente *Malassezia pachydermatis*, visto que esta é a espécie mais presente na mucosa de cães saudáveis, bem como é a principal levedura implicada na rotina clínica veterinária (MILNER et al., 1997; MELVILLE et al., 2004; CLEFF et al., 2005; NARDONI et al., 2005; GIRÃO et al., 2006).

Dentre as leveduras importantes na Medicina veterinária, o gênero *Candida* merece destaque, visto que é o segundo gênero de levedura mais implicado em quadros infecciosos acometendo animais, no entanto, estudos mais aprofundados envolvendo isolados de animais são escassos (OZAWA et al. 2005; CLEFF et al. 2007).

Acreditava-se que apenas a *M. pachydermatis* colonizava os animais domésticos, já tendo sido descrita sua presença em diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis, sendo maior incidência observada no pavilhão auditivo, lábio inferior e espaço interdigital dorsal (BOND et al., 1995; KENNIS et al., 1996; CAFARCHIA et al., 2005a, CAFARCHIA et al., 2005b). Espécies lipodependentes de *Malassezia*, porém, já foram isoladas de cães e gatos saudáveis, como *M. furfur*, *M. sympodialis*, e *M. globosa*, encontradas principalmente em ouvido, pele e mucosas destes animais (BOND et al., 1997; CAFARCHIA et al., 2005a; NARDONI et al., 2005).

BOND et al. (1995) verificaram maior incidência de *M. pachydermatis* no ouvido, seguido de lábio inferior e espaço interdigital dorsal de cães saudáveis. A menor incidência foi observada na axila e virilha. Resultados semelhantes foram obtidos por KENNIS et al. (1996), ao isolarem um menor número desta espécie na axila e na virilha e um maior número da região mentoniana de 19 cães saudáveis. Em 2004, PRADO et al. relataram o isolamento de *M. pachydermatis* no saco conjuntival de cães saudáveis.

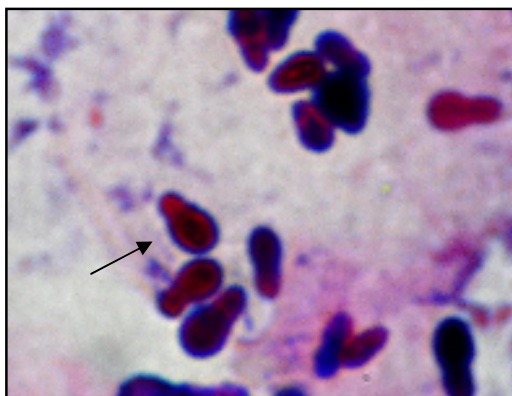
Comumente leveduras do gênero *Malassezia*, principalmente *M. pachydermatis*, são relatadas como causa de enfermidades em animais domésticos, acometendo diferentes sítios anatômicos, sendo frequentemente associadas a quadros de otites externas e, mais recentemente, a diversas formas de dermatites, que acometem cães e gatos (COUTINHO, 2003; MACHADO et al., 2003; CAFARCHIA et al., 2005a; CAFARCHIA et al., 2005b;

NARDONI *et al.*, 2007). Em ambas as enfermidades, pode ser o agente primário ou estar associada com bactérias e outras espécies de *Malassezia* (CRESPO *et al.*, 2002; NARDONI *et al.*, 2005). GIRÃO *et al.* (2006) relataram maior isolamento desta levedura em cães acometidos por otite externa quando comparados com ouvidos saudáveis, o que pode implicar o seu papel patogênico nesta enfermidade. Sua manifestação patogênica geralmente está associada a modificações no ecossistema cutâneo ou a distúrbios nas barreiras química, física e imunológica do hospedeiro (GUILLOT & BOND, 1999).

Apesar de mais freqüente, não só a *M. pachydermatis* é agente de infecções em animais. Diversas outras espécies do gênero já foram associadas a pelo menos um tipo de enfermidade. A ocorrência de *M. sympodialis* é relatada em dois gatos acometidos de otite externa e em equino com dermatomicose (SENCZEK *et al.*, 1999; CRESPO *et al.*, 2000). *M. furfur*, *M. globosa* e *M. nana* também já foram isoladas de gatos com otite (HIRAI *et al.*, 2004; NARDONI *et al.*, 2005). CRESPO *et al.* (2002) descreveram *M. furfur*, *M. obtusa* e *M. sympodialis* como agentes de otite em cães e gatos. DUARTE *et al.* (2002) relataram a presença de *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur* e *M. slooffiae* em bovinos com otite, no Estado de Minas Gerais (Brasil). NARDONI *et al.* (2004) isolaram uma cepa de *M. furfur* como agente isolado de dermatomicose em um cão.

Sabe-se que hoje o gênero *Malassezia* é composto por 13 espécies: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtuse*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japônica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae* e *M. equine* (GUÉHO *et al.*, 1996; SIDRIM & ROCHA, 2004; SUGITA *et al.*, 2002; SUGITA *et al.*, 2003; SUGITA *et al.*, 2004; HIRAI *et al.*, 2004; CABAÑES *et al.*, 2007). Este gênero compreende leveduras lipodependentes, com exceção da *M. pachydermatis*, visto que esta é a única que não precisa da presença de lipídios para seu desenvolvimento,

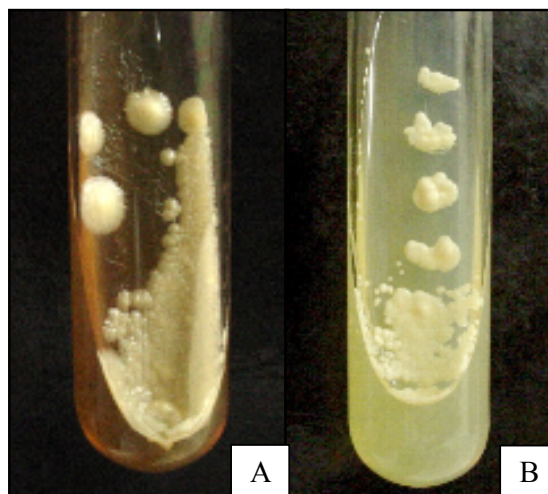
Quanto a sua morfologia, em um exame direto de material clínico, estruturas arredondadas ou ovais em brotamento (blastocônídios), de aproximadamente 2-3 µm de largura e 4-5 µm de comprimento, associadas ou não à presença de hifas e pseudo-hifas, podem ser observadas (Figura 01) (SIDRIM & ROCHA, 2004; CHEN & HILL, 2005).



(Fonte: CEMM, 2002)

Figura 01. Blastoconídios de *Malassezia pachydermatis*, com formato oval e apresentando colarete.

As colônias de *Malassezia* spp., em meios apropriados e a uma temperatura de incubação de 35 a 37°C, apresentam textura cremosa, tonalidade de creme a marrom-clara, topografia convexa, superfície lisa ou levemente rugosa, aspecto seco e com diâmetro variável, de acordo com o tempo de incubação (Figura 02) (SIDRIM & ROCHA, 2004).



(Fonte: CEMM, 2002)

Figura 02. Colônias de *M. pachydermatis* em ágar Dixon (A) e ágar Sabouraud (B).

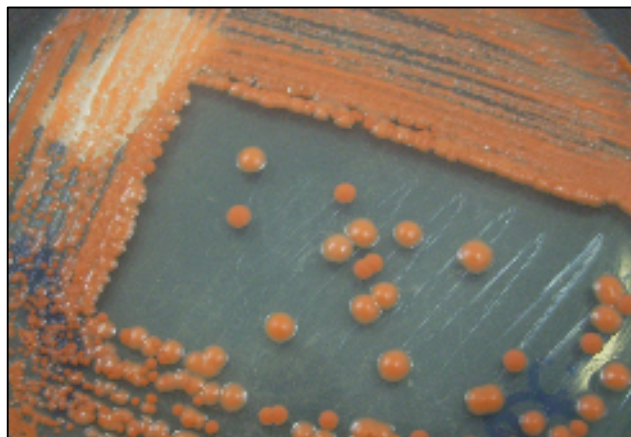
O diagnóstico laboratorial deste gênero fúngico é feito com base em dados morfológicos, bioquímicos, nutricionais e moleculares. A identificação fenotípica das espécies é baseada nas suas exigências metabólicas, como: lipodependência e habilidade de assimilação de ésteres de polioxietileno, como os *tweens* 20, 40, 60, 80 e chemophor EL, que se caracteriza por uma mistura de óleo de mamona com óxido de etileno, como também a produção das enzimas catalase, β -glicosidase e urease, seguindo chaves de identificação específicas, como, por exemplo, as propostas em HOOG et al. (2000) e SIDRIM & ROCHA (2004). Estas chaves de identificação, no entanto, demandam tempo e muitas vezes são incapazes de estabelecer diferenças entre as espécies de *Malassezia*. Em 2005, MIRHENDI et al., buscando uma solução para este problema, implementaram um método de PCR (*Polymerase chain reaction*) e enzimas de restrição para a identificação e diferenciação de 13 espécies do gênero. Atualmente, a identificação das espécies do gênero privilegia a realização de provas moleculares, as quais tornam o diagnóstico laboratorial oneroso e inexecutável em muitos serviços de rotina.

As espécies do gênero *Malassezia* se mostram sensíveis, *in vitro*, aos derivados azólicos, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando entre $< 0,03 - 4,0$ $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol, cetoconazol e itraconazol. Anfotericina B, porém, apresenta CIMs mais elevadas para este grupo de microrganismos, em torno de $4,0$ $\mu\text{g/ml}$. Todas as espécies de *Malassezia* se apresentam resistentes a caspofungina (CIM > 256 $\mu\text{g/ml}$) (BRITO et al., 2007; PRADO et al., 2008).

Avaliar a sensibilidade, *in vitro*, das espécies de *Malassezia* não é tarefa simples, visto que os métodos de micro e macrodiluição em caldo, utilizando o meio RPMI 1640, padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), não são aplicáveis para este gênero; um dos motivos é a característica de lipodependência das espécies de *Malassezia*, com exceção da *M. pachyderamitis*. Outras dificuldades são relatadas, como a padronização do inóculo, tempo de incubação e leitura final dos testes para determinação da CIM (PRADO et al., 2008).

Diversos são os relatos de várias metodologias utilizadas para o teste de sensibilidade *in vitro* para espécies de *Malassezia*, porém, ainda não há um método padrão para este gênero (GUPTA et al., 2000; EICHENBERG et al., 2003; VELEGRAKI et al., 2004; BRITO et al. 2007). Mais recentemente, PRADO et al. (2008) descreveram o repique de alíquotas das placas de microdiluição, trabalhadas de acordo com metodologia descrita anteriormente (VELEGRAKI et al., 2004), após 48 horas de incubação, e, fazendo a contagem de colônias crescidas em cada concentração testada, foi determinada a CIM.

Rhodotorula é um gênero de levedura que apresenta colônias com coloração rosa e são classificadas como um basidiomiceto pertencente à família *Sporidiobolaceae* (Filo *Basidiomycota*) (Figura 03). Este gênero de levedura produz colônias mucoides com produção de pigmentos carotenoides sendo encontrada amplamente distribuída no ambiente. É considerada um organismo de baixa virulência em comparação com *Candida* e *Trichosporon*, no entanto são leveduras que devem ser consideradas patógenos em potencial quando se trata de pacientes com imunodepressão. Em seres vivos, espécies deste gênero podem estar presentes na pele, saliva, urina e fezes são implicados como uma causa frequente de infecções em seres humanos, tais como septicemia, endocardite, meningite e peritonite, acometendo pacientes imunocomprometidos (LUNARDI et al., 2006; TUON & COSTA, 2008).



(Fonte: CEMM, 2008)

Figura 03. Colônias de *Rhodotorula* sp.

Espécies de *Rhodotorula* estão presentes na flora gastrointestinal normal, e a utilização de antibioticoterapia pode contribuir para o seu crescimento excessivo. Casos de fungemia por intermédio de *Rhodotorula* ocorreram após utilização profilática com fluconazol. Apesar de raras, infecções por *Rhodotorula* são importantes, visto que estes microrganismos apresentam resistência intrínseca a fluconazol (LUNARDI et al., 2006).

Na Medicina veterinária, espécies de *Rhodotorula* já foram isoladas de cloaca e orofaringe de aves (MELVILLE et al., 2004), do meato acústico de gatos (AMARAL et al., 1998), e causando mastite em bovinos (RUZ-PERES et al., 2004). Também já foram isoladas

da traquéia de pássaros e as espécies *R. minuta*, *R. mucilaginosa* e *R. glutinis* estão implicadas com desordens respiratórias nestes animais (JAND et al., 2003; GARCIA et al., 2007).

As leveduras do gênero *Sacharomices* (filo *Ascomycota*, Subfilo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*) já foram isoladas de humanos, mas associadas a condições predisponentes, como imunodepressão e antibioticoterapia, mas são consideradas não patogênicas em seres humanos e raramente associadas com doença em animais (CANDELLI et al., 2003; MILNER et al., 1997; BLACKWELL et al., 2006).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, pouco associada com infecção em humanos e animais, foi citada como responsável por um quadro de diarreia crônica em um cão. Uma reação adversa a alimentos foi havida como a causa mais provável da diarreia, no entanto a antibioticoterapia administrada ao animal pode ter favorecido a colonização por *S. cerevisiae*, que foi isolada, juntamente com *C. famata*, de amostras fecais deste cão acometido de infecção intestinal (MILNER et al., 1997).

2.2 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é constituído por leveduras anamórficas que apresentam reprodução assexuada, cujos mecanismos da divisão celular envolvem o brotamento simples, brotamento fissão e divisão binária. Apesar de considerados fungos imperfeitos, visto que sua forma sexuada não é conhecida, apresentam características que os classificam como pertencentes ao grupo dos ascomicetos (GUARRO et al., 1999; HOOG et al., 2001). Este gênero é classificado da seguinte forma: reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, gênero *Candida*. Possui distribuição universal e cerca de 200 espécies foram descritas (CARVALHO et al., 2003). Aproximadamente 10% são consideradas patogênicas, sendo a maioria isolada como microbiota normal da pele, trato gastrointestinal, trato genitourinário, trato respiratório, bem como ambiente, particularmente em superfícies inanimadas (EGGIMANN et al., 2003).

As infecções produzidas por *Candida* spp. podem ser: aguda ou crônica, superficial ou profunda, localizada ou disseminada, sempre de caráter oportunista (SILVA, 2005). A maioria dos indivíduos saudáveis desenvolve defesas imunológicas que impedem a proliferação e progressão para o desenvolvimento de candidíase (RUIZ et al., 2005). Fatores predisponentes, entretanto, como antibioticoterapia, patológicos, físicos, mecânicos e

iatrogênicos modificam a microbiota autóctone e o microrganismo pode proliferar, causando doença de alta gravidade em pessoas e animais.

Com relação ao histórico das candidíases, Langenbeck, em 1839, observou pela primeira vez a levedura hoje conhecida como *Candida albicans* em aftas bucais de um paciente com tifo, tendo erroneamente considerado este microrganismo o agente etiológico da doença. Mais tarde, em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou esse microrganismo no gênero *Sporotrichum*. Em 1846, Berg estudou detalhadamente o microrganismo, estabelecendo, definitivamente, a sua relação com a candidíase oral. Alguns anos mais tarde, em 1853, Charles Robin denominou esse microrganismo de *Oidium albicans*, redenominado por Zopf, em 1890, de *Monilia albicans*. Somente em 1923, Berkhout transferiu essa espécie para o gênero *Candida* e criou a espécie *Candida albicans* (SIDRIM & ROCHA, 2004). Atualmente o gênero é associado a quadros de fungemia em humanos. Além disto, estudos demonstram elevado nível de resistência a agentes antifúngicos azólicos, confirmando a importância do estudo deste gênero (ANTUNES et al., 2004; MEDRANO et al., 2006).

As leveduras do gênero apresentam fatores de patogenicidade e virulência tais como: capacidade do microrganismo em aderir à superfície celular, de formar tubo germinativo, hifas ou pseudohifas, bem como de produzir toxinas e enzimas extracelulares, tais como proteinase e fosfolipase, fatores estes que favorecem a colonização e a invasão tecidual, contribuindo para o progresso da infecção (DE BERNARDIS et al., 2001; NAGLIK et al., 2003; KOGA-ITO et al., 2006; TAMURA et al., 2007). A formação de biofilme, que é uma comunidade de microrganismos irreversivelmente aderidos a uma superfície com matriz extracelular, conferindo maior resistência aos agentes antimicrobianos, podendo ser formados por única espécie de microrganismo ou pela associação de espécies de fungos e/ou bactérias, tem sido associada como um importante fator relacionado à virulência de *Candida* spp. (DOUGLAS, 2003; KOGA-ITO et al., 2006).

2.3 Espécies de *Candida* Presentes em Animais

2.3.1 Como Parte da Microbiota

O isolamento de espécies de *Candida* da microbiota de animais saudáveis, em especial os cães, é pouco relatado. Sabe-se, no entanto, que espécies do gênero habitam sítios como tubo digestivo, mucosas e pele de variados animais, incluindo muitos pássaros. Dentre

todas as *Candida* spp., a *C. albicans* é a mais presente, podendo ser isolada principalmente dos sistemas gastrintestinal e respiratório de animais, além da mucosa genital, tendo predileção pela superfície de mucosas e áreas de junções mucocutâneas de animais de sangue quente (ELAD et al., 1998; HESELTINE et al., 2003; BRITO et al., 2007; JADHAV & PAL, 2006).

No Brasil, PAIXÃO et al. (2001), pesquisando fungos sapróbios em cães e gatos, relataram o isolamento de *Candida* spp. em 6,8% dos animais analisados. SOUSA & SIQUEIRA (2003) detectaram a presença de *C. albicans* no intestino de bovinos. Segundo esses autores, a presença desta levedura como sapróbio está condicionada a vários fatores, sendo o principal a presença de certas fontes de nutrientes.

De acordo com CLEFF et al. (2005), espécies de *Candida* são componentes comuns da microbiota vaginal de fêmeas caninas saudáveis e seu isolamento varia de acordo com a fase do ciclo estral, sendo *Candida parapsilosis* a espécie mais frequentemente isolada, seguida por *C. guilliermondii*, *C. kefir* e *C. albicans*. SUCHODOLSKI et al. (2008) relatam a detecção de *C. parapsilosis* em amostras provenientes do intestino de cães saudáveis.

Leveduras do gênero *Candida* também são encontradas como parte da microbiota do trato digestivo de aves diversas, como pombos, perus, aves de rapina, aves migratórias, aves industriais, entre outras (CAFARCHIA et al., 2006, FULLERINGER et al., 2006; CAFARCHIA et al., 2008). De acordo com CARFACHIA et al., (2006) as aves transportam em sua cloaca leveduras potencialmente patogênicas, sendo capazes de disseminar esses fungos no ambiente, o que é um problema quando se trata de aves criadas em confinamento (FULLERINGER et al., 2006), valendo salientar, ainda, que leveduras presentes na microbiota destes animais aferem maior importância na Micologia médica ao longo das duas últimas décadas, em particular criptococose e candidíase, relatadas com maior frequência, especialmente em pacientes imunocomprometidos (VELASCO, 2000). *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. inconspicua*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* são espécies já isoladas de aves saudáveis (CARFACHIA et al., 2006; GARCIA et al., 2007).

É importante salientar que conhecer os microrganismos que vivem como sapróbios em homens e animais é essencial, visto que, havendo um desequilíbrio no binômio parasita-hospedeiro, eles podem tornar-se agentes responsáveis por infecções e, nestes casos, faz-se necessária a diferenciação entre um ser patogênico ou apenas constituinte da microbiota, fato que se aplica às espécies de *Candida* que vivem como comensais (ELAD et al., 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

2.3.2 Como Patógeno

As espécies de *Candida* que vivem como sapróbias apresentam potencial patogênico que pode se manifestar em decorrência de um desequilíbrio do binômio parasita-hospedeiro, resultante de alterações nos mecanismos de defesa do portador ou por comprometimento das barreiras anatômicas de proteção (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004; SIDRIM & ROCHA, 2004; WEIG & BROWN, 2007). Alguns fatores estão relacionados com esta característica de patogenicidade, tais como: capacidade de crescer a 37°C; pleomorfismo, cujo papel é importante nos processos iniciais de invasão tecidual; produção de alguns metabólitos, que podem desencadear manifestações alérgicas do tipo imediato e tardio; produção de enzimas hidrolíticas e adesinas (NAGLIK et al., 2003; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Na Medicina veterinária, são fatores predisponentes a infecções por *Candida*: idade, presença de doenças autoimunes, uso de corticosteroide, antibioticoterapia, cateterismo venoso e urinário e administração de nutrição parenteral (HESELTINE et al., 2003; MORETTI et al., 2004). De acordo com CLEFF et al. (2007) o uso indiscriminado de fármacos que alterem as barreiras naturais de defesa dos animais, como antibióticos e corticosteroides, associados ao estresse, podem facilitar a multiplicação fúngica, propiciando a instalação de micoses oportunistas, como a candidíase.

As candidíases em animais não são muito descritas e, apesar do aumento na incidência e fatalidade de candidíase humana, os relatos em Medicina veterinária são escassos, sendo encontrados poucos casos na literatura envolvendo animais de companhia (CLEFF et al., 2007). Os sítios anatômicos descritos na literatura como os mais acometidos são: pele, unhas, ouvido, trato urinário e sistema gastrointestinal (HESELTINE et al., 2003; MORETTI et al., 2004; JIN & LIN, 2005; MORETTI et al., 2006). Em casos de quadros cutâneos, este fato se justifica porque as lesões, na maioria das vezes, não são atribuídas a leveduras e sim a fungos filamentosos, bactérias e parasitas (RAPOSO et al., 1996). Por isso, MORETTI et al. (2004) chamam a atenção para a necessidade da realização do diagnóstico diferencial, associando o diagnóstico clínico ao laboratorial. Relatos de candidíase em animais são descritos em diferentes partes do mundo, como Estados Unidos da América, Austrália, Japão, África, Inglaterra, Espanha e Brasil, acometendo diversas espécies e com quadros clínicos variados (MILNER et al., 1997; OCHIAI et al., 2000; DUARTE et al., 2001; MUELLER et al., 2002; PRESSLER et al., 2003; LINEK et al., 2004).

Enfermidades provocadas por *Candidas* geralmente acometem apenas animais imunocomprometidos, como observado por PRESSLER et al. (2003) e HESELTINE et al. (2003), que isolaram espécies do gênero apenas em animais portadores de outros processos infecciosos e com sistema imune comprometido. MORETTI et al. (2006) relataram um caso de infecção simultânea por *Leishmania infantum* e *C. tropicalis* em um cão com lesões cutâneas. De acordo com os autores a alteração no sistema imunológico e as lesões na pele causadas por *L. infantum*, desempenharam papel direto no estabelecimento da infecção por *C. tropicalis*.

O primeiro relato de candidíase, em cães, data de 1949, e se tratou de um caso de dermatomicose por *C. albicans* (REICH & NECHTOW, 1949). No Brasil, há relatos da presença de espécies do gênero, causando quadros de otite (DUARTE et al., 2001) e infecção intestinal em bovinos (SOUZA & SIQUEIRA, 2003) e dermatomicose em cães (RAPOSO et al., 1996). PAIXÃO et al. (2001), na cidade de Fortaleza – Ceará, isolaram *Candida* spp., em cães com micoses superficiais, no entanto, seu papel patogênico não foi conclusivo.

Candidíases são frequentemente associadas a morbidade e mortalidade de aves. Estas enfermidades têm como fatores predisponentes estresse, idade, antibioticoterapia prolongada e *status* imune do animal (BALASUBRAMANIAM e SUKUMAR, 2007). A flora normal do trato gastrintestinal das aves tem efeito inibitório sobre o crescimento de *Candida* spp. Assim, qualquer desequilíbrio da microbiota digestiva, pelo uso incorreto de antibióticos por exemplo, ou por mudanças no pH gastrintestinal, pode resultar na proliferação de fungos (GARCIA et al., 2007). Dessa forma, as *Candidas* são frequentemente associadas a problemas gastrointestinais, principalmente em aves jovens, isso em razão de o sistema imune estar imaturo e em decorrência do desenvolvimento incompleto das defesas gastrointestinais. Infecções sistêmicas, apesar de pouco freqüentes, também podem acontecer (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM e SUKUMAR, 2007; GARCIA et al., 2007; SCULLION e SCULLION, 2007).

O principal agente envolvido na candidíases em aves é a *Candida albicans*. O desequilíbrio populacional dessas leveduras leva ao aparecimento da doença, principalmente no sistema digestivo, podendo acometer o sistema reprodutivo e os olhos e a patologia tornar-se sistêmica (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM e SUKUMAR, 2007; GARCIA et al., 2007).

A inflamação da glândula mamária é o mais importante problema sanitário em rebanhos bovinos leiteiros. A incidência de mastite decorrente de *Candida* spp. é geralmente muito baixa em vacas leiteiras, no entanto KIVARIA & NOORDHUIZEN (2007) relatam

que, ao longo de 31 anos, as mastites causadas por *C. albicans* aumentaram sua ocorrência de $\leq 1\%$ para $\geq 17\%$, valendo salientar, ainda, que esta enfermidade apresenta impacto econômico negativo sobre a rentabilidade da pecuária mundial, tanto pela redução da produtividade quanto pelo aumento nos custos dos tratamentos.

De acordo com SANTOS & MARIN (2005), as *Candidas* constituem a terceira maior causa infecciosa de mastites no Brasil e várias podem ser as fontes de contaminação, como: pele e secreção das tetas, mãos de ordenhadores, máquinas de ordenha, instrumentos de tratamento, condições higiênicas do ambiente, alimentos, entre outras (KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007). MOTA et al. (1999a) identificaram o ordenhador como a fonte de infecção de casos de mastite por *Candida* spp. em bovinos. De acordo com a literatura, a antibioticoterapia e a infusão intramamária de antibióticos, muitas vezes aplicadas sem análise microbiológica do leite, também são fatores predisponentes importantes para esta enfermidade (KRUKOWSKI et al., 2000; SANTOS & MARIN, 2005).

Diferentes espécies do gênero já foram relatadas, causando enfermidades em animais, tais como: *C. guilliermondii*, responsável por quadros de dermatomicoses em cães (MUELLER et al., 2002); *C. famata*, envolvida em infecção intestinal em cães (MILNER et al., 1997); *C. tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. krusei*, causando quadros diarréicos em bezerras (ELAD et al., 1998) e *C. parapsilosis*, agente de dermatomicose em cães (DALE, 1972) e também responsável por lesões na mucosa oral de um galo (KANO et al., 2001). As espécies *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. zeulanoide*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. ciferrii*, *C. humicola*, *C. rugosa*, *Candida pelliculosis* e *C. tropicalis* já foram identificadas como agentes de mastite clínica e subclínica em bovinos (KRUKOWSKI et al., 2000; SANTOS & MARIN, 2005; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

PRESSLER et al. (2003) isolaram espécies de *Candida*, causando infecção urinária em treze cães e sete gatos, entre as quais estavam: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. KOZAK et al. (2003) isolaram cepas de *Candida* spp., em especial *C. krusei*, em lesões superficiais na pele, em 5% de 100 cães analisados e, mais recentemente, OZAWA et al. (2005) isolaram *C. tropicalis* como agente de um quadro de cistite em um cão.

De acordo com a literatura, a *C. albicans* é a espécie mais comum em casos de candidíases em animais, sendo responsável por diversos quadros clínicos como otite (DUARTE et al., 2001), infecção intestinal (OCHIAI et al., 2000), septicemia (HESELTINE et al., 2003), dermatomicose, entre outros (RAPOSO et al., 1996; KOZAK et al., 2003; MORETTI et al., 2004). JIN & LIN (2005), analisando a urina de 23 cães e sete gatos,

portadores de infecção urinária, identificaram a *C. albicans* como a principal espécie fúngica isolada, bem como PRESLLER et al. (2003) observaram que, mesmo com a ocorrência de outras espécies, a *C. albicans* é a levedura mais isolada em cães e gatos também portadores de infecção urinária.

Casos de endoftalmite causados por *C. albicans* são ocasionalmente relatados em animais domésticos, e resultam da difusão hematogênica ou são secundários a uma inflamação primária da córnea pela levedura, com inoculação diretamente dentro do olho (GERDING et al., 1994; LINEK et al., 2004).

Apesar de serem tidas como oportunistas, KOZAK et al. (2003) isolaram espécies de *Candida* causando dermatomicose em animais jovens, livres de distúrbios imunológicos, destacando-se *C. albicans* e *C. krusei* dentre as espécies observadas. Ademais, BROWN et al. (2005) descreveram a presença de candidíase sistêmica em um cão sem nenhuma deficiência imunológica aparente.

Com relação ao aspecto clínico das candidíases em pequenos animais, em cães e gatos acometidos por infecção urinária causadas por *Candida* spp., é possível observar quadros de disúria, hematúria, aumento da frequência de micção, anorexia, depressão e pirexia, sendo este último o principal sintoma (JIN & LIN, 2005).

JADHAV et al. (2006) relataram casos de estomatite causada por *C. albicans* em cães. De acordo com os autores, os animais apresentavam halitose, salivação excessiva, mucosa oral eritematosa, friável, ulcerada, necrótica, com proliferação ou cobertas por placas esbranquiçadas

As lesões clássicas em casos dermatomycoses por *Candida* spp. apresentam contorno irregular e são levemente edemaciadas, com vesículas, preferencialmente localizadas em áreas com dobras cutâneas, como: espaços interdigitais, prepúcio e região perianal. Pode haver, no entanto, a ocorrência de lesões com alopecia, crostas, úlceras e edema (MORETTI et al., 2004). CLEFF et al., (2007) ao relatarem um quadro de infecção cutânea em um cão por *C. albicans*, descrevem lesões inicialmente úmidas e eritematosas com formação de crostas e extensas áreas alopécicas. Os autores relatam ainda que os primeiros sinais clínicos observados no animal foram apatia e depressão, seguidos da dificuldade na alimentação, evoluindo posteriormente para um quadro de dermatopatia crônica. Outros trabalhos associam manifestações clínicas, como apatia, mucosas pálidas e linfonodos aumentados, com a maior probabilidade de isolamento de *C. albicans* (FERREIRO et al., 2002).

As otites por *Candida* apresentam a mesma sintomatologia daquelas causadas por outros microrganismos, como bactérias, ou seja, é possível observar a presença de inflamação, prurido, dor, descamação e edema (MOTA et al., 1999b).

A candidíase em aves caracteriza-se pelo aparecimento de placas esbranquiçadas, localizadas em geral no interior da cavidade bucal e, especialmente, no papo, pela formação de placas pseudomembranosas necróticas na cavidade oral e trato digestivo, presença de material caseoso, que dificultam a deglutição e a respiração. Penas arrepiadas, dificuldades de ingestão de alimentos, diarreia, dispnéia, anorexia, prostração, regurgitação, vômito, perda de peso, esofagite e espessamento da parede do esôfago são sintomas visíveis. Casos graves podem provocar deformidades no bico. Em casos de infecções sistêmicas, são observados sinais no sistema nervoso central, bem como lesões típicas de candidíase gastrointestinal (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM & SUKUMAR, 2007).

2.4 Diagnóstico Laboratorial

As espécies de *Candida* apresentam diferenças do ponto de vista terapêutico e epidemiológico. Estas peculiaridades justificam a necessidade de identificar as leveduras ao nível de espécie quando tais microrganismos estão associados a doenças, principalmente sistêmicas, sendo este procedimento fundamental para permitir a escolha de melhor abordagem terapêutica a ser instituída no paciente infectado (KRCMERY e BARNES, 2002). Dessa forma, diferentes técnicas são utilizadas para identificar espécies do gênero, desde diagnóstico microbiológico baseado em morfologia, limitações nutricionais e características bioquímicas, bem como utilização de *kits* industrializados, testes imunológicos e técnicas moleculares.

O diagnóstico laboratorial das espécies do gênero *Candida* consiste, inicialmente, da confecção de lâminas com base na amostra clínica, com hidróxido de potássio (exame direto), que permite melhor visualização de estruturas fúngicas, bem como de posterior repique da mesma amostra em meios de cultura clássicos: ágar Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. Após o crescimento do fungo nos meios de cultura, são realizadas provas bioquímicas, nutricionais e morfológicas, adequadas para identificação das espécies do gênero (SIDRIM & ROCHA, 2004).

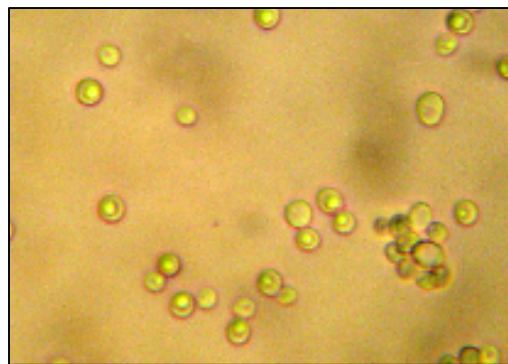
As características morfológicas primárias são importantes para o diagnóstico, no entanto, todas as espécies do gênero *Candida* são semelhantes, ou seja, a princípio todas se

apresentam microscopicamente na forma de blastoconídios, brotantes ou não (Figura 04), e na macroscopia são observadas colônias brancas ou cremes, glabras, úmidas, sem pigmento e sem relevo (Figura 05). Dessa forma, para diferenciação entre espécies, técnicas que permitam melhor visualização da disposição das estruturas fúngicas a microscopia óptica (microcultivo), bem como critérios bioquímicos e nutricionais, são fundamentais, pois estes são espécie-específicos (KOEHLER et al., 1999; SIDRIM & ROCHA, 2004; OLIVEIRA, et al., 2006).



(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 04. Colônias de *Candida* spp.

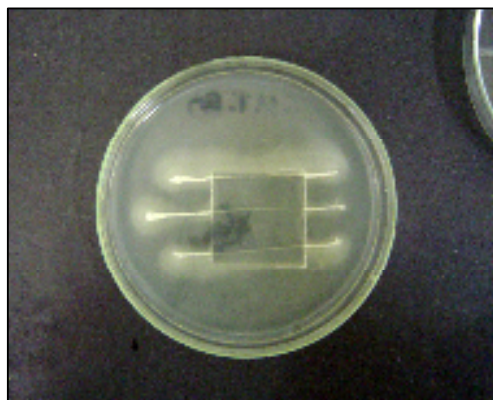


(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 05. Blastocónídios de levedura.

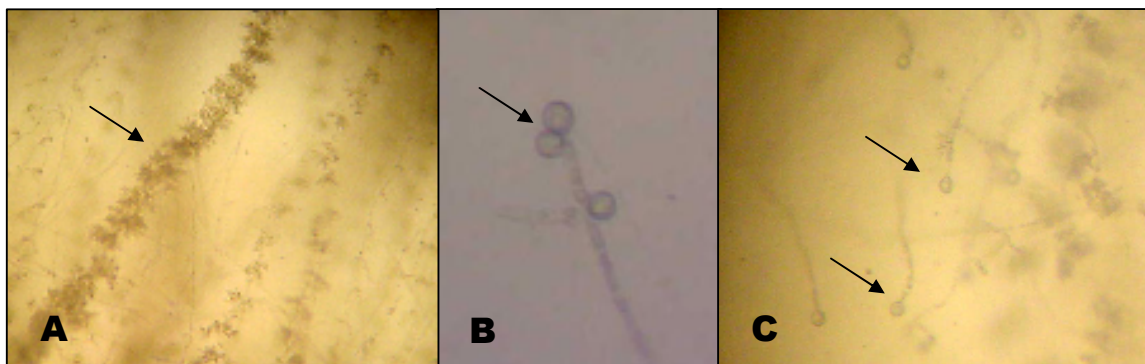
Quando cultivadas, *in vitro*, em meios de cultura adequados, as *Candidas* crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37 °C (KOEHLER et al., 1999; OLIVEIRA, et al., 2006). Com relação à microscopia, se lâminas forem preparadas diretamente com um fragmento da colônia ou amostras clínicas positivas, apenas os blastoconídios serão visualizados.

Microcultivos em placa de Petri com *CornMeal*, acrescido de *Tween* 80 (Figura 06), são realizados com o intuito de permitir melhor visualização da disposição das estruturas fúngicas típicas de cada espécie, sendo estes, na maioria das vezes, suficientes para identificar o microrganismo, por exemplo, cepas da espécie *C. albicans*, apresentam, no microcultivo, pseudo-hifas, hifas verdadeiras, blastoconídios formando cachos, bem como clamidoconídios terminais, características estas peculiares à espécie (Figura 07) (RAPOSO et al., 1996; KOEHLER et al., 1999; OLIVEIRA, et al., 2006).



(Fonte: CEMM, 2005)

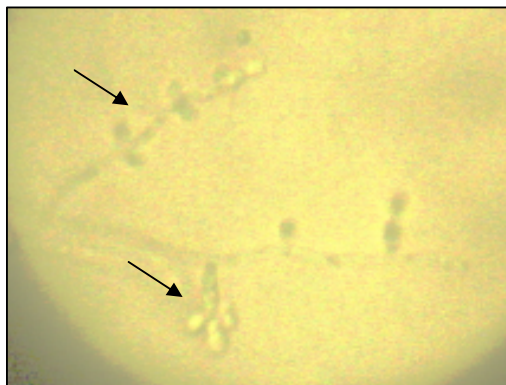
Figura 06. Microcultivo de levedura em placa de Petri.



(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 07. Micromorfologia *Candida albicans*: **A.** Blastoconídios dispostos em cachos; **B/C.** Clamidoconídios terminais.

Já a espécie *C. tropicalis* apresenta à microscopia, após microcultivo, pseudomicélio com blastoconídios distribuídos em cadeias simples ou ramificadas (Figura 08). A presença de células gigantes e pseudo-hifas curtas e finas caracteriza a microscopia de *C. parapsilosis* (Figura 09).



(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 08. Micromorfologia de *Candida tropicalis*: pseudomicélio com blastoconídios distribuídos em cadeias simples ou ramificadas.

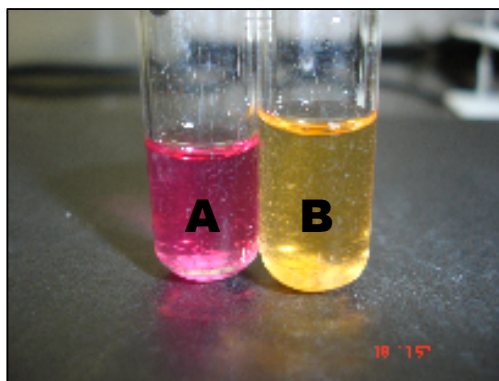


(Fonte: CEMM, 2007)

Figura 09. Micromorfologia *Candida parapsilosis*: presença de células gigantes.

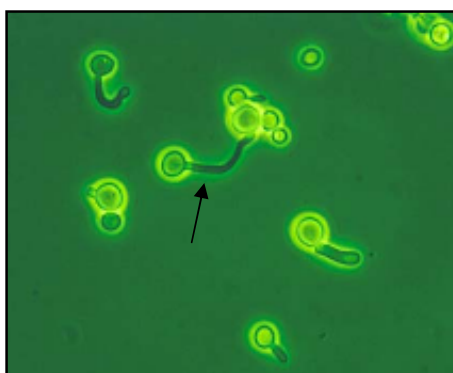
Em muitos casos, apenas o microcultivo não é suficiente para fechar o diagnóstico; é quando se constata a importância das diferenças bioquímicas entre as espécies do gênero. Dessa forma, a união entre morfologia e características bioquímicas é, muitas vezes, imprescindível para melhor identificação e caracterização do microrganismo.

Na rotina laboratorial, testes de predileções nutricionais e características bioquímicas são utilizados para diferenciar as espécies de *Candida*. Estas provas são assimilação de carboidratos e de nitrogênio, fermentação de carboidratos, prova da uréia (Figura 10) e teste do tubo germinativo (Figura 11) (SIDRIM & ROCHA, 2004).



(Fonte: CEMM, 2005)

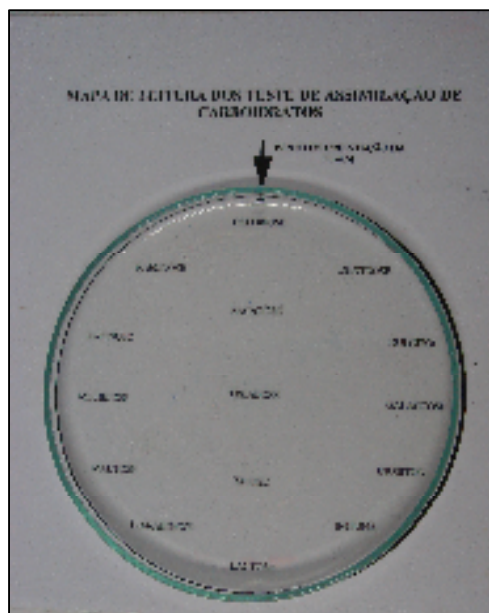
Figura 10. Teste da uréia positivo (A) e negativo (B).



(Fonte: www.doctorfungus.org)

Figura 11. Teste de tubo germinativo positivo para *C. albicans*.

O auxonograma consiste na capacidade que uma levedura apresenta de crescer aerobiamente na presença de determinado carboidrato, fornecido como única fonte de carbono. O teste é realizado em meio sólido acrescido da suspensão do microrganismo a ser testado. Os seguintes carboidratos são fornecidos ao meio: inulina, ramnose, L-arabinose, celbiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melibiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose (Figura 12) (OLIVEIRA et al., 2006).

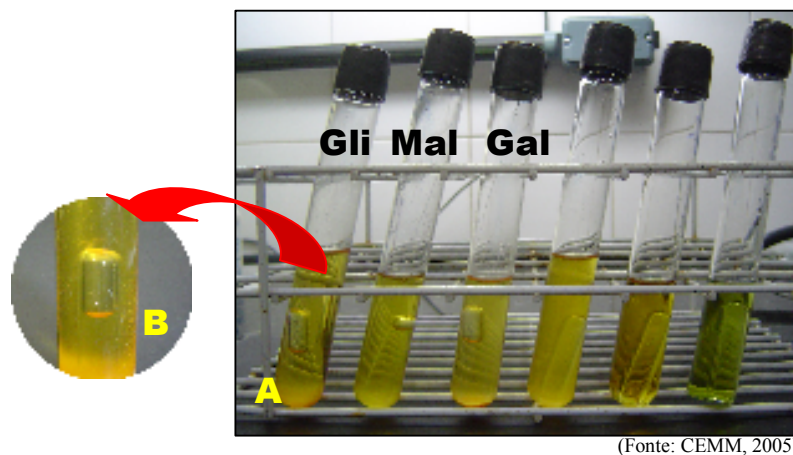


(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 12. Modelo para teste de assimilação de carboidratos (Auxonograma).

As espécies do gênero *Candida* apresentam um perfil de assimilação de carboidratos diferente e a leitura é feita, durante 24 a 96 horas, mediante visualização de halos de crescimento que se formam em volta do carboidrato assimilado. Dessa forma, cepas de *C. albicans* apresentam resultado positivo para glicose, galactose, xilose, trealose e maltose e resultado variável para L-arabinose e sacarose. A *C. tropicalis* é capaz de assimilar glicose, galactose, xilose, trealose e maltose, podendo assimilar ou não sacarose. Quanto a *C. parapsilosis*, esta assimila glicose, galactose, sacarose, maltose, trealose, xilose, arabinose e rafinose, sendo esta última variável (HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004).

No zimograma, é avaliada a capacidade da levedura de fermentar determinado açúcar em baixas tensões de oxigênio. Uma suspensão da levedura é posta em um tudo de ensaio contendo meio de cultura líquido e um tubo de Durham invertido. A positividade é dada pela produção de gás carbônico, que fica contido no interior do tubo de Durham, formando bolhas visíveis (Figura 13) (OLIVEIRA, et al., 2006).



(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 13. A. Teste de fermentação positiva para glicose (Gli), maltose (Mal) e galactose (Gal); B. Bolha de gás carbônico no interior do tubo de Durhan.

Geralmente, os carboidratos utilizados neste teste são dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose e trealose, mas outros podem ser empregados. Sabe-se que, de forma geral, a espécie *C. albicans* é capaz de fermentar glicose e maltose, e apresenta resultado variável para galactose e trealose; já cepas de *C. tropicalis* são positivas para glicose, galactose, trealose e maltose, podendo fermentar ou não sacarose. *C. parapsilosis* fermenta glicose e a galactose é variável (HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004). De acordo com trabalhos realizados no Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, com espécimes de origem animal, as espécies mais encontradas são *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, razão por que foram descritos seus principais aspectos fisiológicos.

Existem também métodos automatizados para identificação das principais espécies do gênero, os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor. São *kits* tais como API 20C Aux e API 32C, e aparelhos como o VITEK (Figura 14), que se baseiam na capacidade assimilativa de substratos bioquímicos e enzimáticos pelas leveduras (KOEHLER et al., 1999; SILVA & CANDIDO, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).



(Fonte: Brito, 2008)

Figura 14. Aparelho VITEK 2.

O VITEK utiliza cartões para identificação de bactérias Gram-positivas, Gram negativas, bactérias capazes de fermentar ou não glicose, bactérias anaeróbias, *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp. e leveduras, incluindo *Candida* spp. (Figura 15). Estes cartões de acrílico são dotados de vários sítios contendo testes bioquímicos e são inoculados com suspensões de microrganismos. No passo seguinte, é realizada uma leitura informatizada de acordo com a sequência colorimétrica, de forma que os resultados ficam disponíveis entre quatro e 18 horas, ou entre 24 e 48 horas, no caso de leveduras. Ocasionalmente, os resultados tendem a ser complementados com métodos manuais adicionais, tais como avaliação de micromorfologia e testes bioquímicos. Outras desvantagens do método são o alto custo do aparelho e dos cartões, o fato de possuir um banco de dados limitado e por vezes insuficiente para identificação de algumas espécies e a não-detecção de amostras mistas ou contaminação, fatos que prejudicam a correta identificação da levedura por este método automatizado (OLIVEIRA et al., 2006).

OLIVEIRA et al. (2006), comparando o método tradicional de identificação de *Candida* spp., baseado em testes morfológicos e nutricionais manuais, com os resultados obtidos pelo VITEK, observaram 58% de concordância entre os métodos na identificação de cepas de *Candida* oriundas de animais e 51% para cepas isoladas como agente de infecções em seres humanos.



(Fonte: Brito, 2008)

Figura 15. Cartão para identificação de leveduras pelo sistema VITEK 2.

Um novo método automatizado para identificação de *Candida* foi desenvolvido - Micronaut-Candida[®] (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany), que é um sistema com quatro testes em placa única. Sua base de dados contém 31 espécies de seis gêneros. Apenas um teste contém 21 reações bioquímicas e três controles, oito substratos cromogênicos, teste de assimilação com 14 carboidratos e teste da urease como controle. Após 24 horas, os resultados são lidos e interpretados automaticamente utilizando-se *software* próprio. Em comparação com outros métodos automatizados, como API ID32C, testes fenotípicos e moleculares, este teste se mostrou eficiente para identificação de espécies de *Candida* comumente isoladas, bem como *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, e *C. lusitaniae*, isso em apenas 24 horas (SZABÓ et al., 2008).

Sistemas automatizados para cultura de sangue, tais como o BacT/ALERT 3D (bioMérieux) ou o BACTEC 9240 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.), associados aos meios de cultura cromogênicos para *Candida*, tais como o CHROMagar *Candida* e ágar *Candida* ID2, facilitam bastante o diagnóstico de infecções por *Candida* spp., principalmente em casos de candidíases sistêmicas (WEIG & BROWN, 2007).

CHROMagar *Candida* é um meio cromogênico que pode ser usado para detectar espécies de *Candida*, principalmente *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*,

que diferem no tom do pigmento produzido no meio. De acordo com OKULICZ et al. (2008), este meio pode ser usado como método primário para a detecção de espécies de *Candida*, pois possibilita o diagnóstico precoce, permitindo ao clínico escolher agentes antifúngicos mais adequados, e reduzir, potencialmente, a morbidade e a mortalidade de pacientes. Cepas de *C. albicans* apresentam-se verdes, *C. tropicalis* ficam azuis e as colônias de *C. kusei* exibem-se na tonalidade rosada, enquanto as colorações apresentadas pelas demais espécies do gênero variam do branco ao lilás (Figura 16).

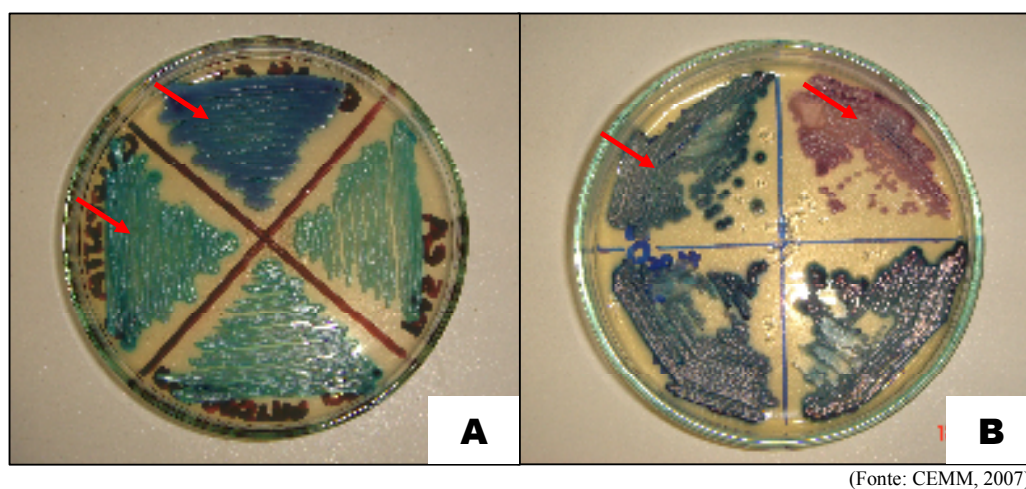


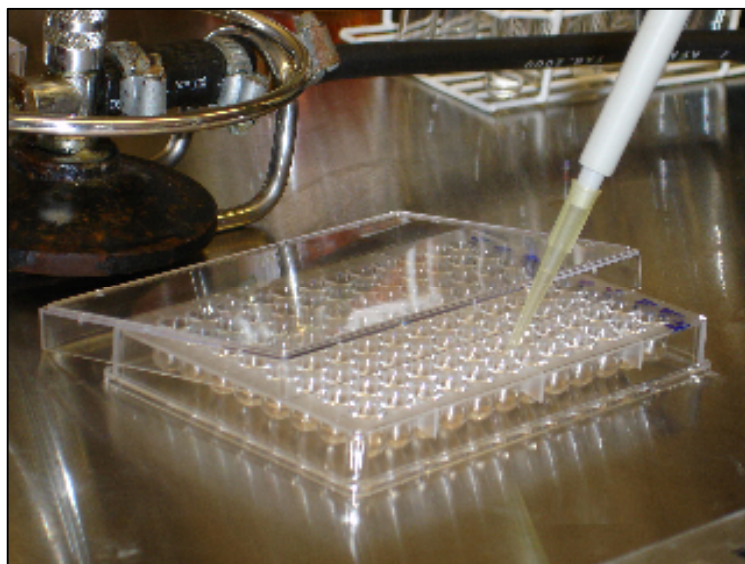
Figura 16. *Candida* spp. semeadas em CHROMagar: **A.** Cepas de *C. albicans* em verde e *C. tropicalis* em azul; **B.** Cepas de *C. tropicalis* em azul e *C. parapsilosis* em lilás.

2.5 Sensibilidade aos Antifúngicos *in vitro* e *in vivo*

Por muito tempo, apenas estudos de sensibilidade a antibacterianos foram desenvolvidos e nenhuma atenção era voltada para a resistência a antifúngicos, entretanto, nos últimos anos, aumenta o interesse pela busca do perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas fúngicas (PEREA et al., 2001).

Com esse intuito, em 1997, o *Clinical and Laboratory Standards Institut* (CLSI) (antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) aprovou os testes de microdiluição (Figura 17) e macrodiluição em caldo para testar a sensibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes, por meio do documento M27-A, sendo este revisto em 2002 (M27-A2). Desta

forma, parâmetros foram determinados para variáveis como tamanho do inóculo, temperatura, duração de incubação, meio de cultura e critério de leitura.



(Fonte: CEMM, 2005)

Figura 17. Placa de 96 micropoços utilizada para teste de microdiluição em caldo.

Existe também um método comercial para testar a sensibilidade de cepas fúngicas, é o E-test[®], que consiste em uma fita plástica contendo fármaco em diferentes concentrações, expressas no reverso da tira. Este teste reúne a vantagem da simplicidade de métodos baseados na difusão em ágar, já que este é seu princípio, com as informações quantitativas fornecidas pelos métodos da diluição. Dessa forma, o E-test[®] poderia ser a alternativa para a triagem de casos de rotina pela sua simplicidade, no entanto, padronizações ainda precisam ser estabelecidas para que este possa se tornar a alternativa para a metodologia preconizada pelo CLSI (KOGA-ITO et al., 2008).

Dentre as desvantagens do E-test[®], estão: o fato de que nem todas as drogas antifúngicas são avaliadas por este teste, dificuldades na interpretação do *endpoint* (em razão do crescimento de colônias na zona de inibição), baixa reprodutibilidade inter e intralaboratorial, baixa correlação com os resultados obtidos por meio de metodologias preconizadas pelo CLSI, e esta correlação varia de acordo com o antifúngico testado (COLOMBO et al., 1995; KOGA-ITO et al., 2008).

Com relação ao método da difusão em disco, este teste é muito utilizado para bactérias e apresenta boa reprodutibilidade e eficácia para determinar a sensibilidade de leveduras (Figura 18) (MEIS et al., 2000; REX et al., 2001). É um método de baixo custo e de fácil execução, porém, somente classifica as leveduras em sensível, sensível dose-dependente e resistente, não sendo possível determinar com precisão a CIM (SONI et al., 1999). JADHAV et al. (2006) utilizaram esta metodologia para avaliar a sensibilidade de quatro cepas de *C. albicans* responsáveis por quadros de estomatite em cães. Todas as cepas foram sensíveis a fluconazol, clotrimazol e anfotericina B, no entanto, mostraram-se resistentes a nistatina.



(Fonte: Brito, 2008)

Figura 18. Método de difusão em Ágar.

Apesar da metodologia já estabelecida e padronizada pelo CLSI, poucos são os trabalhos que testam a sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *Candida* spp. isoladas de animais. OZAWA et al. (2005) utilizaram a técnica de microdiluição em caldo para testar a sensibilidade, *in vitro*, de uma cepa de *C. tropicalis*, isolada da urina de um cão com cistite, a drogas como itraconazol e fluconazol, tendo sido a cepa sensível ao itraconazol, no entanto, apresentou valores elevados de sensibilidade para fluconazol.

BRITO et al. (2007) realizaram testes de sensibilidade, *in vitro*, com cepas de *Candida* spp. isoladas de cães e identificaram presença de resistência aos derivados azólicos:

cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados foram os seguintes: para itraconazol e cetoconazol, foi maior do que 16 µg/mL para todas as cepas de *C. albicans* e 66,7% das *C. tropicalis*; o fluconazol apresentou CIM > 64 µg/mL para 80% das cepas de *C. albicans* e 66,7% das cepas de *C. tropicalis*.

A padronização de métodos de testes de sensibilidade *in vitro* se faz cada vez mais necessária, o que poderá tornar a escolha da terapêutica sempre mais adequada e eficiente. Além disso, é uma importante ferramenta para vigilância e monitoramento de cepas resistentes (BRITO et al., 2007).

Mesmo com escassez de dados acerca da sensibilidade de cepas de *Candida* spp., oriundas de animais, *in vitro*, diferentes terapêuticas são descritas na literatura para as diversas manifestações clínicas das candidíases na Medicina veterinária, de forma que diferentes drogas antifúngicas são indicadas para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., não existindo, no entanto, uma terapêutica padronizada (NOBRE et al., 2002). Ultimamente, os triazólicos recebem maior destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, ambos com largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos, no entanto, em virtude de sua frequente utilização, observa-se resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Candida* (NOBRE et al., 2002). De acordo com OZAWA et al. (2005) a atividade destas drogas vai depender da sensibilidade da cepa em foco.

Em casos de infecção sistêmica por leveduras do gênero, acometendo diferentes espécies animais, a anfotericina B demonstra ser bastante eficiente. Estudos demonstraram boa atividade da droga, *in vitro*, contra cepas de *Candida* spp. isoladas de bovinos com mastite, no entanto, este é um fármaco pouco utilizado na rotina, em virtude do custo elevado e dos severos efeitos colaterais (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005). Outros fármacos indicados para o tratamento de vacas acometidas de mastite são o miconazol e clotrimazol, utilizados via intramamária, como também aplicação tópica de natamicina (NOBRE et al., 2002).

No que concerne à aplicação dos derivados azólicos, em casos de candidíase superficial, um dos tratamentos indicados é o uso de cetoconazol duas vezes ao dia, associado com a utilização de xampu contendo clorexidina e miconazol, por um período de até seis semanas (MUELLER et al., 2002). CLEFF et al. (2007) descrevem a utilização de cetoconazol via oral, na dose de 10mg/kg a cada 12 horas, associado a banhos semanais com xampu de cetoconazol, por um período de 30 dias. Após este período de tratamento, foi observada melhora gradativa das lesões.

O cetoconazol apresenta espectro de atividade amplo, que engloba várias espécies de *Candida* e dermatófitos, no entanto, estudos relatam sua pouca eficiência, *in vitro*, contra cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans* (ROCHETTE et al., 2003; BRITO et al., 2007). Quando usado, tal fármaco pode resultar em uma série de efeitos colaterais, como inapetência, diarreia, depressão e alopecia, além de ser hepatotóxico. Estes efeitos são observados principalmente em animais jovens (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005; BRITO et al., 2007). Apesar dos relatos de resistência com o uso dos azóis e dos novos antifúngicos disponíveis para o tratamento da candidíase, o cetoconazol é um dos fármacos mais frequentemente utilizado em clínica de pequenos animais, representando alternativa economicamente viável e com várias apresentações para uso veterinário, além de ser indicado para terapia de micoses crônicas em diversas espécies (FARIAS & GIUFFRIDA, 2002).

Entre os derivados azólicos, utilizados para o tratamento da candidíases em pequenos animais, está também o fluconazol. De acordo com LINEK et al. (2004), este fármaco pode ser utilizado em cães para o tratamento de endoftalmite por *Candida*, devendo ser a primeira dose administrada por via oral e a segunda 24 horas depois. Apesar de bastante utilizado e apresentando bons resultados no tratamento contra candidíases, o fluconazol semostrar impotente contra algumas espécies como: *C. krusei* e *C. glabrata* (VANDEN BOSSCHE et al., 2003; POSTERARO et al., 2006).

Em casos de infecção urinária causada por *Candida*, o itraconazol é um derivado azólico que pode ser utilizado, sendo administrado por via oral, uma vez ao dia, por até quatro semanas. Após este período, KANO et al. (2002) relataram que não mais observaram a presença de leveduras na urina de um cão com tal enfermidade. Esta droga é bastante eficiente também em casos de candidíases sistêmicas e superficiais (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005).

Uma preparação otológica contendo clotrimazol, que é um derivado imidazólico, é indicada para o tratamento de otites externas agudas e crônicas de cães causadas por fungos, incluindo *Candida* spp., sendo a utilização tópica de uma solução de clotrimazol a 1% eficaz para o tratamento de otite externa por *C. albicans*, apresentando bons resultados, tanto clínica como laboratorialmente (MOTA et al., 1999b).

Para as aves acometidas de candidíases, é indicado tratamento com nistatina, valendo salientar que, por não ser absorvida no sistema gastrointestinal, este fármaco precisa agir por contato direto com as lesões. Em casos de candidíase refratária, recomenda-se a utilização de antifúngicos sistêmicos, como itraconazol, fluconazol ou anfotericina B (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM & SUKUMAR, 2007).

2.5.1 Resistência Antifúngica

A resistência aos antifúngicos pode ser classificada de duas formas: resistência *in vitro* e resistência *in vivo*. A resistência *in vitro* pode ser subdividida ainda em resistência *in vitro* primária, chamada também de intrínseca ou inata, que se apresenta naturalmente no microrganismo; e resistência *in vitro* secundária, que aparece quando o microrganismo inicialmente sensível se faz resistente (BALKIS et al., 2002; SANGLARD & ODSS, 2002; VANDEPUTTE et al., 2005).

A resistência *in vivo* aparece como resultado de falha do tratamento antifúngico e não se associa com a diminuição da sensibilidade *in vitro*. Esse tipo de resistência ocorre em virtude de fatores diferentes, como: farmacocinética da droga antifúngica, fatores dependentes do hospedeiro (estado imune, doenças de base, entre outros) e fatores relacionados ao microrganismo, como virulência e resistência (VIUDES et al., 2002; BRION et al., 2007).

Estudos *in vivo* demonstraram que há intensa correlação entre a produção de exoenzimas e a sensibilidade aos agentes antifúngicos, tendo sido observada maior produção de proteinase e fosfolipase em cepas mutantes e resistentes ao fluconazol, quando comparadas às cepas parenterais, sensíveis a este antifúngico (GHANNOUM, 1992; OLLERT et al., 1995; WU et al., 2000; FEKETE-FORGÁCS et al., 2000).

Diversos são os relatos de cepas de *Candida*, isoladas de humanos, resistentes, *in vivo* e *in vitro*, a fármacos antifúngicos, principalmente a derivados azólicos, e dentre estes, ao fluconazol, sendo as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* as mais citadas (SANGLARD & ODSS, 2002; POSTERARO et al., 2006; KALKANCI et al., 2007). Recentemente, cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, oriundas de animais, apresentaram resistência, *in vitro*, a fluconazol, cetoconazol e itraconazol (OZAWA et al., 2005; BRITO et al., 2007).

Diversas são as causas descritas para o fenômeno da resistência apresentada por cepas de *Candida* spp., tais como: pontos de mutação em genes, redução da permeabilidade da membrana, exposição contínua a antifúngicos, entre outras (PEREA et al., 2001; SANGLARD & ODSS, 2002; CHONG et al., 2007). Com relação à resistência que certas cepas de *Candida* apresentam aos derivados azólicos, as principais causas citadas são pontos de mutação no gene *ERG11*, responsável pela produção da enzima 14 α -demethylase (VANDEPUTTE et al., 2005), modificações no gene *CDR*, que codifica bombas de efluxo,

bem como redução da permeabilidade da membrana a tal grupo de fármacos (PEREA et al., 2001).

O desenvolvimento de resistência aos derivados azólicos pode também decorrer da exposição prolongada da cepa fúngica a este grupo de drogas, fato já observado em cepas de *C. albicans* e comum em pacientes portadores de HIV. Comumente tais pacientes apresentam candidíase orofaríngea e são tratados com fluconazol oral, que, apesar de eficiente e pouco tóxico, acarreta aumento da incidência de resistência clínica, levando à infecção por cepas resistentes a este fármaco (MARTÍNEZ et al., 2002). A resistência clínica pode ocorrer por variados mecanismos, tais como: infecção por microrganismo que apresenta resistência intrínseca; seleção de cepas resistentes, oriundas da pressão exercida pelo antifúngico; e desenvolvimento de resistência no microrganismo anteriormente sensível.

A falha no acúmulo de antifúngicos azólicos no interior da célula, alterações nas bombas de efluxo e mutações no gen *ERG11* têm sido identificadas como as principais causas de resistência de *Candida* spp. pouco sensível a tais drogas (VANDEPUTTE et al. 2005). Modificações na interação da droga com a enzima-alvo também são citadas como causa de resistência. Mutações desse gênero são descritas em cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol (KAKEYA et al., 2000). ASAI et al. (1999) demonstram com seus resultados que este tipo de mutação acarreta não-perturbação da atividade da 14 α -demetilase pelo antifúngico, permitindo a mutantes a capacidade de produzir ergosterol normalmente, de acordo com VANDEN BOSSCHE et al. (2003), uma eficiente estratégia de resistência.

A presença de resistência em cepas de *Candida* geralmente esta associada não apenas a um, mas a vários fatores que atuam ao mesmo tempo, resultando na expressão da característica de resistência. PEREA et al. (2001), investigando cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol, constataram uma natureza multifatorial na resistência a tal fármaco, com predominância de mecanismos como a “superexpressão” de genes (*CDR* e *MDR1*) que codificam bombas de efluxo, associada a “superexpressão”, bem como, mutações no gene *ERG11*. Múltiplos mecanismos combinados foram detectados em 75% dos isolados resistentes. Esses autores observaram ainda que cepas resistentes a fluconazol não obrigatoriamente se apresentam resistentes às demais drogas antifúngicas, no entanto, é notória a diminuição da sensibilidade de cepas resistentes a fluconazol, em relação a outros derivados azólicos, tais como itraconazol, voriconazol e posaconazol.

A ocorrência de multirresistência a derivados azólicos em cepas de *Candida* pode ser associada, principalmente, a modificações no gene *CDR*, mas pode ser também atribuída à presença de mutações específicas no gene *ERG11*. Vale salientar que alterações no gene

MDR1, também responsável por codificar bombas de efluxo, estão associadas, exclusivamente, a resistência a fluconazol.

Outro fator que pode interferir na sensibilidade antifúngica é a estocagem do microrganismo a baixas temperaturas, que pode levar a uma diminuição na eficiência da produção de proteínas, baixa fluidez da membrana celular, estabilização da dupla hélice ou da estrutura secundária da molécula de DNA ou RNA, lento arranjo estrutural das proteínas e decréscimo da atividade enzimática (GRAUMMANN & MARAHIEL, 1996; PANOFF et al., 1998). É pouco provável, no entanto, que tal forma de estocagem resulte na resistência de espécies fúngicas a azólicos, visto que cepas de *Candida* ATCC, existentes há anos, já foram estocadas das mais diversas formas, sem, no entanto, serem alvo de qualquer alteração em suas características fenotípicas e morfológicas, incluindo valores de sensibilidade antifúngica (BRITO et al., 2007).

2.6 Biologia Molecular no Estudo das Candidíases

As infecções fúngicas, incluindo as candidíases, muitas vezes não apresentam manifestações clínicas patognomônicas, fato que aliado à falta de um método diagnóstico mais rápido e sensível, torna difícil a adoção de medidas terapêuticas mais adequadas diante do quadro infeccioso. Métodos clássicos baseados no crescimento do microrganismo em meios de cultura demandam tempo, visto que precisam de, pelo menos, 48 horas para identificação. Assim, o desenvolvimento de métodos diagnósticos eficientes, rápidos e sensíveis possibilita a prescrição de um tratamento antifúngico precoce, favorecendo melhor prognóstico. Vale salientar que a maioria dos quadros de candidíases tem origem endógena, ou seja, são causados pela levedura já presente no organismo (GARCIA-RUIZ et al., 2004). Dessa forma, é interessante também o desenvolvimento de métodos que permitam a diferenciação entre microbiota e infecção.

Avanços obtidos na área da Biologia Molecular permitiram o desenvolvimento de métodos moleculares, consideravelmente eficientes, para identificação de espécies e subespécies do gênero *Candida*, bem como para o monitoramento da emergência de cepas resistentes a antifúngicos, já que a avaliação genética é uma prova útil para detectar mecanismos de adaptação da célula fúngica à presença de antifúngicos (CIRAK et al., 2003), além do que métodos de identificação de leveduras, rápidos e sensíveis, estão se tornando cada vez mais importantes e necessários, visto que os agentes antifúngicos diferem com

relação a sua atividade na dependência da cepa fúngica, bem como espécies de *Candida* diferem em suas características de virulência.

A análise molecular pode contribuir para melhor entendimento da patogenicidade deste grupo de microrganismos, bem como a tipificação de cepas pode fornecer informações sobre a origem e mecanismos de transmissão, estabelecer relação entre isolados e suas propriedades de virulência (WEIG et al., 2007). As técnicas moleculares também podem ser empregadas na determinação de resistência antimicrobiana, no monitoramento de doenças por meio da detecção de infecções e em estudos epidemiológicos (MOLINA & TOBO, 2004).

A abordagem molecular é bem sensível e específica quando comparada a procedimentos convencionais utilizados para detecção e identificação de fungos. O PCR foi uma das primeiras técnicas descritas para tais aplicações, sendo muito eficiente na distinção de espécies de *Candida*, além de ser muito mais sensível e específico do que procedimentos convencionais utilizados para detecção e identificação de fungos em culturas *in vitro* ou mesmo de amostras clínicas. Outras técnicas, porém, surgiram com o objetivo de potencializar a eficiência do PCR na identificação de microrganismos, como *nested* PCR, *multiplex* PCR, RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*), RFLP (*Restriction Fragment length polymorphism*), ARDRA (*Amplified ribosomal DNA restriction analysis*), entre outras. Todas são utilizadas de forma eficiente na identificação de espécies do gênero *Candida* (CIRAK et al., 2003; BOCKELMANN et al., 2008).

Com relação a alvos moleculares que podem ser utilizados para diagnóstico de fungos, as regiões codificantes 18S, 5.8S, e 28S do RNAr evoluem lentamente, sendo relativamente conservadas e por isso fornecem uma base molecular que pode estabelecer relações filogenéticas entre microrganismos. Entre as regiões codificantes, existem regiões internas não transcritas (*internal transcribed spacer 1 e 2 -ITS1 e ITS2, respectivamente*), que evoluem mais rapidamente e podem, portanto, variar entre diferentes espécies dentro de um mesmo gênero. A região ITS é localizada entre os genes 18S e 28S do RNAr e está subdividida em região ITS1, entre as regiões 18S e 5.8S, e região ITS2, que está entre as regiões 5.8S e 28S. Diferenças entre espécies obtidas por fragmentos de tamanhos distintos ou sequência das regiões ITS1 e ITS2 são usadas para detectar e identificar fungos, bem como ambas as regiões podem ser empregadas para identificar espécies fúngicas na cultura *in vitro* (FUJITA et al., 2001; BOCKELMANN et al., 2008).

Diversos estudos são descritos na literatura utilizando as regiões ITS1 e ITS2 como alvo molecular para a identificação de espécies de *Candida*, visto que estas regiões evoluem mais rapidamente e podem, portanto, variar entre diferentes espécies dentro de um

gênero (MASSONET et al., 2004). SUCHODOLSKI et al. (2008) utilizaram as regiões ITS1 e ITS2 como alvo molecular para a detecção de espécies fúngicas de amostras provenientes do intestino de cães saudáveis e doentes. Os autores detectaram a presença de gêneros fúngicos diferentes, e dentre estes, *Candida* spp., sendo o isolamento das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, mais frequente em cães acometidos de enteropatias. A padronização da extração e purificação de DNA, bem como dos produtos da PCR, não está ainda bem estabelecida e a aplicação de adventos moleculares na Medicina veterinária é muito escassa, sendo poucos os relatos da utilização de tais técnicas para estudos epidemiológicos, de identificação e caracterização de espécies de *Candida*, isoladas de animais.

Trabalhos como de KANO et al. (2002) e MORETTI et al. (2004) chamam atenção para este fato. Os autores aplicaram técnicas moleculares distintas para identificação de cepas de *Candida*, agentes de infecções em animais. KANO et al. (2002) identificaram uma cepa de *C. albicans* e uma de *C. parapsilosis*, provenientes da urina de cães com infecção urinária, pela análise do DNA ribossomal por PCR. Já MORETTI et al. (2004) optaram por uma reação de PCR-REA (*Restriction Enzyme Analysis*), mediante a qual identificaram uma cepa de *C. albicans* responsável por um quadro de dermatomicose em um cão. Vale salientar que EDELMANN et al. (2005), em uma análise filogenética, concluíram que isolados de *C. albicans* oriundos de humanos e de animais não apresentaram nenhuma distinção e que os animais podem ser considerados possíveis vetores destes microrganismos para seres humanos, principalmente imunocomprometidos. JACOBSEN et al. (2008), no entanto, fazendo uma comparação entre cepas de *C. albicans* isoladas de humanos e animais, mas com origens geográficas distintas, afirmam que existe separação genética entre cepas de animais e cepas que colonizam e infectam seres humanos, mas mantendo alguns traços comuns.

MORRETI et al. (2006) utilizaram a técnica de *PCR-reverse hybridization assay* para confirmar o diagnóstico micológico convencional, baseado em testes morfológicos e nutricionais, de uma *C. tropicalis*, agente de lesões cutâneas em um cão, estando associada com *L. infantum*. Os autores extraíram DNA proveniente de blocos de parafina contendo material biopsiado diretamente da pele afetada e obtiveram resultados satisfatórios.

Diversos autores incentivam o diagnóstico, por Biologia Molecular, de infecções invasivas causadas por *Candida*, diretamente da amostra clínica, tais como sangue, soro, plasma, frascos de cultura de sangue, líquidos corporais e amostras de tecido (KLINGSPOR & JALAL, 2006), bem como métodos baseados em PCR mostram claramente maior sensibilidade do que a cultura e com eficácia comparável. Vários protocolos de PCR são

capazes de detectar e identificar espécies de *Candida* em menos de 24 h (SHIN et al, 1997; CHANG et al, 2001).

Apesar de tantas vantagens, existem fatores limitantes ao estabelecimento do PCR como técnica para diagnóstico de rotina, visto que o método é sensível para reações cruzadas com os contaminantes, resultando em falso-positivos. Outros problemas metodológicos incluem a presença de um baixo número de leveduras circulantes durante infecção sistêmica e *Candidas* provenientes da microbiota que podem contaminar a amostra clínica, bem como a rígida parede celular deste grupo de microrganismos e a necessidade de padronização da extração e purificação de DNA e dos produtos da PCR, não ainda bem estabelecidos. Estes fatores, juntamente com a ausência de padronização para selecionar e manipular amostras clínicas e detectar o DNA-alvo, conduzem a resultados divergentes. Como consequência, os resultados moleculares não são reconhecidos e não há consenso no que diz respeito aos critérios para diagnóstico (WEIG et al., 2007).

De acordo com a literatura, a parede celular presente nas células de *Candida* dificulta a obtenção de DNA de qualidade, de forma que diferentes técnicas utilizadas para rompimento celular, realizadas por meio de expedientes mecânicos ou enzimáticos, são relatadas. Mais recentemente, LIM et al. (2008), descreveram um método alternativo para extração de DNA de *Candida*, utilizando sorbitol e *glass beads*, de acordo com os autores uma metodologia simples, economicamente mais viável e eficaz, que, utilizada em conjunto com *kits* comerciais para extração de RNA e DNA, obtém produtos com qualidade relativamente melhor do que outras técnicas de ruptura celular, tais como as que utilizam a enzima *lyticase*. Além do mais, esta metodologia evita a utilização de produtos como fenolclorofórmio e β -mercaptoetanol.

A grande vantagem da PCR é o seu alçado poder de predição negativa, o que permite determinar antecipadamente a inexistência de infecções fúngicas, reduzindo o uso empírico de antifúngicos (HEBART et al 2000; WILLIAMSON et al, 2000), no entanto, para a aplicação rotineira de métodos moleculares, alguns aspectos técnicos que têm de ser melhorados, como, por exemplo, controles para evitar falso-positivos em decorrência da contaminação por fungos ambientais. Outro aspecto a considerar é a grande sensibilidade dos métodos moleculares, que poderia gerar dificuldade na hora de interpretar os resultados.

A análise por microssatélites é baseada na amplificação, por meio de PCR, de fragmentos utilizando *primers* complementares a sequências singulares, repetitivas, presentes no DNA-alvo. Estas sequências repetitivas são chamadas microssatélites. Esta técnica difere do RAPD na utilização de uma temperatura de anelamento mais elevada, 55 °C, em vez de 37

°C, como é no RAPD. A aplicação de uma temperatura de anelamento mais alta enseja produtos mais específicos, o que, conseqüentemente, garante maior reprodutibilidade (BOTTEREL et al, 2001; STEPHAN et al, 2002; DALLE et al, 2003).

SAMPAIO et al. (2001) descreveram um novo locus de microsatélite (CAI) localizado em uma região não codificante do genoma de *C. albicans*, e avaliaram com rigor a sua aplicabilidade para diferenciar cepas. Os *primers* utilizados para este locus são específicos para *C. albicans*, não ocorrendo a amplificação em outras espécies de levedura, incluindo *C. dubliniensis*. Os microsatélites podem ocorrer em vários milhares de exemplares dispersos por todo o genoma e exibir elevado polimorfismo. Assim, a tipagem de DNA por microsatélites pode fornecer importantes correlações entre genótipos e origem de infecções grau de virulência e sensibilidade a drogas. Essas correlações são importantes para estudos epidemiológicos. BARADA et al. (2008), analisando 116 cepas de *C. albicans* utilizando este mesmo locus, observou a ocorrência de 44 tipos diferentes de alelos e 75 genótipos distintos, e notaram que cepas com genótipos iguais causando infecções e presentes no ambiente

3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se o potencial patogênico do gênero *Candida*, os relatos de resistência aos derivados azólicos em cepas oriundas de cães, bem como a escassez de informações acerca das cepas de origem veterinária, fazem-se necessários estudos sobre as características fenotípicas e genotípicas destas leveduras no campo da Medicina veterinária. Adicionalmente, tais investigações podem contribuir para o aprimoramento de métodos e terapêuticas em clínica veterinária aplicada a pequenos animais.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1 - Diferentes espécies do gênero *Candida*, bem como outros gêneros de levedura, fazem parte da microbiota de cães, vivendo como comensais em sítios anatômicos dotados de elevada umidade.

2 - Há fenômeno de resistência antifúngica em cepas de *Candida* spp. isoladas da microbiota de cães.

3 - Cepas de *Candida* spp., oriundas de cães, apresentam genótipos distintos com base nas regiões ITS do DNAr, de forma que sua análise permite a identificação das espécies diferentes deste gênero de levedura.

4 - *Primers* universais desenhados para regiões conservadas do DNAr de cepas fúngicas de origem humana amplificam as regiões ITS1 e ITS2 do DNAr de cepas de *Candida* spp. oriundas de cães.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Conhecer a microbiota fúngica, por levedura, em cães saudáveis, com ênfase em aspectos fenotípicos, genotípicos e de sensibilidade antifúngica de cepas de *Candida* spp.

5.2 Objetivos Específicos

1 - Realizar o isolamento de leveduras em diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis;

2 - Determinar o perfil de sensibilidade antifúngica, *in vitro*, das cepas de *Candida* spp. e *M. pachydermatis*, isoladas da microbiota de cães hígidos;

3 - Identificar as espécies de *Candida* isoladas, mediante o perfil fenotípico, utilizando métodos manual e automatizado;

4 - Identificar espécies de levedura, isoladas de cães saudáveis e enfermos, por intermédio do perfil genotípico das regiões ITS1 e ITS2 do DNAr;

5 - Validar o método de PCR-AGE para identificação de cepas de *Candida* oriundas de cães, utilizando *primers* universais desenhados para cepas de origem humana.

6 CAPÍTULO 1

Identificação e Sensibilidade Antifúngica de Espécies de Leveduras Isoladas de Cães Saudáveis.

The Anatomical Distribution and Antimicrobial Susceptibility of Yeast Species Isolated from Healthy Dogs.

Periódico: *The Veterinary Journal* (Aceito em 06 de Julho de 2008).

Fator de impacto: 1.755

**The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast
species isolated from healthy dogs**

Erika H. S. Brito ^{a,*}, Raquel O. S. Fontenelle ^a, Raimunda S. N. Brillhante ^b, Rossana A.
Cordeiro ^{b,c}, André J. Monteiro ^d, José J. C. Sidrim ^b, Marcos F. G. Rocha ^{a,b}

^a *School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Science, State
University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.*

^b *Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical
Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.*

^c *Department of Biology, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.*

^d *Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza-
CE, Brazil.*

* Corresponding author. Tel.: 55 85 32571893.

E-mail address: sallesbrito@yahoo.com.br (E.H.S. Brito).

Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de leveduras presentes em diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis e determinar sua sensibilidade antifúngica, *in vitro*, utilizando o teste de microdiluição em caldo. As amostras foram coletadas a partir do prepúcio, mucosa vaginal, oral e perianal. Os isolados foram identificados de acordo com suas características morfológicas e perfil bioquímico. *Malassezia pachydermatis* foi a levedura mais comumente isolada, seguido por *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula* spp. A Concentração inibitória mínima para os derivados azólicos cetoconazol, itraconazol e fluconazol, contra as cepas de *Candida* spp., foram 0,03–16 µg/mL; 0,06 a >16 µg/mL; e 0,5–64 µg/mL, respectivamente, sendo os isolados de *Candida* spp. sensíveis a caspofungina e anfotericina B. Todos os isolados de *M. pachydermatis* foram sensíveis ao itraconazol, fluconazol, cetoconazol e anfotericina B, no entanto verificou-se que as cepas desta espécie são resistentes à caspofungina. Em resumo, este estudo mostrou que *Candida* spp., *M. pachydermatis*, *S. cerevisiae* e *Rhodotorula* spp. podem ser encontradas como parte da microbiota de cães saudáveis e que alguns destes microrganismos apresentam resistência, *in vitro*, a antifúngicos comumente utilizados.

Abstract

The aim of this work was to identify the predominant yeast species present at different anatomical sites in healthy dogs and to determine their in vitro antimicrobial susceptibility using a broth microdilution assay. Samples were collected from prepuce, vaginal, oral and perianal mucosae and the isolates cultured were identified according to their morphological characteristics and biochemical profile. *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) was the most commonly isolated yeast, followed by *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *C. tropicalis*, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) and *Rhodotorula* spp.. Minimum inhibitory concentrations of the azole derivatives ketoconazole, itraconazole and fluconazole against *Candida* spp. were 0.03 to ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$, 0.06 to >16 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 to ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ respectively and *Candida* isolates were sensitive to caspofungin and amphotericin B. Although all isolates of *M. pachydermatis* were sensitive to itraconazole, fluconazole, ketoconazole and amphotericin B, they were found to be resistant to caspofungin. In summary this study has highlighted that *Candida* spp., *M. pachydermatis*, *S. cerevisiae* and *Rhodotorula* spp. are part of the normal canine surface microbiota and some of these organisms exhibit in vitro resistance to commonly used antimicrobials.

Keywords: Dog; Yeast flora; *Candida* spp.; *Malassezia pachydermatis*; Antimicrobial susceptibility

Introduction

Yeasts are common components of the surface microbiota of humans and animals. They inhabit external and internal moist surfaces, such as the skin, ear canal, conjunctival sac, mouth, digestive tract and perianal region (Heseltine et al., 2003; Moretti et al., 2004; Prado et al., 2004; Cafarchia et al. 2005b; Nardoni et al., 2005). Although *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) is the species most commonly isolated from dogs (Cafarchia et al.; 2005b; Girão et al., 2006; Nardoni et al., 2005), species of the genus *Candida*, and in particular *Candida albicans* (*C. albicans*) are also considered important, although their isolation has not been widely reported (Paixão et al., 2001; Heseltine et al., 2003; Moretti et al., 2004). Studies in Brazil indicate that *C. albicans* is the species most frequently implicated in human infection (Antunes et al., 2004) along with *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, important causes of onychomycosis and candidaemia respectively (Brilhante et al., 2005; Medrano et al., 2006).

Yeasts are associated with disease following disturbances to the physical, chemical or immunological defense mechanisms of the host (Cafarchia and Otranto, 2004; Coutinho, 2005). For example *M. pachydermatis* is commonly associated with otitis externa in dogs and with several forms of dermatitis in both dogs and cats (Cafarchia et al., 2005a; Cafarchia et al., 2005b; Girão et al., 2006). *Candida* spp. are important pathogens in small animals, and are associated with urinary tract infections (Ozawa et al., 2005), endophthalmitis (Linek, 2004), cutaneous lesions (Moretti et al., 2004) and systemic infections (Brown et al., 2005).

Given the pathogenic potential of these organisms, this work set out to establish the identity the predominant yeast species present at different anatomical sites in healthy dogs and to determine their in vitro antimicrobial susceptibility. The findings could prove useful in the future treatment of disease caused by these organisms.

Material and methods

Sample collection

Samples were collected over a nine month period, between June 2006 and March 2007, from the oral mucosa ($n = 203$), vaginal mucosa ($n = 110$), prepuce ($n = 93$) and perianal region ($n = 123$) of 203 clinically normal, intact male ($n = 94$) and female ($n = 109$) dogs of various age and breed that had not received antifungal drugs in the previous six months (Table 1). Five veterinary clinics located in the city of Fortaleza, Ceará, Brazil

facilitated specimen collection and samples were obtained using sterile cotton swabs moistened with sterile 0.9% saline solution (Cafarchia et al., 2005b).

Laboratory methods

Following sample collection, the swabs were dispatched to the Medical Mycology Centre at The School of Medicine of The Federal University of Ceará. The samples were inoculated onto Petri dishes with 2% Sabouraud dextrose agar (SGA, Difco Laboratories), with or without chloramphenicol, and onto modified Dixon agar. The cultures were incubated at between 32 and 35 °C and were examined daily for up to seven days. *M. pachydermatis* was identified as previously described (Guého et al., 1996; De Hoog et al., 2000) based on both its macroscopic and microscopic features and on its capacity to grow in Sabouraud medium.

Candida spp. were identified according to their morphological characteristics, biochemical profile and growth in CHROMagar-Candida. To facilitate the identification of *Candida* micromorphology, chlamydospore, hyphae and pseudohyphae production was promoted by streaking and stabbing plates containing cornmeal-Tween 80 agar (Difco Laboratories) with a 48 h old yeast colony and incubating for 3 to 5 days at 25 °C. Biochemical tests were performed using the assimilation method on a yeast nitrogen base (Difco Laboratories) containing 2% agar, using disks impregnated with various carbohydrates. Noticeable growth around the disks, after 48 h of incubation at 37° C, indicated assimilation of the respective carbohydrate sources. Fermentation of sugars was performed by inoculating 200 µL of 48 h culture suspensions into tubes of fermentation broth, containing 2% solutions of each sugar. A positive result was indicated by the production of acid and gas after 14 days (Gautret et al., 2000). The identification of *Rhodotorula* and *Saccharomyces* was based on their morphological characteristics and biochemical profile, as described by De Hoog et al. (2000).

Susceptibility testing – Malassezia pachydermatis

For susceptibility testing, twenty random isolates of *M. pachydermatis* were used: five from the oral mucosa; five from the vaginal mucosa; five from the prepuce; and five from the perianal region.

The microdilution assay for susceptibility testing of *M. pachydermatis* was as previously described by Velegraki et al. (2004), with some modifications. After 48 h incubation of the microdilution plates, the isolates to be tested were sub-cultured on Petri

dishes with potato dextrose agar to determine the minimal inhibitory concentration (MIC). Susceptibility testing was performed using RPMI 1640 medium, with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma Chemical Co.), buffered at pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co.), supplemented with 20 g of glucose, 4 g of ox bile (Oxoid Ltd.), 1 mL of glycerol (Sigma Chemical Co.) and 0.4 ml of Tween 20 (Sigma Chemical Co.) per L.

The test inoculum was obtained from cultures grown for four days at 35 °C on modified Dixon agar, using 3 mL of sterile saline, was standardised spectrophotometrically at 530nm and then adjusted to a final concentration of $2.0 - 3.5 \times 10^3$ CFU/mL.

Suspensions of itraconazole, ketoconazole (Janssen Research Foundation), fluconazole (Pfizer) and amphotericin B (Sigma Chemical Co.) were prepared as described by Velegraki et al. (2004). Caspofungin (Merck, Sharp and Dohme) was used as described by Barchiesi et al. (2006). Ketoconazole, itraconazole and amphotericin B were prepared in 100% dimethyl sulfoxide (Merck). Fluconazole and caspofungin were prepared in distilled water. Final concentrations were obtained by serial dilution, with intervals tested ranging from 0.015 – 16 µg/mL for caspofungin, itraconazole, ketoconazole, and amphotericin B and from 0.03 – 64 µg/mL for fluconazole.

The microdilution assay for *M. pachydermatis* was performed in 96-well plates. Growth and sterile control wells were included for each isolate. Following incubation of the microplates at 32 °C for 48 h, 1 µL aliquots from each well containing *M. pachydermatis* plus different concentrations of drugs, and the positive control, were subcultured in Petri dishes with potato dextrose agar to determine the MIC. These subcultures were incubated for 2 to 5 days at 32 °C until visible colonies could be counted. Colony numbers with the different drug concentrations were compared with those found in the positive control. For azole derivatives and caspofungine, the MIC was defined as the lowest antifungal concentration with the lowest number of isolates with a colony count similar to the drug-free control. The MIC for amphotericin B was defined as the lowest concentration of drug that completely inhibited fungal growth.

Susceptibility testing – Candida spp.

All *Candida* spp. isolated were evaluated in addition to one isolate of *C. tropicalis* isolated from the ear canal of a dog with otitis externa which was used as a measure of microbial resistance to azole derivatives. The MIC for *Candida* spp. was determined by a broth microdilution method as described by The Clinical and Laboratory Standards Institute (

CLSI) (2002) and Brito et al. (2007). Isolates of *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were included as quality controls. Sensitivity and resistance criteria were established according to CLSI (2002).

A standardised inoculum was prepared by turbidimetry. Stock inocula were prepared from two day-old cultures grown on potato dextrose agar at 28 °C. Sterile 0.9% saline was added to the agar slant, and cultures were gently swabbed to dislodge developing blastoconidia. This blastoconidia suspension was transferred to a sterile tube, and the volume adjusted to 4 mL with sterile normal saline. The resulting suspension was allowed to settle for 5 min at 28 °C, and its density read at 530nm and adjusted to 95% transmittance. The suspensions were then diluted 1:100, and then 1:20 with RPMI 1640 medium with added L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma Chemical Co.), and buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co.) to obtain an inoculum concentration of approximately $2.5 - 5 \times 10^3$ CFU/mL.

The final concentrations of the drugs tested (caspofungin, itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and fluconazole) were prepared as described by CLSI (2002) and Pfaller et al. (2006). Caspofungin, itraconazole, ketoconazole and amphotericin B were diluted as described, resuspended in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.), and tested in the concentration range 0.01–16 µg/mL. Fluconazole was tested in the range 0.06 – 64 µg/mL.

The microdilution assay for *Candida* spp. Susceptibility testing was performed in 96-well microdilution plates. Growth and sterile control wells were included for each isolate. The microplates were incubated at 37 °C and were assessed after two days. All isolates were run in duplicate and the procedure was repeated at least twice. For azoles, the MIC was defined as the lowest drug concentration inhibiting 80% of fungal growth. For amphotericin B, the MIC was the lowest concentration of drug at which there was no fungal growth, as defined by CLSI (2002).

Statistical analysis

Study data was analysed using descriptive variable analysis. The Fisher and Pearson Chi-Square tests were used to analyse the associations of the categorised variables. The Mann–Whitney non–parametric test was used for the comparison analysis between discrete data. The smallest significance level was $P < 0.05$.

Results

Of the total of 529 samples analysed, yeasts were isolated from 223 (42.2%). The greatest number were isolated from the perianal region (76 animals) (Fig. 1) and this site also had the greatest species variability. At this anatomical location *M. pachydermatis* was most commonly isolated ($n = 67$, $P < 0.05$), followed by *C. parapsilosis* ($n = 2$), *C. albicans* ($n = 1$) and *C. tropicalis* ($n = 1$) (Table 2). In a small number of dogs more than one yeast species was isolated from the same site: *M. pachydermatis* and *C. parapsilosis* from the perianal region of three animals; *M. pachydermatis* and *C. albicans* from one animal; and *M. pachydermatis* and *Rodotorula* spp. from a further dog.

The site with the second greatest number of yeasts isolated was the oral mucosa, with (73 animals) (Fig. 1). Of these, 69 isolates were *M. pachydermatis* ($P < 0.05$), four were *C. parapsilosis*, and one each of *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae* (Table 2). Yeasts were isolated from the vagina of 51 animals (Fig. 1). *M. pachydermatis* was most frequently isolated ($n = 45$) with seven isolates of *C. parapsilosis* also identified (Table 2). The prepuce was the region with the lowest number of organisms isolated (23 animals) (Fig. 1). At this location there were 21 isolates of *M. pachydermatis* ($P < 0.05$), and one of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* respectively (Table 2).

M. pachydermatis was isolated from one or more sites in 207 (92.8%) of the 223 animals from which yeasts were recovered. In particular this organism was commonly isolated from the perianal region where it was found in 58.5% of samples. The vaginal mucosa was the anatomical site with the second highest number of isolates (41.3% of samples), followed by the oral mucosa (34%) and prepuce (22.3%).

Of the breeds sampled, *M. pachydermatis* was most frequently isolated from Poodles and from their oral mucosa in particular. The Poodle and English Cocker Spaniel were the breeds from which *M. pachydermatis* was most commonly isolated from the vaginal mucosa ($P < 0.05$). The frequency of *Candida* spp. isolates was also higher in the Poodle (10 isolates) than in the other breeds studied. However the number and variety of *Candida* spp. isolated meant statistical analysis was not feasible.

Of the 109 samples from females, *M. pachydermatis* was isolated from 36 samples from the oral mucosa, from 44 from the vaginal mucosa, and from 41 from the perianal region. Of the 94 samples from males, *M. pachydermatis* was isolated from 32 samples from the oral mucosa, from 21 from the prepuce and from 26 from the perianal region. Overall, there was no significant difference in the incidence of *M. pachydermatis* isolated from males and females.

Of the 22 *Candida* isolates, 77.3% were *C. parapsilosis* ($n=17$, $P < 0.05$), 13.6% were *C. tropicalis* and 9.1% were *C. albicans* (Table 2). The greatest number and variability of *Candida* isolates were from the perianal region. *Candida* spp. were cultured from 5.5%, 3% and 2.2% of vaginal, oral and preputial samples respectively. One isolate of a *Rhodotorula* spp. was recovered from the perianal region of a male Poodle and *S. cerevisiae* was isolated from the oral mucosa of a male English Cocker Spaniel. *Candida* spp. were more frequently isolated from females with the isolation of *C. parapsilosis*, *C. albicans* and *C. tropicalis* from the vaginal ($n = 7$) and oral ($n = 4$) mucosa and from the perianal region ($n = 5$). In males, two species, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, were isolated from preputial samples, one species, *C. parapsilosis*, was isolated from the oral mucosa, and *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* were isolated from three samples from perianal region.

When age was considered as a factor, *M. pachydermatis*, was more commonly isolated from the oral mucosa of animals greater than five years old ($P < 0.05$) and was less commonly found on the vaginal mucosa of dogs less than one year old ($P < 0.05$). There was no significant age-related difference in the isolation of this organism from the perianal or preputial regions. *Candida* spp. were most commonly isolated from dogs between the ages of 1 and 5 years (50% of cases), followed by dogs older than 5 years (31.8% of cases). Statistical analysis of this data was not appropriate given the small number of isolates.

In terms of in vitro antimicrobial susceptibility testing, the MIC values for the *M. pachydermatis* and *Candida* isolates are detailed in Table 3. Caspofungin had a MIC of > 16 $\mu\text{g/mL}$ for all 20 isolates of *M. pachydermatis*. Ketoconazole was the drug with the lowest MIC of < 0.03 $\mu\text{g/ml}$, followed by itraconazole (MIC ≤ 0.03 and MIC = 0.25 $\mu\text{g/ml}$). The microdilution susceptibility test indicated MICs for fluconazole and amphotericin B of 8.0 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

Of the *Candida* spp. isolated, the MIC of caspofungin for *C. parapsilosis* varied between 0.5 and 2 $\mu\text{g/mL}$ and for *C. tropicalis* and *C. albicans* was ≤ 0.03 $\mu\text{g/mL}$. The MIC for Amphotericin B was between 0.125 and 1 $\mu\text{g/mL}$ for all the *Candida* isolates tested. MICs of > 64 $\mu\text{g/mL}$ for fluconazole and ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ for both ketoconazole and itraconazole were determined for three isolates of *C. tropicalis*. Fluconazole had a MIC of ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, and ketoconazole and itraconazole MICs of ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ against the two isolates of *C. albicans* evaluated. For the 17 isolates of *C. parapsilosis* tested, the MICs for fluconazole, ketoconazole and itraconazole were between 0.5 and 16 $\mu\text{g/mL}$, 0.03 and 2 $\mu\text{g/mL}$ and 0.06 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ respectively.

Table 1: The breeds, ages and sexes of the clinically normal dogs sampled in the study.

Breed	<i>n</i>	Age					Sex				
		< 1 year	%	1–5 years	%	> 5 years	%	Female	%	Male	%
Poodle	104	22	21.15	49	47.12	33	31.73	58	55.77	46	44.23
Mixed Breed	41	12	29.27	17	41.46	12	29.27	21	51.22	20	48.78
English Cocker Spaniel	15	1	6.67	12	80	2	13.33	9	60	6	40
Yorkshire Terrier	16	5	31.25	8	50	3	18.75	10	62.5	6	37.5
Doberman Pinscher	5	2	40	1	20	2	40	3	60	2	40
Other	22	8	36.4	10	45.4	4	18.2	9	40.9	13	59.1
Total	203	50		97		56		110		93	

Table 2: The numbers and percentages of the various yeast species isolated from the various anatomical locations in the 203 clinically normal dogs.

Anatomical location	Total	<i>M. pachydermatis</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
Oral mucosa	203	69	33.3	4	23.5	1	0	0	1
Vaginal mucosa	110	45	21.7	7	41.2	0	0	0	0
Prepuce	93	21	10.2	1	5.9	1	0	0	0
Perianal region	123	72	34.8	5	29.4	1	2	1	0
Total	529	207	100	17	100	3	2	1	1

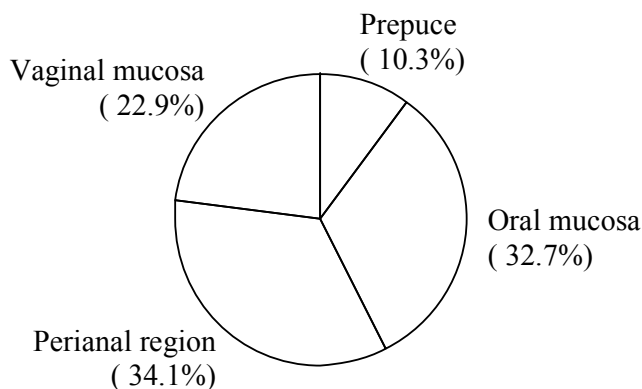
Table 3: The minimal inhibitory concentrations (MIC) of ketoconazole, itraconazole, fluconazole, caspofungin and amphotericin B effective in vitro against 22 isolates of *Candida* spp. and 20 isolates *M. pachydermatis* isolated from various anatomical sites of clinically normal dogs.

<i>Candida</i> spp.	<i>n</i>	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				
		Caspofungin	Ketoconazole	Itraconazole	Fluconazole	Amphotericin B
<i>C. parapsilosis</i>	17	0.5 (2) ^a	0.03 (1)	0.06 (7)	0.5 (1)	0.125 (2)
		1 (7)	0.06 (1)	0.25 (6)	1 (5)	0.25 (6)
		2 (8)	0.125 (6)	0.5 (4)	2 (1)	0.5 (6)
			0.25 (3)		4 (3)	1 (3)
			0.5 (4)		8 (5)	
			2 (2)		16 (2)	
<i>C. tropicalis</i>	3	≤ 0.03 (3)	0.25 (1)	0.5 (1)	0.5 (1)	0.25 (1)
			8 (1)	4 (1)	> 64 (2)	0.5 (1)
			> 16 (1)	>16 (1)		1 (1)
<i>C. albicans</i>	2	< 0.03 (2)	16 (2)	>16 (2)	32 (1)	0.25 (1)
					64 (1)	1 (1)
<i>M. pachydermatis</i>	20	> 16 (20)	< 0.03 (20)	≤ 0.03 (19)	8 (20)	0.25 (20)
				0.25 (1)		
<i>C. tropicalis</i> ^b	1	≤ 0.03 (3)	> 16 (1)	>16 (1)	> 64	0.25
<i>C. krusei</i> ATCC	1	0.03	0,5	0.5	32	2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	1	0.06	0.06	0.06	2	1

^a Represents the number of isolates for the MIC indicated.

^b *C. tropicalis* isolated from the ear of a dog with otitis externa. Used as a parameter of resistance to azole derivatives.

Figure 1: The percentage of samples from which various species of yeast were isolated from various anatomical sites in 203 dogs: oral mucosa ($n = 203$); vaginal mucosa ($n = 110$); prepuce ($n = 93$); and perianal region ($n = 123$).



Discussion

Although typically considered commensals, the capacity of yeasts to cause disease when physicochemical or immunological host barriers are breached (Cafarchia and Otranto, 2004; Coutinho, 2005) has led to increased interest in these microorganisms, in both human and veterinary medicine (Brown et al., 2005; Nardoni et al., 2005; Ozawa et al., 2005; Girão et al., 2006). They constitute part of the microbiota of the skin, oral, conjunctival and vaginal mucosa, and of the perianal region of animals (Guillot and Bond, 1999; Prado et al., 2004) with *M. pachydermatis* reported most commonly in dogs (Guillot and Bond, 1999; Crespo et al., 2002) and less commonly, *Candida* spp. in both dogs and cats (Paixão et al., 2001; Boutilier and Carr, 2005).

In this work, we found four genera of yeast: *Malassezia*; *Candida*; *Saccharomyces*; and *Rhodotorula*, associated with particular anatomical sites in the dog. *M. pachydermatis* was found to be the most frequently isolated species of yeast in the current study, a finding supported by a previous study that found this organism in 60% of samples from oral mucosa and from 36.5% of samples from the perianal region of dogs (Cafarchia et al., 2005b). Furthermore, in line with the findings of Cafarchia et al. (2005b), *M. pachydermatis* was most frequently isolated from the perianal region, followed by the vaginal mucosa, oral mucosa and prepuce. *M. pachydermatis* is the species most adapted to animals and is considered a component of the microbiota of the haired skin and external ear canal of

dogs, cats and other animals (Cafarchia et al., 2005a; Nardoni et al., 2005; Girão et al., 2006). This organism is commonly isolated from the ear canal of healthy dogs (Crespo et al., 2002; Kumar et al., 2002) and it has also been found in the normal canine conjunctival sac (Prado et al., 2004).

Given that *M. pachydermatis* is considered the most pathogenic yeast (Cafarchia et al., 2005a; Nardoni et al., 2005; Girão et al., 2006) and that this organism is also potentially zoonotic (Morris et al., 2005), the frequent finding of this organism at many sites in the dog should raise awareness to the disease-causing potential of this organism, particularly in immunocompromised patients.

Factors such as breed, age, season and inter-current disease can influence the frequency of isolation of these organisms from dogs (Duarte et al., 2001; Kumar et al., 2002; Machado et al., 2003). Various studies have indicated that yeasts are particularly associated with the: Basset Hound; Dachshund; English Cocker Spaniel; West Highland Terrier; Australian Silky Terrier; and Poodle (Cafarchia et al., 2005a; Girão et al., 2006; Prado et al., 2004). In the current study *M. pachydermatis* was most commonly isolated from Poodles and English Cocker Spaniels.

Although *Candida* spp. have been regarded as part of the surface microbiota of healthy animals (Hörmansdorfer and Bauer, 2000; Paixão et al., 2001; Boutilier and Carr, 2005), the particular species involved, where, and how commonly they occur remain unknown. The present study supports the suggestion that these species are commensals of the oral and vaginal mucosa, and of the preputial and perianal regions. While *C. albicans* has previously been considered the most common *Candida* spp. associated with the surface microbiota of animals (Greene and Chandler, 1998; Paixão et al., 2001; Kano et al., 2002; Pressler et al., 2003; Sousa and Siqueira, 2003; Moretti et al., 2004), only two *C. albicans* isolates were found in the current study and both were from the perianal region. In contrast to previous findings, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* were frequently isolated from a wide range of anatomical sites in this study.

Previous reports of *Candida* infections in animals have illustrated their pathogenic potential (Heseltine et al., 2003; Moretti et al., 2004; Brown et al., 2005). Edelmann et al. (2005) suggested animals should be considered potential sources of *Candida* infection of particularly immunocompromised human patients. *C. parapsilosis*, identified in this study, is particularly associated with systemic infection of humans (Medrano et al., 2006) and exhibits resistance to azole derivative antimicrobials, as observed in the current study (Brito et al., 2007). All the *Candida* isolates tested were sensitive to amphotericin B and caspofungin,

findings similar to those of Barchiesi et al. (2006) who assessed isolates from human patients. The MIC we found for caspofungin for *C. tropicalis* was similar to the findings of Pffaler et al. (2006).

The MIC values for *M. pachydermatis* for azole derivatives and for amphotericin B are similar to those previously reported (Velegraki et al., 2004), a finding that demonstrates the reproducibility of the data when using a modification of the recommended broth microdilution technique (CLSI, 2002). *M. pachydermatis* was found not to be particularly sensitive to caspofungin in this study.

Conclusions

This study has highlighted that *Candida* spp., *M. pachydermatis*, *S. cerevisiae* and *Rhodotorula* spp. are part of the normal canine microbiota at multiple anatomical sites and some of these organisms exhibit in vitro resistance to commonly used antimicrobials such as azole derivatives and caspofungin.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Specialised Medical Mycology Center (CEMM-Federal University of Ceará, Brazil) for their material help and scientific guidance in carrying out this work. The study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process: 475724/2006-2).

References

- Antunes, A.G.V., Pasqualotto, A.C., Diaz, M.C., D'Azevedo, P.A., Severo, L.C., 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46, 239-241.
- Barchiesi, F., Spreghini, E., Tomassetti, S., Vittoria, A.D., Arzeni, D., Manso, E., Scalise, G., 2006. Effects of Caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 2719–2727.
- Boutilier, P., Carr, A., 2005. Fungal colonization and failure of a long-term gastrostomy tube in a cat. *The Canadian Veterinary Journal* 46, 709-10.

Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Medrano, D.J.A., Rocha, M.F.G., Monteiro, A.J., Cavalcante, C.S.P., Meireles, TEF, Sidrim, J.J.C., 2005. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 131-135.

Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Soares Júnior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2007. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. *The Veterinary Journal* 174, 147–153.

Brown, M.R., Thompson, C.A., Mohamed, F.M., 2005. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 272-276.

Cafarchia, C., Otranto, D., 2004. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *Journal of Clinical Microbiology* 142, 4868-4869.

Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G., Otranto, D., 2005a. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia* 160, 143–149.

Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D., Capelli, G., Chermette, R., Guillot, J., Otranto, D., 2005b. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 316-322.

Clinical and Laboratory Standards Institute (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Wayne, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Coutinho, S.D.A., 2005. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57, 149-153.

- Crespo, M. J., Abarca, M. L., Cabañes, F. J., 2002. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical Mycology* 40, 115-121.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueiras, M.J., 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, 2nd ed. Universitat Rovira i Virgili, Espanha.
- Duarte, E.R., Resende, J.C., Rosa, C.A., Hamdan, J.S., 2001. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 48, 631-635.
- Edelmann, A., Krüger, M., Schimid, J., 2005. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 6164-6166.
- Gautret, P., Rodier, M.H., Kauffmann-Lacroix, H., 2000. Case report and review. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. *Mycoses* 43, 433-435.
- Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2006. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *The Veterinary Journal* 172, 544-548.
- Greene, C.E., Chandler, F.W., 1998. Candidiasis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 2nd ed. Saunders Company. Philadelphia.
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Leeuwenhoek* 69, 337-355.
- Guillot, J., Bond, R., 1999. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Mycology* 37, 295-306.
- Hörmansdorfer, S., Bauer, J., 2000. Yeast infection in veterinary medicine. *Contributions to Microbiology* 5, 54-78.

Heseltine, J.C., Panciera, D.L., Saunders, G.K., 2003. Systemic candidiasis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 821-824.

Kano, R., Hattori, Y., Okuzumi, K., Miyazaki, Y., Yamauchi, R., Koie, H., Watari, T., Hasegawa, A., 2002. Detection and identification of the *Candida* species by 25S ribosomal DNA analysis in the urine of candidal cystitis. *The Journal of Veterinary Medical Science* 64, 115-117.

Kumar, A., Singh, K., Sharma, A., 2002. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 57, 4.

Linek, J., 2004. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. *Veterinary Ophthalmology* 7, 159-162.

Machado, M.L.S., Appelt, C.E., Ferreiro, L., Guillot, J., 2003. Otites e dermatites por *Malassezia* spp em cães e gatos. *Clínica Veterinária* 44, 27-34.

Medrano, D.J.A., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A.C., Rocha, M.F.G., Rabenhorst, S.H.B., Sidrim, J.J.C., 2006. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48, 17-20.

Moretti, A., Posteraro, B., Boncio, L., Mechelli, L., Gasperis, E., Agnetti, F., Raspa, M., 2004. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia* 21, 139-142.

Morris, D.O., O'Shea, K., Shofer, F.S., Rankin, S., 2005. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. *Emerging Infectious Diseases Journal* 11, 83-88.

Nardoni, S., Mancianti, F., Rum, A., Corazza, M., 2005. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 7, 141-145.

Ozawa, H., Okabayashi, K., Kano, R., Watari, T., Watanabe, S., Hasegawa, A., 2005. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia* 160, 159-162.

Paixão, G.C., Sidrim, J.J.C., Campos, G.M.M., Brilhante, R.S.N., Rocha, M.F.G., 2001. Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51, 568-573.

Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Messer, S.A., Tendolkar, S., Diekema, D.J., 2006. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 760–763.

Prado, M.R., Brito, E.H.S., Girão, M.D., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2004. Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. *Veterinary Microbiology* 100, 115-120.

Pressler, B.M., Vaden, S.L., Lane, I.F., Cowgill, L.D., Dye, J.A., 2003. *Candida* spp. urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. *The Journal of the American Animal Hospital Association* 39, 263-270.

Souza, W.A., Siqueira, A.M., 2003. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55, 262-265.

Velegraki, A., Alexopoulos, E. C., Kritikou, S., Gaitanis, G., 2004. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazol and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3589-35.

7 CAPÍTULO 2

Candidose na Medicina Veterinária: um Enfoque Micológico, Clínico e Terapêutico

Candidosis on Veterinary Medicine: a Mycological, Clinical and Therapeutic Approach

Periódico: Ciência Rural (Revisado em 19 de Setembro de 2008).

Candidose na Medicina Veterinária: um Enfoque Micológico, Clínico e Terapêutico

Candidosis on Veterinary Medicine: a Mycological, Clinical and Therapeutic Approach

Erika Helena Salles de Brito^{I,IV} Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle^I Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{II} Rossana de Aguiar Cordeiro^{II,III} José Júlio Costa Sidrim^{II} Marcos Fábio Gadelha Rocha^{I,II}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

O gênero *Candida* é composto por leveduras que vivem como comensais na microbiota de homens e animais. Em geral, não causam nenhum dano aos seus hospedeiros, entretanto, em virtude de desequilíbrios nas defesas química, física e imunológica, estes microrganismos podem se tornar patogênicos. Infecções por *Candida* spp. são pouco freqüentes na Medicina Veterinária, no entanto, nos últimos anos, tem sido observado aumento considerável de relatos de enfermidades causadas por estas leveduras, acometendo diferentes animais. Várias espécies do gênero são implicadas em quadros infecciosos, sendo a *C. albicans* a principal delas, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Considerando-se o potencial patogênico do gênero *Candida*, aliado ao surgimento de cepas resistentes a derivados azólicos, *in vitro*, o presente trabalho se propôs realizar detalhada revisão de literatura, abordando os aspectos clínico-laboratoriais, etiológicos e terapêuticos da candidose na Medicina Veterinária.

Palavras-chave: *Candida*, candidose, veterinária, derivados azólicos e resistência

^I Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – CE, Brasil.

^{II} Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Centro Especializado em Micologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

^{III} Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

^{IV} Autor para correspondência: Av. Rui Barbosa, 3333, Apt 201-C, Joaquim Távora, CEP: 60115-222. Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: sallesbrito@yahoo.com.br

ABSTRACT

The *Candida* genus is composed by yeasts that live as commensal on human and animals' microbiota. In general, they do not cause any damage to their hosts. However, due instability on chemical, physical and immunological defenses, these microorganisms can become pathogens. *Candida* spp. infections are rare on Veterinary Medicine. However, on the last years, a considerable raise of illness caused by these yeasts has been related on varied animal species. Several species of this genus has been mentioned as responsible for infectious diseases in animals, being *C. albicans* the main of them, followed by *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. Considering the pathogenic role of the genus *Candida*, allied to the emerging of resistant strains to the azole derivatives, *in vitro*, the present work proposed to perform a detailed review, approaching clinic-laboratorial, etiologic and therapeutic aspects of the candidosis on Veterinary medicine.

Key words: *Candida*, candidiasis, veterinary, azoles and resistance

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é composto por leveduras que vivem como comensais na microbiota de homens e animais. Em geral, não causam nenhum dano aos seus hospedeiros, entretanto, em virtude de distúrbios nas proteções física, química e imunológica, estes microrganismos podem se tornar patogênicos e causar enfermidades, denominadas candidoses (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004; SIDRIM & ROCHA, 2004; GARCIA et al., 2007).

Infecções por *Candida* spp. em animais são pouco freqüentes, no entanto, nos últimos anos, tem sido observado um aumento considerável de relatos de infecções por estas leveduras, com diferentes manifestações clínicas e acometendo variadas espécies animais (DUARTE et al., 2001; PRESSLER et al., 2003; LINEK, 2004; MORETTI et al., 2004; KUWAMURA et al., 2006; FULLERINGER et al., 2006; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

De acordo com a literatura, a *C. albicans* é a espécie mais freqüentemente envolvida em casos de candidoses em animais (VELASCO, 2000; MORETTI et al., 2004; JIN & LIN, 2005; JADHAV & PAL, 2006; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007). Outras espécies de *Candida*, no entanto, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, entre outras,

também são citadas como agentes de tais infecções (MUELLER et al., 2002; PRESSLER et al., 2003; OZAWA et al., 2005; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

Diferentes drogas antifúngicas são utilizadas para o tratamento de candidoses em animais, mas a atividade destas drogas vai depender da sensibilidade da cepa, tendo sido relatados alguns casos de cepas pouco sensíveis ou até resistentes a derivados azólicos (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005; VANDEPUTTE et al., 2005; BRITO et al., 2007; LASSA & MALINOWSKI, 2007).

Em virtude da escassez de informações sobre as características fenotípicas, moleculares, bem como do perfil de sensibilidade a drogas antifúngicas, de cepas de *Candida* spp. oriundas de animais, e levando-se em consideração o potencial patogênico do gênero *Candida* e o surgimento de cepas resistentes a derivados azólicos, *in vitro*, o presente trabalho se propôs realizar detalhada revisão de literatura, abordando os aspectos clínico-laboratoriais, etiológicos e terapêuticos da candidose na Medicina Veterinária.

Importância de *Candida* spp. na Medicina Veterinária

- Como Parte da Microbiota Animal

O isolamento de espécies de *Candida* a partir da microbiota de animais saudáveis, em especial os cães, é pouco relatado. Sabe-se, no entanto, que espécies do gênero habitam sítios como tubo digestivo, mucosas e pele de variados animais, incluindo muitos pássaros (CAFARCHIA et al., 2006). Dentre todas as *Candida* spp., a *C. albicans* é a mais presente, podendo ser isolada principalmente dos sistemas gastrointestinal, respiratório e genital, tendo predileção pela superfície de mucosas e áreas de junções mucocutâneas de animais de sangue quente (ELAD et al., 1998; FERREIRO et al., 2002; BRITO et al., 2007; JADHAV & PAL, 2006; GARCIA et al., 2007).

No Brasil, PAIXÃO et al. (2001), pesquisando fungos sapróbios em cães e gatos, relataram o isolamento de *Candida* spp. em 6,8% dos animais analisados. SOUSA & SIQUEIRA (2003) detectaram a presença de *C. albicans* no intestino de bovinos. Segundo esses autores, a presença desta levedura como sapróbio está condicionada a vários fatores, sendo o principal a presença de certas fontes de nutrientes.

Leveduras do gênero *Candida* também são encontradas como parte da microbiota do trato digestivo de diversas aves, tais como pombos, perus, aves de rapina, aves migratórias, aves industriais, entre outras (CAFARCHIA et al., 2006; FULLERINGER et al., 2006; CAFARCHIA et al., 2008). De acordo com CAFARCHIA et al., (2006) as aves transportam em sua cloaca leveduras potencialmente patogênicas sendo capazes de disseminar esses

fungos no ambiente, o que é um problema quando se trata de aves criadas em confinamento (FULLERINGER et al., 2006), vale salientar ainda que leveduras presentes na microbiota destes animais tem ganhando maior importância na micologia médica ao longo das duas últimas décadas, em particular a criptococose e candidose, relatadas com maior frequência, especialmente em pacientes imunocomprometidos (VELASCO, 2000). *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. inconspicua*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* são espécies já isoladas a partir de aves saudáveis (CARFACHIA et al., 2006; GARCIA et al., 2007).

É importante salientar que conhecer os microrganismos que vivem como sapróbios em homens e animais é essencial, visto que, havendo um desequilíbrio no binômio parasita-hospedeiro, eles podem tornar-se agentes responsáveis por infecções e, nestes casos, faz-se necessária a diferenciação entre um ser patogênico ou apenas constituinte da microbiota, e isto inclui as espécies de *Candida* que vivem como comensais (ELAD et al., 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

- Como Patógeno

As espécies de *Candida* que vivem como sapróbias apresentam potencial patogênico que pode se manifestar em decorrência de um desequilíbrio do binômio parasita-hospedeiro, resultante de alterações nos mecanismos de defesa do portador ou por comprometimento das barreiras anatômicas de proteção (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004; SIDRIM & ROCHA, 2004; WEIG & BROWN, 2007). Alguns fatores estão relacionados com esta característica de patogenicidade, tais como: capacidade de crescer a 37°C; pleomorfismo, cujo papel é importante nos processos iniciais de invasão tecidual; produção de alguns metabólitos, que podem desencadear manifestações alérgicas do tipo imediato e tardio; produção de adesinas e de enzimas hidrolíticas, tais como proteinases e fosfolipases, consideradas fatores importantes de virulência do gênero, sendo produzidas pelas mais variadas espécies de *Candida* (SIDRIM & ROCHA, 2004; KUMAR et al., 2006; CAFARCHIA et al., 2008).

Na Medicina Veterinária, são fatores predisponentes a infecções por *Candida*: idade, presença de doenças auto-imunes, *Diabetes mellitus*, uso de corticosteroide, antibioticoterapia, cateterismo venoso e urinário e administração de nutrição parenteral (VELASCO, 2000; HESELTINE et al., 2003; MORETTI et al., 2004; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007). Os sítios anatômicos mais acometidos são: pele, unhas, ouvido,

trato urinário, sistema gastrintestinal e reprodutor (HESELTINE et al., 2003; MORETTI et al., 2004; JIN & LIN, 2005; GARCIA et al., 2007; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

Enfermidades provocadas por *Candidas* geralmente acometem apenas animais imunocomprometidos (PRESSLER et al., 2003; HESELTINE et al., 2003) e em pequenos animais, como cães e gatos, não são muito descritas. Em casos de quadros cutâneos, este fato se justifica porque as lesões, na maioria das vezes, não são atribuídas a leveduras e sim a fungos filamentosos, bactérias e parasitas (RAPOSO et al., 1996). Por isso, MORETTI et al. (2004) chamam a atenção para a necessidade da realização de diagnóstico diferencial, associando o diagnóstico clínico ao laboratorial. Relatos de candidose em animais são descritos em diferentes partes do mundo, acometendo diversas espécies e com quadros clínicos variados (OCHIAI et al., 2000; DUARTE et al., 2001; MUELLER et al., 2002; PRESSLER et al., 2003; LINEK et al., 2004).

O primeiro relato de candidose, em cães, data de 1949, e se tratou de um caso de dermatomicose por *C. albicans* (REICH & NECHTOW, 1949). No Brasil, há relatos da presença de espécies do gênero, causando quadros de otite (DUARTE et al., 2001), infecção intestinal em bovinos (SOUZA & SIQUEIRA, 2003) e dermatomicose em cães (RAPOSO et al., 1996).

Candidoses são freqüentemente associadas com morbidade e mortalidade de aves, estas enfermidades têm como fatores predisponentes *stress*, idade, antibióticoterapia prolongada e status imune do animal (BALASUBRAMANIAM e SUKUMAR, 2007). A flora normal do trato gastrintestinal das aves tem efeito inibitório sobre o crescimento de *Candida* spp. assim, qualquer desequilíbrio da microbiota digestiva, pelo uso incorreto de antibióticos por exemplo, ou por mudanças no pH gastrintestinal pode resultar na proliferação de fungos (GARCIA et al., 2007). Dessa forma as *Candidas* são freqüentemente associadas com problemas gastrointestinais, principalmente em aves jovens, isso devido o sistema imune estar imaturo ou ao desenvolvimento incompleto das defesas gastrointestinais. Infecções sistêmicas, apesar de pouco freqüentes, também podem acontecer (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM e SUKUMAR, 2007; GARCIA et al., 2007; SCULLION e SCULLION, 2007).

O principal agente envolvido na candidose em aves é a *Candida albicans*. O desequilíbrio populacional dessas leveduras leva ao aparecimento da doença, principalmente no sistema digestivo, podendo acometer o sistema reprodutivo, olhos e tornar-se sistêmica (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM e SUKUMAR, 2007; GARCIA et al., 2007).

A inflamação da glândula mamária é o mais importante problema sanitário em rebanhos bovinos leiteiros. A incidência de mastite devido a *Candida* spp. é geralmente muito baixa em vacas leiteiras, no entanto KIVARIA & NOORDHUIZEN (2007) relatam que ao longo de 31 anos as mastites casadas por *C. albicans* aumentaram sua ocorrência de $\leq 1\%$ para $\geq 17\%$, vale salientar ainda que esta enfermidade apresenta impacto econômico negativo sobre a rentabilidade da pecuária mundial, tanto pela redução da produtividade quanto pelo aumento nos custos dos tratamentos.

De acordo com SANTOS & MARIN (2005) as *Candidas* constituem a terceira maior causa infecciosa de mastites no Brasil e várias podem ser as fontes de contaminação, tais como: pele e secreção das tetas, mãos de ordenhadores, máquinas de ordenha, instrumentos de tratamento, condições higiênicas do ambiente, alimentos, entre outras (KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007). MOTA et al. (1999) identificaram o ordenhador como a fonte de infecção de casos de mastite por *Candida* spp. em bovinos. De acordo com a literatura, a antibióticoterapia e infusão intramamária de antibióticos, muitas vezes aplicada sem análise microbiológica do leite, também são fatores predisponentes importantes para esta enfermidade (KRUKOWSKI et al., 2000; SANTOS & MARIN, 2005).

Diferentes espécies do gênero já foram relatadas, causando enfermidades em animais, tais como: *C. guilliermondii*, responsáveis por quadros de dermatomicoses em cães (MUELLER et al., 2002); *C. tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. krusei*, causando quadros diarréicos em bezerros (ELAD et al., 1998) e *C. parapsilosis*, agente de dermatomicose em cães (DALE, 1972). As espécies *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. zeulanoide*, *C. famata*, *C. kefyri*, *C. ciferrii*, *C. humicola*, *C. rugosa*, *Candida pelliculosis* e *C. tropicalis* já foram identificadas como agentes de mastite clínica e subclínica em bovinos (KRUKOWSKI et al., 2000; SANTOS & MARIN, 2005; KIVARIA & NOORDHUIZEN, 2007).

PRESSLER et al. (2003) isolaram espécies de *Candida*, causando infecção urinária em treze cães e sete gatos, entre as quais estavam: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. KOZAK et al. (2003) isolaram cepas de *Candida* spp., em especial *C. krusei*, em lesões superficiais na pele, em 5% de 100 cães analisados e, mais recentemente, OZAWA et al. (2005) isolaram *C. tropicalis* como agente de um quadro de cistite em um cão.

De acordo com a literatura, a *C. albicans* é a espécie mais comum em casos de candidoses em animais, sendo responsável por diversos quadros clínicos como otite (DUARTE et al., 2001), infecção intestinal (OCHIAI et al., 2000), septicemia (HESELTINE

et al., 2003), dermatomicose, infecção urinária, entre outros (RAPOSO et al., 1996; KOZAK et al., 2003; PRESLLER et al., 2003; MORETTI et al., 2004; JIN & LIN, 2005).

Casos de endoftalmite causados por *C. albicans* são ocasionalmente relatados em animais domésticos, e resultam da difusão hematogênica ou são secundários a uma inflamação primária da córnea pela levedura, com inoculação diretamente dentro do olho (GERDING et al., 1994; LINEK et al., 2004).

Apesar de serem tidas como oportunistas, KOZAK et al. (2003) isolaram espécies de *Candida* causando dermatomicose em animais jovens, livres de desordens imunológicas, destacando-se *C. albicans* e *C. krusei* dentre as espécies observadas. Ademais, BROWN et al. (2005) descreveram a presença de candidose sistêmica em um cão sem nenhuma deficiência imunológica aparente.

Com relação ao aspecto clínico das candidoses em pequenos animais, em cães e gatos acometidos por infecção urinária causadas por *Candida* spp., é possível observar quadros de disúria, hematúria, aumento da frequência de micção, anorexia, depressão e pirexia, sendo este último o principal sintoma (JIN & LIN, 2005).

As lesões clássicas em casos dermatomicoses por *Candida* spp. apresentam contorno irregular e são levemente edemaciadas, com vesículas, preferencialmente localizadas em áreas com dobras cutâneas, como: espaços interdigitais, prepúcio e região perianal. Pode haver, no entanto, a ocorrência de lesões com alopecia, crostas, úlceras e edema (MORETTI et al., 2004).

As otites por *Candida* apresentam a mesma sintomatologia daquelas causadas por outros microrganismos, como bactérias, ou seja, é possível observar a presença de inflamação, prurido, dor, descamação e edema (MOTA et al., 1999).

A candidose em aves caracteriza-se pelo aparecimento de placas esbranquiçadas, localizadas em geral no interior da cavidade bucal e, especialmente, no papo, pela formação de placas pseudomembranosas necróticas na cavidade oral e trato digestivo, presença de material caseoso que dificultam a deglutição e respiração. Penas arrepiadas, dificuldades de ingestão de alimentos, diarréia, dispnéia, anorexia, prostração, regurgitação, vômito, perda de peso, esofagite e espessamento da parede do esôfago são sintomas visíveis. Casos graves podem provocar deformidades no bico. Em casos de infecções sistêmicas, são observados sinais no sistema nervoso central, bem como lesões típicas de candidose gastrointestinal (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM & SUKUMAR, 2007).

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial das espécies do gênero *Candida* consiste, inicialmente, da confecção de lâminas com base na amostra clínica, com hidróxido de potássio (exame direto), que permite melhor visualização de estruturas fúngicas, ou através da coloração de Gram, bem como de posterior repique da mesma amostra em meios de cultura clássicos: ágar Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. Após o crescimento do fungo nos meios de cultura, são realizadas provas bioquímicas, nutricionais e morfológicas, adequadas para identificação das espécies do gênero (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Quando cultivadas, *in vitro*, em meios de cultura adequados, as *Candidas* crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37 °C (KOEHLER et al., 1999). Com relação à microscopia, se lâminas forem preparadas diretamente com um fragmento da colônia ou amostras clínicas positivas, apenas os blastoconídios serão visualizados.

Microcultivos em placa de Petri com *CornMeal*, acrescido de *Tween 80*, são realizados com o intuito de permitir melhor visualização da disposição das estruturas fúngicas típicas de cada espécie, sendo estes, na maioria das vezes, suficientes para identificar o microrganismo, por exemplo, cepas da espécie *C. albicans*, apresentam, no microcultivo, pseudo-hifas, hifas verdadeiras, blastoconídios formando cachos, bem como clamidoconídios terminais, características estas peculiares à espécie (RAPOSO et al., 1996; KOEHLER et al., 1999).

Na rotina laboratorial, diferentes testes são utilizados para diferenciar bioquimicamente as espécies de *Candida*, tais como: assimilação de nitrogênio e de carboidratos (auxonograma), fermentação de carboidratos (zimograma), prova da uréia e teste do tubo germinativo (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O auxonograma consiste na capacidade que uma levedura apresenta de crescer aerobiamente na presença de determinado carboidrato, fornecido como única fonte de carbono. Os seguintes carboidratos são utilizados: inulina, ramnose, L-arabinose, celobiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melibiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose.

As espécies do gênero *Candida* apresentam um perfil de assimilação de carboidratos diferente e a leitura é feita, durante 24 a 96 horas, mediante visualização de halos de crescimento que se formam em volta do carboidrato assimilado. Dessa forma, cepas de *C. albicans* apresentam resultado positivo para glicose, galactose, xilose, trealose e maltose e resultado variável para L-arabinose e sacarose. A *C. tropicalis* é capaz de assimilar glicose,

galactose, xilose, trealose e maltose, podendo assimilar ou não sacarose. Quanto a *C. parapsilosis*, esta assimila glicose, galactose, sacarose, maltose, trealose, xilose, arabinose e rafinose, sendo esta última variável (HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004).

No zimograma é avaliada a capacidade da levedura de fermentar determinado açúcar em baixas tensões de oxigênio. Uma suspensão da levedura é colocada em um tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido e um tubo de Durhan invertido. A positividade é dada pela produção de gás carbônico, que fica contido no interior do tubo de Durhan, formando bolhas visíveis. Geralmente, os carboidratos utilizados neste teste são dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose e trealose, mas outros podem ser empregados. Sabe-se que, de forma geral, a espécie *C. albicans* é capaz de fermentar glicose e maltose, e apresenta resultado variável para galactose e trealose; já cepas de *C. tropicalis* são positivas para glicose, galactose, trealose e maltose, podendo fermentar ou não sacarose. *C. parapsilosis* fermenta glicose e a galactose é variável (HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004). Nossa experiência em trabalhos realizados no Centro Especializado em Micologia Médica, com espécimes de origem animal, mostra que as espécies mais encontradas são *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, por este motivo foram descritos os principais aspectos fisiológicos das mesmas. Entretanto, para uma melhor compreensão do diagnóstico laboratorial de leveduras sugerimos uma leitura da obra “The Yeasts: a taxonomic study (1998)”, cujos autores são KURTZMAN & FELL.

Existem também métodos automatizados para identificação das principais espécies do gênero, os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor. São kits tais como API 20C Aux (bioMérieux-Vitek) e API 32C, que se baseiam na capacidade assimilativa de substratos bioquímicos e enzimáticos pelas leveduras (KOEHLER et al., 1999).

Meios de cultura cromogênicos para *Candida*, tais como o BBL™ CHROMagar *Candida*™ (Becton Dickinson) e ágar *Candida* ID2 (bioMérieux), facilitam bastante o diagnóstico de infecções por *Candida* spp., principalmente quando são candidoses sistêmicas (WEIG & BROWN, 2007).

Estratégias de Tratamento

Diferentes drogas antifúngicas são indicadas para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., não existindo, no entanto, uma terapêutica padronizada (NOBRE et al., 2002). Recentemente os triazólicos têm recebido maior destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, ambos com largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante

reduzidos, no entanto, devido sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Candida* (NOBRE et al., 2002). De acordo com OZAWA et al. (2005) a atividade destas drogas vai depender da sensibilidade da cepa em foco.

Em casos de infecção sistêmica por leveduras do gênero, acometendo diferentes espécies animais, a anfotericina B demonstra ser bastante eficiente. Estudos demonstraram boa atividade da droga, *in vitro*, contra cepas de *Candida* spp. isoladas de bovinos com mastite, no entanto, este é um fármaco pouco utilizado na rotina, em virtude do custo elevado e dos severos efeitos colaterais (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005). Outros fármacos indicados para o tratamento de vacas acometidas de mastite são o miconazol e clotrimazol, utilizados via intramamária, como também aplicação tópica de natamicina (NOBRE et al., 2002).

No que concerne à aplicação dos derivados azólicos, em casos de candidose superficial, um dos tratamentos indicados é o uso de cetoconazol duas vezes ao dia, associado com a utilização de xampu contendo clorexidina e miconazol, por um período de até seis semanas (MUELLER et al., 2002).

O cetoconazol apresenta espectro de atividade amplo, que engloba várias espécies de *Candida* e dermatófitos, no entanto, estudos relatam sua pouca eficiência, *in vitro*, contra cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans* (ROCHETTE et al., 2003; BRITO et al., 2007). Quando usado, tal fármaco pode resultar em uma série de efeitos colaterais, como: inapetência, diarreia, depressão e alopecia, além de ser hepatotóxico. Estes efeitos são observados principalmente em animais jovens (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005; BRITO et al., 2007).

Entre os derivados azólicos, utilizados para o tratamento de candidoses em pequenos animais, está também o fluconazol. De acordo com LINEK et al. (2004), este fármaco pode ser utilizado em cães para o tratamento de endoftalmite por *Candida*, devendo ser a primeira dose administrada por via oral e a segunda 24 horas depois. Apesar de bastante utilizado e apresentando bons resultados no tratamento contra candidoses, o fluconazol mostra-se impotente contra algumas espécies como: *C. krusei* e *C. glabrata* (VANDEN BOSSCHE et al., 2003; POSTERARO et al., 2006).

Em casos de infecção urinária causada por *Candida*, o itraconazol é um derivado azólico que pode ser utilizado, sendo administrado por via oral, uma vez ao dia, por até quatro semanas. Após este período, KANO et al. (2002) relataram que não mais observaram a presença de leveduras na urina de um cão com tal enfermidade. Esta droga é bastante eficiente

também em casos de candidoses sistêmicas e superficiais (ROCHETTE et al., 2003; OZAWA et al., 2005).

Uma preparação otológica contendo clotrimazol, que é um derivado imidazólico, é indicada para o tratamento de otites externas agudas e crônicas, em cães, causadas por fungos, incluindo *Candida* spp., sendo a utilização tópica de uma solução a 1% eficaz para o tratamento de otite externa por *C. albicans* (MOTA et al., 1999).

Para as aves acometidas de candidose é indicado tratamento com nistatina, vale salientar que por não ser absorvida no sistema gastrointestinal, este fármaco precisa agir por contato direto com as lesões. Em casos de candidose refratária recomenda-se a utilização de antifúngicos sistêmicos, tais como: itraconazol, fluconazol ou anfotericina B (VELASCO et al., 2000; BALASUBRAMANIAM & SUKUMAR, 2007).

Teste de Sensibilidade a Antifúngicos

Por muito tempo apenas estudos de sensibilidade a antibacterianos foram desenvolvidos e nenhuma atenção era voltada para a resistência a antifúngicos, entretanto, nos últimos anos, aumenta o interesse pela busca do perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas fúngicas (PEREA et al., 2001).

Com esse intuito, em 1997, o *Clinical and Laboratory Standards Institut* (CLSI) (antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) aprovou os testes de micro e macrodiluição em caldo para testar a sensibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes, por meio do documento M27-A, sendo este revisto em 2002 (M27-A2). Desta forma, parâmetros foram determinados para variáveis como: tamanho do inóculo, temperatura, duração de incubação, meio de cultura e critério de leitura.

Existe também um método comercial para testar a sensibilidade de cepas fúngicas, é o E-test[®], que consistem em uma fita plástica contendo fármaco em diferentes concentrações, expressas no reverso da tira. Este teste reúne a vantagem da simplicidade de métodos baseados na difusão em ágar, já que este é seu princípio, com as informações quantitativas fornecidas pelos métodos da diluição, dessa forma o E-test[®] poderia ser uma alternativa para a triagem de casos de rotina pela sua simplicidade, no entanto, padronizações ainda precisam ser estabelecidas para que este possa se tornar uma alternativa para a metodologia preconizada pelo CLSI (KOGA-ITO et al., 2008).

Apesar da metodologia já estabelecida, poucos são os trabalhos que testam a sensibilidade, *in vitro*, de cepas de *Candida* spp. isoladas de animais. OZAWA et al. (2005) utilizaram a técnica de microdiluição em caldo para testar a sensibilidade, *in vitro*, de uma

cepa de *C. tropicalis*, isolada da urina de um cão com cistite, a drogas como itraconazol e fluconazol, tendo sido a cepa sensível ao itraconazol, no entanto, apresentou valores elevados de sensibilidade para fluconazol.

BRITO et al. (2007) realizaram testes de sensibilidade, *in vitro*, com cepas de *Candida* spp. isoladas de cães e identificaram presença de resistência aos derivados azólicos: cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados foram os seguintes: para itraconazol e cetoconazol foi maior que 16 µg/mL para todas as cepas de *C. albicans* e 66,7% das *C. tropicalis*; o fluconazol apresentou CIM > 64 µg/mL para 80% das cepas de *C. albicans* e 66,7% das cepas de *C. tropicalis*.

A padronização de métodos de testes de sensibilidade *in vitro* se faz cada vez mais necessária, o que poderá tornar a escolha da terapêutica sempre mais adequada e eficiente. Além disso, é uma importante ferramenta para vigilância e monitoramento de cepas resistentes (BRITO et al., 2007).

Resistência Antifúngica

A resistência aos antifúngicos pode ser classificada de duas formas: resistência *in vitro* e resistência *in vivo*. A resistência *in vitro* pode ser subdividida ainda em resistência *in vitro* primária, chamada também de intrínseca ou inata, que se apresenta naturalmente no microrganismo; e resistência *in vitro* secundária, que aparece quando o microrganismo inicialmente sensível se faz resistente (BALKIS et al., 2002; SANGLARD & ODSS, 2002; VANDEPUTTE et al., 2005). A resistência *in vivo* ocorre em virtude de fatores diferentes, como: farmacocinética da droga antifúngica, fatores dependentes do hospedeiro (estado imune, doenças de base, entre outros) e fatores relacionados ao microrganismo, como virulência e resistência (BALKIS et al., 2002).

Diversos são os relatos de cepas de *Candida*, isoladas de humanos, resistentes, *in vivo* e *in vitro*, a fármacos antifúngicos, principalmente a derivados azólicos, sendo as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* as mais citadas (PEREA et al., 2001; SANGLARD & ODSS, 2002; POSTERARO et al., 2006). Recentemente, cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, oriundas de animais, apresentaram resistência, *in vitro*, a fluconazol, cetoconazol e itraconazol (OZAWA et al., 2005; BRITO et al., 2007).

Diferentes mecanismos são citados como responsáveis pela resistência que certas cepas de *Candida* apresentam aos derivados azólicos, tais como: pontos de mutação no gen *ERG11*, responsável pela produção da enzima 14 α -demethylase (VANDEPUTTE et al.,

2005), bem como redução da permeabilidade da membrana a tal grupo de fármacos (PEREA et al., 2001).

Pontos de mutação no gen *ERG11* e falha no acúmulo de antifúngicos azólicos têm sido identificados como as principais causas de resistência em isolados fúngicos pouco sensíveis a tais drogas. VANDEPUTTE et al. (2005) detectaram a superexpressão de gens responsáveis pelas bombas de efluxo em cepas de *C. tropicalis*, e, segundo os autores, a resistência nesta espécie pode ser induzida facilmente.

Modificações na interação da droga com a enzima-alvo também são citadas como causa de resistência em cepas fúngicas. Mutações desse gênero são descritas em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. ASAI et al. (1999) demonstram com seus resultados que este tipo de mutação acarreta em uma não-perturbação da atividade da 14 α -demetilase pelo antifúngico, permitindo a mutantes a capacidade de produzir ergosterol normalmente.

PEREA et al. (2001) investigaram mecanismos moleculares, que resultam na resistência a azólicos, em cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol. Sua análise confirmou uma natureza multifatorial na resistência a tal fármaco, com a predominância de mecanismos como a “superexpressão” de gens que codificam as bombas de efluxo, detectada em 85% das cepas resistentes analisadas. Mutações como a substituição do aminoácido funcional e a superexpressão do gen, que codifica a enzima-alvo da droga, foram detectadas em 65 e 35% dos isolados, respectivamente. Em 75% dos isolados havia múltiplos mecanismos combinados.

Biologia Molecular no Estudo das Candidoses

Avanços obtidos na área da Biologia Molecular permitiram o desenvolvimento de métodos moleculares, extremamente eficientes, para identificação de espécies e subespécies do gênero *Candida*, bem como para o monitoramento da emergência de cepas resistentes a antifúngicos, já que a avaliação genética é uma prova útil para definir os efeitos das drogas antifúngicas na célula fúngica e mecanismos de adaptação destas aos antifúngicos (CIRAK et al., 2003).

A análise molecular pode contribuir para melhor entendimento da patogenicidade deste grupo de microrganismos, bem como a tipificação de cepas pode fornecer informações sobre a origem e mecanismos de transmissão, estabelecer relação entre isolados e suas propriedades de virulência (WEIG & BROWN, 2007).

O PCR (*Polymerase chain reaction*) foi uma das primeiras técnicas descritas para tais aplicações, sendo muito eficiente na distinção de espécies de *Candida*. Outras técnicas, porém, surgiram com objetivo de potencializar a eficiência do PCR na identificação de microrganismos, como o RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*), RFLP (*Restriction Fragment length polymorphism*), entre outras. Todas são utilizadas de forma eficiente na identificação de espécies do gênero *Candida* (CIRAK et al., 2003).

A aplicação de adventos moleculares para a Medicina Veterinária é muito escassa, e poucos são os relatos da utilização de tais técnicas para estudos epidemiológicos, identificação e caracterização de espécies de *Candida*, isoladas de animais. Trabalhos como de KANO et al. (2002) e MORETTI et al. (2004) chamam atenção para este fato, os autores aplicaram técnicas moleculares distintas para identificação de cepas de *Candida*, agentes de infecções em animais. KANO et al. (2002) identificaram uma cepa de *C. albicans* e uma de *C. parapsilosis*, provenientes da urina de cães com infecção urinária, pela análise do DNA ribossomal por PCR. Já MORETTI et al. (2004) optaram por uma reação de PCR-REA (*Restriction Enzyme Analysis*), mediante a qual identificaram uma cepa de *C. albicans* responsável por um quadro de dermatomicose em um cão. Vale salientar que EDELMANN et al. (2005), em uma análise filogenética, concluíram que isolados de *C. albicans* oriundos de humanos e de animais não apresentaram nenhuma distinção e que os animais podem ser considerados possíveis vetores destes microrganismos para seres humanos, principalmente imunocomprometidos.

Diversos autores incentivam o diagnóstico, por Biologia Molecular, de infecções invasivas por *Candida*, diretamente da amostra clínica, tais como sangue, soro, plasma, frascos de cultura de sangue, líquidos corporais e amostras de tecido (KLINGSPOR & JALAL, 2006). O método de PCR, entretanto, é sensível para reações cruzadas com contaminantes, resultando em falso-positivos. Outros problemas metodológicos incluem a rígida parede celular de *Candida* spp., a presença de um baixo número de leveduras circulantes durante infecção sistêmica e *Candidas* provenientes da microbiota que podem estar contaminando a amostra clínica. Estes fatores, juntamente com a ausência de padronização para seleção e manipulação de amostras clínicas, extração de DNA e detecção do DNA-alvo, conduzem a resultados divergentes. Como consequência, os resultados moleculares não são reconhecidos e não há consenso no que diz respeito aos critérios para diagnóstico (WEIG & BROWN, 2007).

CONCLUSÕES

Com base no crescente aumento da casuística de candidose na Medicina Veterinária, em especial na clínica de cães e gatos, e sabendo-se que os isolados de *Candida* spp. oriundos de humanos e de animais não apresentam distinção genotípica, e ainda considerando-se que algumas cepas de *Candida* spp., isoladas de cães, têm se mostrado resistentes aos derivados azólicos, faz-se necessária maior vigilância epidemiológica, visando a manutenção da saúde animal, bem como o bem estar de seres humanos, uma vez que os animais podem ser considerados vetores em potencial destes microrganismos para o homem.

REFERÊNCIAS

- ASAI, K. et al. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14 α -demethylase P450. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1163-1169, 1999.
- BALASUBRAMANIAM, A.; SUKUMAR, S. An overview on outbreaks of candidiasis in poultry. **Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences**, v.3, n.3, p.121-123, 2007.
- BALKIS, M. M. et al. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, v.62, p.1025-1040, 2002.
- BRITO, E. H. S. et al. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v.174, p.147-153, 2007.
- BROWN, M. R. et al. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.272-276, 2005.
- CAFARCHIA, C. et al. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, v.44, p.485-492, 2006.
- CAFARCHIA, C. et al. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Medical Mycology**, v.46, p.1-6, 2008.

CIRAK, M. Y. et al. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.1027-1032, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institut (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A2. Wayne, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

DALE, J. E.. Canine dermatosis caused by *Candida parapsilosis*. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, v.67, p.548-549, 1972.

DUARTE, E. R. et al. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.48, p.631-635, 2001.

EDELMANN, A. et al. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.6164–6166, 2005.

ELAD, D. et al. Yeasts in the gastrointestinal tract of reweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v.141, p.7-14, 1998.

FERREIRO, L. et al. Associações entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FELV), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.3, p.179- 183, 2002.

FULLERINGER, S. L. et al. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. **Poultry Science**, v.85, p.1875–1880, 2006.

GARCIA, M. E. et al. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n.10, p.464–470, 2007.

GERDING, P. A. et al. Ocular and disseminated candidiasis in an immunosuppressed cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, p.1635-1638, 1994.

HESELTINE, J. C. et al. Systemic candidiasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, p.821-824, 2003.

HIRAI, A., KANO, R., MAKIMURA, K., DUARTE, E.R., HANDAM, J.S., LACHANCE, M.A., YAMAGUCHI, H., HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.54, p.623-627, 2004.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed. Baarn/Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultuur/Universitat Rovira i Virgili, 2000.

JADHAV, V. J.; PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.23, p.233-234, 2006.

JIN, Y.; LIN, D. Fungal Urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001-2004). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.41, p.373-381, 2005.

KANO, R. et al. Detection and identification of the *Candida* species by 25S ribosomal DNA analysis in the urine of candidal cystitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.115-117, 2002.

KIVARIA, F. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. **The Veterinary Journal**, v.173, p.617-622, 2007.

KLINGSPOR, L.; JALAL, S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p.745-753, 2006.

KOEHLER, A. P. et al. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.422–426, 1999.

KOGA-ITO, C. Y. et al. Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n1, p7-10, 2008.

KOZAK, M. et al. Study of the dermatophytes in dogs and the risk of human infection. **Bratisl Lek Listy**, v.104, p.211-217, 2003.

KUMAR, C. P. et al. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v.161, p.213-218, 2006.

KRUKOWSKI, H. et al. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin. **Mycopathologia**, v.150, p.5–7, 2000.

KURTZMAN, C. P.; Fell, J. W. **The Yeasts: a taxonomic study**. Elsevier Science, Amsterdam, 4^a ed. 1998.

KUWAMURA, M. et al. Systemic candidiasis in a dog, developing spondylitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, p.1117-1119, 2006.

LASSA, H.; MALINOWSKI, E. Resistance of yeasts and algae isolated from cow mastitic milk to antimicrobial agents. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, p.575-578, 2007.

LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, p.159-162, 2004.

MORETTI, A. et al. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.21, p.139-142, 2004.

MOTA et al. 1999. Bovine mastitis caused by *Candida* sp.: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, n.2, p.101-103, 1999.

MOTA, R. A. et al. Eficácia do otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica de cães. **Vet News**, 1999. Online. Disponível na Internet www.schering-plough.com.br.

MUELLER, R. S. et al. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **Veterinary Record**, v.150, p.728-730, 2002.

NOBRE, M. O. et al. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v.32, p.175-184, 2002.

OCHIAI, K. et al. Intestinal candidiasis in a dog. **Veterinary Record**, v.146, p.228-229, 2000.

OZAWA, H. et al. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. **Mycopathologia**, v.160, p.159-162, 2005.

PAIXÃO, G. C. et al. Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, 2001.

PEREA, S. et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2676–2684, 2001.

POSTERARO, B. et al. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3046-3047, 2006.

PRESSLER, B. M. et al. *Candida* spp urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. **The Journal of the American Animal Hospital Association**, v.39, p.263-270, 2003.

RAPOSO, B. R. et al. Candidíase cutânea em um canino. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.2-3, p.11-14, 1996.

REICH, W. J.; NECHTOW, M. J. Canine genital moniliasis as a source of reinfection in the human female. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p.141:991, 1949.

ROCHETTE, F. et al. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, p.31–53, 2003.

SANGLARD, D.; ODSS, F. C. Resistance on *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.73-85, 2002.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.251–253, 2005.

SCULLION, F. T.; SCULLION, M. G. Pathologic findings in racing pigeons (*Columba livia domestica*) with “Young Bird Sickness”. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.21, n.1, p.1–7, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan , Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

SOUZA, W. A.; SIQUEIRA, A. M. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, 2003.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, p.5–29, 2003.

VANDEPUTTE, P. et al. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.11, p.4608–4615, 2005.

VELASCO, M. C. Candidiasis and Cryptococcosis in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n.2, p.75-81, 2000.

WEIG, M.; BROWN, A. J. P. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. **Trends in Microbiology**, v.15, p.310-317, 2007.

8 CAPÍTULO 3

PCR-AGE, métodos automatizado e manual para identificação de cepas de *Candida* de origem veterinária: uma abordagem comparativa.

PCR-AGE, automated and manual methods to identify Candida strains from veterinary sources: a comparative approach.

Periódico: *Veterinary Microbiology* (Artigo Submetido).

Fator de impacto: 2.010

Veterinary Microbiology

PCR-AGE, automated and manual methods to identify *Candida* strains from veterinary sources: a comparative approach.

Erika H. S. Brito ^{a,*}, Raquel O. S. Fontenelle ^b, Luciana M. Melo ^a, Erica S. Albuquerque ^a, Raimunda S. N. Brilhante ^b, Rossana A. Cordeiro ^{b,c}, José J. C. Sidrim ^b, Marcos F. G. Rocha ^{a,b}

^a School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza – CE, Brazil.

^b Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

^c Department of Biology, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

* **Corresponding author: E. H. S. Brito.** Rua Professor Francisco Gonçalves, 2630; Dionísio Torres. **CEP:** 60.115-191. Fortaleza, CE, Brazil. **Phone:** 55 (85) 33668594. **E-mail:** sallesbrito@yahoo.com.br

Resumo

O aumento na incidência de candidíases tem chamado a atenção de cientistas e clínicos para a necessidade de métodos diagnósticos mais rápidos e eficientes. No presente estudo, o método de PCR seguido por eletroforese em gel de agarose (PCR-AGE), bem como técnicas de identificação manual e automatizada (VITEK 2), foram utilizadas para identificar um total de 30 cepas fúngicas oriundas de cães. As amostras foram obtidas a partir de casos de dermatomicoses e otite externa, bem como de ouvido saudável, mucosas oral e vaginal, prepúcio e região perianal. Após identificação pelo método manual tradicional, as cepas foram reidentificadas utilizando o VITEK e PCR-AGE. Isolados de *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 10231 foram utilizados como controle. Os primers universais ITS1, ITS3 and ITS4 foram utilizados. Dos 30 isolados de levedura avaliados, 3 (10%) foram incompletamente ou não identificados pelo método fenotípico manual, no entanto, foram identificados pelo PCR-AGE e VITEK (1 como *Saccharomyces cerevisiae*, 1 como *C. rugosa*, e 1 como *C. parapsilosis*). Os resultados revelaram 96,7 % e 86,7 % de concordância entre PCR-AGE e VITEK versus método fenotípico manual, respectivamente. O método de PCR-AGE mostrou um grande percentual de concordância com o método fenotípico manual, bem como, apresentou maior rapidez e sensibilidade quando comparado aos demais métodos, podendo, portanto, ser indicado para testes de rotina para diagnóstico de cepas de *Candida* spp. de origem veterinária.

Palavras-chave: *Candida*, identificação, VITEK, PCR-AGE, ITS, cães.

Abstract

The increasing incidence of candidiasis has drawn the attention of scientists and clinicians attempting to improve methods of studying *Candida* yeasts. PCR amplification followed by agarose gel electrophoresis (PCR-AGE) and the manual and VITEK 2 automated methods were used to test a total of 30 fungal strains from dog sources. The strains were obtained from cases of dermatitis, otitis externa and from ears, oral mucosa, vaginal mucosa, prepuce and perianal region of clinically normal dogs. After identification as *Candida* yeasts by the traditional manual method, the strains were recharacterized using the VITEK method and PCR-AGE. Isolates of *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 and *C. albicans* ATCC 10231 were included as controls. The universal primers ITS1, ITS3 and ITS4 were used. Of 30 yeast isolates, 3 isolates (10.0%. 1 isolate as *Saccharomyces cerevisiae*, 1 as *C. rugosa* and 1 as *C. parapsilosis*) that were incompletely identified by the traditional phenotypic method were identified with the PCR-AGE and VITEK methods. The results revealed a 96.7 % and 86.7 % concurrent identification between PCR-AGE and VITEK methods versus the manual method, respectively. PCR-AGE showed a greater level of concordance with the traditional method, besides being more rapid and sensitive the other methods examined, and is therefore indicated for routine diagnostic testing of *Candida* spp. strains of veterinary origin.

Keywords: *Candida*, identification, VITEK method, PCR-AGE, ITS, dog.

1. Introduction

Candida spp. are common components of the surface microbiota of humans and animals. They inhabit external and internal moist surfaces, such as the skin, ear canal, conjunctival sac, mouth, digestive tract, perianal region, and genital and oral mucosa (Cleff et al., 2005; Jadhav & Pal, 2006; Brito et al., 2007; Suchodolski et al., 2008). In humans, Brazilian studies have reported that *Candida albicans* is the main species implicated in infections (Antunes et al., 2004). Among the non-*albicans* species, *Candida tropicalis* is considered an important pathogen of onychomycosis in the fingernails, and *Candida parapsilosis* is the main isolated agent in candidemia episodes (Brilhante et al., 2005; Medrano et al., 2006).

Some reports have shown that *Candida* spp., mainly *C. albicans*, are important pathogens in small animals (Brito et al., 2007), being associated with urinary infections (Ozawa et al., 2005), endophthalmitis (Linek, 2004), cutaneous lesions (Cleff et al., 2007) and systemic infections (Brown et al., 2005).

Early detection of infection has a great impact on the clinical outcome of many infectious diseases. Morphological features and biochemical tests useful for identifying isolated fungi may take days to weeks to develop in culture, and the evaluation of these test results requires expertise in mycology (Oliveira et al., 2006). Two commercial methods used to identify yeasts, the API and VITEK systems, require 2 to 3 days before biochemical reactions can be interpreted. However, their databases are limited (Silva & Candido, 2005; Oliveira et al., 2006). The speed and sensitivity of PCR make it an ideal choice for a rapid differentiation system (Massonet et al., 2004). A more broadly applicable approach is based on PCR with universal fungal primers (directed towards conserved regions in the ribosomal region) and followed by either restriction analysis (Moretti et al., 2004), sequencing

(Massonet et al., 2004) or size determination of the amplified fragment(s) (Fujita et al., 2001; Bockelmann et al., 2008)

The goal of this study was to use a comparative approach to evaluating manual, automated and PCR-based methods in the identification of *Candida* strains from veterinary sources.

2. Material and Methods

2.1 Yeast strains

A total of 30 yeast strains obtained from cases of dermatitis, otitis externa and from ears, oral mucosa, vaginal mucosa, prepuce and perianal region of clinically normal dogs, were used in this study. The isolates were obtained from primary cultures, and one colony of each different manual phenotype was selected. This survey phase was performed at the Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Brazil. American Type Culture Collection (ATCC) strains of *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258) and *C. albicans* (ATCC 10231) were also included as quality controls.

2.2. Manual and automated phenotypic analysis

The yeast strains were identified according to their morphological characteristics, biochemical profile and growth in CHROMagar-Candida® (Paris, France). To determine the micromorphology, plates containing cornmeal-Tween 80 agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) were streaked and stabbed with a 48-h-old yeast colony and then incubated at room temperature (25 °C) for 3 to 5 days to promote the production of chlamydo spores, hyphae and pseudohyphae. Biochemical tests were performed by the assimilation method on a yeast nitrogen base (Difco Laboratories, Detroit, USA) containing 2% agar, using disks impregnated with various carbohydrates. Noticeable growth around the disks, after 48 h of

incubation at 37 °C, indicated assimilation of the respective carbohydrate sources. Fermentation of sugars was performed by adding 200 µl of 48-h culture suspensions to tubes of fermentation broth, containing 2% solutions of each sugar. A positive result was indicated by the production of acid and gas after 14 days (Gautret et al., 2000; De Hoog et al., 2000). Strains identified as *Candida* spp., as well as incompletely identified or unidentified strains, were submitted to the VITEK 2 automated system (BioMérieux Vitek, Hazelwood, France) and PCR-AGE analysis.

2.3. DNA extraction

Prior to DNA isolation, yeast organisms were grown on potato dextrose agar plates (Difco Laboratories, Detroit, USA) for 24-48 h at 37°C. The cells were suspended in 500 µl of sterile water and quantified using a Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). A total of 2×10^8 cells were recovered by centrifugation at 4,500 g for 2 min and resuspended in 200 µl of buffer 1 (2% Triton X 100, 1% SDS, 10 mM Tris/HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). Finally, 200 µl phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) and 300 µg glass beads were added. After shaking samples for 4 min, 200 µl of buffer 2 were added (10 mM Tris/HCl (pH 8), 1 mM EDTA). Samples were centrifuged (13,000 g) for 5 min, and the extracted DNA in the supernatant was precipitated by the addition of ethanol (1 ml) and centrifuged at 13,000 g for 2 min. The pellet was resuspended in 400 µl of buffer 2, and RNA was removed by the addition of 30 µl RNase (1 mg/ml) and incubation for 5 min at 37 °C. The reaction was stopped with 10 µl ammonium acetate (4 M) and the DNA again precipitated as above. The pellet was air-dried and dissolved in 50 µl of buffer 2. The yield of DNA was determined spectrophotometrically using a Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) (Ausubel et al., 2002).

2.4. PCR-AGE procedure

The primer sequences used for universal fungal amplification were described by Fujita et al. (2001). Primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3'), ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'), and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), targeting the conserved regions of 18S, 5.8S, and 28S rDNAs, respectively, were used for amplification. The ITS1-ITS4 primer pair was used to amplify the intervening 5.8S rDNA and the adjacent ITS1 and ITS2 regions, and the ITS3-ITS4 primer pair was used to amplify a large portion of 5.8S rDNA and the adjacent ITS2 region. PCR amplification was performed with a volume of 10 μ l. One microliter of each sample was added to the PCR master mixture, which consisted of 1 μ l of 10 \times PCR buffer, 0.4 μ l of 50 mM MgCl₂, 0.2 μ l of a deoxynucleoside triphosphate mixture (10 mM of each dNTP), 1 μ l of 2 μ M of each primer, and 0.1 μ l of 5 U/ μ l Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), with the remaining volume consisting of distilled water. Amplification consisted of an initial denaturation at 94°C for 4 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 6 min. PCR was performed in a Mastercycler Eppendorf S thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Negative control reactions without any template DNA were carried out simultaneously.

Gel electrophoresis with 1.5% agarose gels was conducted with 1X TBE buffer (0.1 M Tris, 0.09 M boric acid, 1 mM EDTA) at 5 V/cm for 2 h. A 100-bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) was run concurrently with amplicons for sizing of the bands. Gels were stained with ethidium bromide-TBE solution for 10 min and then photographed. The computer program ImageQuant TL (Amersham Biosciences Corp) was used to calculate molecular sizes. Fragment sizes were measured three times for each strain on different gels.

3. Results

Complete fungal identification by manual morphologic and metabolic characteristics took about 14 days. On the other hand, for automated VITEK identification, 24 to 48 h were required. In comparison, the PCR-AGE method involved 1.5 h for DNA isolation, 1.2 h for PCR amplification, 2.3 h for AGE, and 30 min for staining and fragment analysis. Therefore, the time required for yeast identifications by PCR-AGE was about 5.5 h.

Table 1 summarizes the results of the manual, VITEK and PCR-AGE strain identifications. Table 2 shows the sensitivity of the three methods used to identify yeasts. In brief, the best results were observed with the PCR-AGE (96.96%) and manual (90.9%) methods.

According to PCR-AGE analysis, six patterns were recognized among the 33 fungal strains on the basis of differences in the lengths of one or two fragments of amplicons (Figure 1). Amplification of all yeasts tested with ITS1 and ITS4 primers yielded fragments ranging from 415 to 838 bp, while ITS3 and ITS4 primers yielded fragments of 271 to 420 bp. The standard deviations (SDs) of the calculated molecular sizes ranged from 2.20 to 3.50 with the ITS1-ITS4 primers and from 2.11 to 2.43 with the ITS3-ITS4 primers, and are shown in Table 3.

Table 1. Comparison of the manual, automated VITEK 2 and PCR-AGE methods in the identification of *Candida* spp. from dogs.

Registration number	Origin	Manual	VITEK 2	PCR-AGE
CEMM 13068	otitis externa	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 13069	ear	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 13074	ear	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 13075	ear	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 13077	ear	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 32023	oral mucosa	<i>C. parapsilosis</i> (?) ^a	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>
CEMM 32024	oral mucosa	<i>C. parapsilosis</i> (?) ^a	<i>C. parapsilosis</i> / <i>C. famata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32025	perianal region	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 32030	vaginal mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32031	prepuce	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> / <i>C. neoformans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32032	perianal region	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> / <i>C. famata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32033	perianal region	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
CEMM 32035	vaginal mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32044	vaginal mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32045	perianal region	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32051	oral mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32052	perianal region	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32053	perianal region	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32054	perianal region	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 12078	otitis externa	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
CEMM 12081	otitis externa	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
CEMM 32026	vaginal mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 32027	oral mucosa	Unidentified	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
CEMM 32029	vaginal mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> / <i>C. famata</i>	Unidentified
CEMM 32034	otitis externa	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
CEMM 32047	oral mucosa	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
CEMM 32048	prepuce	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
CEMM 32049	perianal region	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
CEMM 32050	vaginal mucosa	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CEMM 12063	dermatitis	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> / <i>C. neoformans</i>	<i>C. tropicalis</i>
ATCC 22019	-	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
ATCC 6258	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
ATCC 10231	-	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

^aunexpected biochemical profile

Table 2. Sensitivity of manual, VITEK 2 and PCR-AGE methods used to yeast identifications.

Method	Complete identification (%)	Non-conclusive Identification (%) ^a	Unidentified (%)
Manual	90.9 (30/33)	6.06 (2/33)	3.03 (1/33)
VITEK 2	84.84 (28/33)	15.15 (5/33)	-
PCR-AGE	96.96 (32/33)	-	3.03 (1/33)

^a Yeast with atypical biochemical profile.

Table 3. PCR-AGE fragment lengths of *Candida* species from dogs.

Organism (n°. of strains)	Mean of fragment size (\pm SD), in bp, found by PCR-AGE with the following primer pairs:	
	ITS1-ITS4	ITS3-ITS4
<i>C. albicans</i> (8)	536 \pm 3.36	337 \pm 2.11
<i>C. tropicalis</i> (7)	522 \pm 2.20	331 \pm 2.11
<i>C. parapsilosis</i> (14)	519 \pm 3.50	312 \pm 2.43

C. rugosa, *C. krusei* and *S. cerevisiae* were not included because only one strain of each was found.

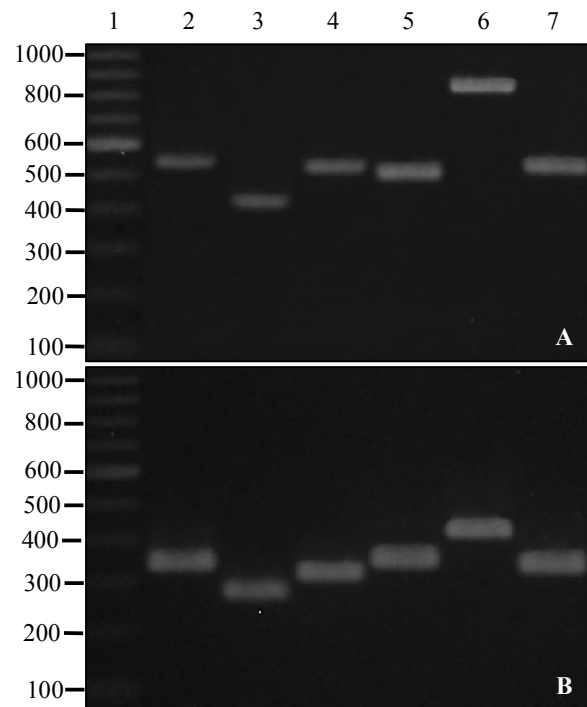


Figure 1. Gels showing amplification by PCR-AGE and length variation in the ITS regions of *Candida* isolates from dogs. Lane 1: 100-bp DNA ladder; lane 2: *C. albicans*; lane 3: *C. rugosa*; lane 4: *C. parapsilosis*; lane 5: *C. krusei*; Lane 6: *S. cerevisiae*; lane 7: *C. tropicalis*. **A.** ITS1-ITS4. **B.** ITS3-ITS4.

4. Discussion

Despite the importance of *Candida* infections in small animals, few studies provide information about their phenotypic and molecular features (Edelmann et al., 2005). Brito et al. (2007) conducted phenotypic studies and established the phenotypic characteristics and drug sensitivity profiles of *Candida* spp. strains isolated from dogs. This study showed evidence of the presence of some strains resistant to azole derivatives. With respect to genotypic analysis of *Candidas* of veterinary origin, in general, this is limited to isolated cases (Kano et al., 2002; Moretti et al., 2004; Moretti et al., 2006; Suchodolski et al., 2008). Edelmann et al. (2005) reported that *C. albicans* originating from humans and animal are genetically similar. More recently, a research, based on strain typing by DNA fingerprinting, showed that *C. albicans* from animals show a trend towards genetic separation from isolates that colonize and infect humans, while still maintaining some common traits (Jacobsen et al., 2008).

The clinical impact of infections by yeast species such as *Candida* spp. has increased, especially in immunocompromised patients (Antunes et al., 2004; Brown et al., 2005). Poor vitamin intake has also been considered responsible for decreased human and animal immunological responses, as has the use of antibiotics in animal feed, which increases the occurrence of candidiasis in large and small animals (García & Blanco, 2000). Several non-*albicans Candida* spp. are inherently less susceptible to commonly used antifungal drugs, and their early identification is essential for rapid initiation of empirical treatment (Oliveira et al., 2006; Brito et al., 2007; Kalkanci et al., 2007). Other yeasts, such as *S. cerevisiae*, have emerged as opportunistic pathogens, and clinicians are increasingly in need of a method that is capable of the rapid identification of a wide variety of fungi (Posteraro et al., 2000).

The diagnosis of candidiasis is mainly carried out by manual phenotyping. However, the delay in the identification of *Candida* spp. by biochemical and culture procedures has led

to a search for more rapid differentiation techniques. Other methods for the diagnostic identification of *Candida* spp. include automated methods such as VITEK and techniques based on PCR (Fujita et al., 2001; Massonet et al., 2004; Oliveira et al., 2006). However, these techniques are not usually utilized in routine tests in the veterinary laboratory, because they require specialized instrumentation and extensive validation in clinical studies. On the other hand, the speed and sensitivity of PCR-based methods makes it an ideal choice for a rapid differentiation system (Massonet et al., 2004). Therefore, the aim of the present study was to compare the results obtained by PCR-AGE and the automated method VITEK 2, in the identification of strains of *Candida* spp. of veterinary origin, with those obtained from the manual phenotypic method.

In relation to the time of execution of each method, we found that PCR-AGE is the most rapid compared to others. In addition, the results for yeast identification obtained by PCR-AGE showed a high percentage of agreement with those obtained with the traditional phenotypic method. It is important to emphasize that 3 of 33 strains had non-conclusive identification or unidentified with the manual phenotypic method. Thus, these strains were not included in the comparison between the VITEK or the PCR-AGE *versus* manual method. Thus, the following results were observed: respective concurrence rates of 86.7% (26/30) and 96.7% (29/30) for VITEK and PCR-AGE identifications relative to the manual method. Additionally, the concurrence for all three methods was 86.7% (26/30).

The CEMM 32023, CEMM 32024 and CEMM 32027 strains had non-conclusive identification or were regarded as unidentified with the manual phenotypic method. The PCR-AGE method identified these organisms as *C. rugosa*, *C. parapsilosis* and *S. cerevisiae*, respectively. The results of this identification method for CEMM 32023 and CEMM 32027 strains, were in agreement with the results of the VITEK-based identification method. However, the VITEK identification of CEMM 32024, as well CEMM 32031, CEMM 32032,

CEMM 32039 and CEMM 12063 strains was non-conclusive, and this method could not distinguish between *C. parapsilosis* and *C. famata* or *Cryptococcus neoformans*.

VITEK 2 identified conclusively 84.84% (28/33) of the strains analyzed in the present study. Massonet et al., in 2004, utilizing the same system, found a percentage of only 67% for conclusive identification. According to Chen et al. (2000), automated systems such as VITEK show difficulty in the identification of some yeast species, often making it necessary to use manual tests such as micromorphology and CHROMagar, in order to make a definitive diagnosis (Aubertine et al., 2006, Massonet et al., 2004). Similarly, in the present study, micromorphologic analysis was essential for differentiating *C. parapsilosis* from *C. famata* and *Cryptococcus neoformans*, since the latter two species do not form pseudohyphae. In addition, as previously reported, we obtained 86.7% (26/30) concordance between the identification results with VITEK and those using the manual analyses. This value is higher than that reported by Oliveira et al. (2006) who found 58% concordance between these methods applied to yeasts from animals.

Fugita et al. (2001) reported that the PCR-AGE method could differentiate strains that show differences of 10 bp or more in the mean lengths of either one or two PCR products. Thus, differences of less than 10 bp in amplified products with the primers ITS1/ITS4 or ITS3/ITS4 do not allow distinction between some species when used alone. Such fact can be stated for the present study, seeing that the complete identification of some strains was only possible utilizing a combination of two primer pairs for PCR analysis. Thus, two fungal genera and 6 species were recognized on the basis of differences in the lengths of one or two fragments of amplicons. The sizes of the PCR products amplified with the ITS1/ITS4 primers were nearly equal for some species: *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, about 520 bp; and *C. parapsilosis* and *C. krusei*, about 507 bp. However, these organisms showed differences in the sizes of the PCR products amplified with ITS3/ITS4 primers. In contrast, the sizes of the PCR

products amplified with ITS3/ITS4 primers were nearly equal for: *C. albicans* and *C. krusei*, about 337 bp; *C. parapsilosis* and *C. norvegensis*, about 315 bp; *S. cerevisiae* and *C. kefyr*, with 420 bp; and *C. tropicalis* and *C. krusei*, with fragments about 331 bp. However, these organisms showed differences in the sizes of the PCR products amplified with ITS1/ITS4 primers. In the present study, only one strain (CEMM 32029) was unidentified with PCR-AGE. In this case, the identifications based on the sizes of the two PCR products did not agree. Similarly, Massonet et al. (2004) obtained discrepant results in the identification of fungal strains based on the variability of the size of the ITS2 region.

Based on the results of the present study, there were no significant differences among the methods compared when used to identify strains of veterinary origin. However, PCR-AGE stands out because of its greater rapidity, sensitivity and degree of concordance with the traditional phenotypic identification. Thus, the utilization of PCR-AGE, based on DNAr regions, for routine diagnostic applications in veterinary clinical pathology is a possibility.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Specialised Medical Mycology Center (CEMM-Federal University of Ceará, Brazil) and the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction (LFCR-Ceará State University) for their material help and scientific guidance in carrying out this work. The study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process: 475724/2006-2), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP process: 9839/06) and Dra. Luciana Magalhães Melo is a recipient from a grant CAPES/PNPD (Brazil).

References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 2002. Short protocols in Molecular Biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. Wiley. 5th e.
- Aubertine, C.L., Rivera, M., Rohan, S.M., Larone, D.H., 2006. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. J. Clin. Microbiol. 44 (1), 227–228.
- Antunes, A.G.V., Pasqualotto, A.C., Diaz, M.C., D’Azevedo, P.A., Severo, L.C., 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 46, 239-241.
- Bockelmann, W., Heller, M., Heller, K.J., 2008. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Int. Dairy J. 18, 1066–1071.
- Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Medrano, D.J.A., Rocha, M.F.G., Monteiro, A.J., Cavalcante, C.S.P., Meireles, TEF, Sidrim, J.J.C., 2005. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100, 131-135.
- Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Soares Júnior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2007. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. Vet J. 174, 147–153.
- Brown, M.R., Thompson, C.A., Mohamed, F.M., 2005. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 272-276.
- Chen, Y.C., Eisner, J.D., Kattar, M. M., Rassoulain-Barrett, S.L., Lafe, K., Yarfitz, S.L., Limaye, A.P., Cookson, B.T., 2000. Identification of medically important yeasts using

- PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6), 2302–2310.
- Cleff, M. B., Lima, A.P., Faria, R.O., Meinerz, A.R.M., Antunes, T.A., Araújo, F.B., Nascente, P.S., Nobre, M.O., Meireles, M.C.A. 2005. Isolation of *Candida* spp. from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. *Braz. J. Microbiol.* 36, 201-204.
- Cleff, M. B., Silva, G.M., Madrid, I.M., Martins, A.A., Fonseca, A.O., Nascente, P. S., Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B., 2007. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. *Veterinária e Zootecnia*, 14 (2), 164-168.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueiras, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Universitat Rovira i Virgili, Espanha, 2^a ed.
- Edelmann, A., Krüger, M., Schmid, J., 2005. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6164-6166.
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T., 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J. Clin. Microbiol.* 39 (10), 3617–3622.
- García, M.E., Blanco, J.L., 2000. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Rev. iberoamer. Micol.* 17, 2-7.
- Gautret, P., Rodier, M.H., Kauffmann-Lacroix, H., 2000. Case report and review. onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. *Mycoses.* 43, 433-435.
- Jacobsen, M. D.; Bougnoux, M. E.; d'Enfert, C.; Odds, F. C., 2008. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals. *Res Microbiol.* v. 159, p. 436 – 440.
- Jadhav, V.J., Pal, M., 2006. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 23, 233-234.

- Kalkanci, A., Berk, E., Aykan, B., Caglar, K., Hizel, K., Arman, D., Kustimur, S., 2007. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida species* isolated from hospitalized patients. *J. Mycol. Med.* 17, 16-20.
- Kano, R., Hattori, Y., Okuzumi, K., Miyazaki, Y., Yamauchi, R., Koie, H., Watari, T., Hasegawa, A., 2002. Detection and identification of the *Candida* species by 25S ribosomal DNA analysis in the urine of candidal cystitis. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 115-117.
- Linek, J., 2004. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. *Vet. Ophthalmol.* 7, 159-162.
- Massonet, C., Eldere, J.V., Vaneechoutte, M., De Baere, T., Verhaegen, J., Lagrou, K., 2004. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 42 (5), 2209–2211.
- Medrano, D.J.A., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A.C., ROCHA, M.F.G., Rabenhorst, S.H.B., Sidrim, J.J.C., 2006. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 48, 17-20.
- Moretti, A., Boncio, L., Posteraro, B., Mechelli, L., Balducci, M., Fadda, G., La Sorda, M., Di Chio, M., Grelloni, V., Agnetti, F., 2006. Co-cutaneous infection in a dog: PCR-reverse identification of *Candida tropicalis* on skin biopsy. *J. Mycol. Med.* 16, 30–36.
- Moretti, A., Posteraro, B., Boncio, L., Mechelli, L., Gasperis, E., Agnetti, F., Raspa, M., 2004. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Rev. Iberoam. Micol.* 21, 139-142.
- Oliveira, G.S., Ribeiro, E.T., Baroni, F.A., 2006. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 48 (6), 311-315.
- Ozawa, H., Okabayashi, K., Kano, R., Watari, T., Watanabe, S., Hasegawa, A., 2005. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia.* 160, 159-162.

- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Masucci, L., Romano, L., Morace, G., Fadda, G., 2000. Reverse Cross Blot Hybridization Assay for rapid detection of PCR-amplified DNA from *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Saccharomyces cerevisiae* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4), 1609–1614.
- Silva, J.O., Candido, R.C., 2005. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 38 (3), 261-263.
- Suchodolski, J.S., Morris, E.K., Allenspach, K., Jergens, A.E., Harmoinen, J.A., Westermarck, E., Steiner, J.M., 2008. Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Vet Microbio.* 132, 379–388.

9 CONCLUSÕES

1- *Candida* spp., *M. pachydermatis*, *S. cerevisiae* e *Rhodotorula* sp. fazem parte da microbiota de cães saudáveis, estando presentes em sítios anatômicos, como mucosa oral, vaginal, prepúcio e região perianal.

2- A espécie *M. pachydermatis* é a principal levedura constituinte da microbiota da mucosa oral, vaginal, prepúcio e região perianal de cães hígidos.

3- O gênero *Candida* é o segundo mais presente na microbiota de cães saudáveis, sendo as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e, especialmente, *C. parapsilosis*, as mais frequentes.

4- Há fenômeno de resistência aos derivados azólicos entre as cepas de *Candida*, particularmente *C. albicans* e *C. tropicalis*, isoladas da microbiota de cães.

5- As cepas de *M. pachydermatis* isoladas da microbiota de cães são resistentes a caspofungina.

6- O polimorfismo de comprimento das regiões ITS1 e ITS2 do DNAr de espécies de *Candida* isoladas de cães é suficiente para permitir sua identificação no contexto de espécies, por intermédio do método de PCR-AGE.

7- A identificação de *Candida* spp., oriundas de cães, mediante o perfil genotípico das regiões ITS1 e ITS2 do DNAr, assim como aquela realizada pelo VITEK 2, apresentam elevado grau de concordância com o método manual.

8- Ambas as ampliações, utilizando os pares de *primers* ITS1/ITS4 e ITS3/ITS4, para PCR-AGE das regiões ITS1 e ITS2 do DNAr, são necessárias para uma identificação conclusiva de cepas de *Candida* spp. de origem veterinária.

9- O método de PCR-AGE das regiões ITS apresentou a maior taxa de indentificações conclusivas de *Candida* spp. oriundas de cães, sendo mais sensível do que os métodos manual e automatizado (VITEK 2).

10 PERSPECTIVAS

O presente trabalho intenta contribuir para incrementar os conhecimentos acerca dos aspectos fenotípicos e genotípicos de cepas de *Candida* spp. oriundas de cães, de forma que abre-se uma perspectiva de novos estudos nessa mesma linha, que podem abordar: outras espécies de *Candida* oriundas de cães; cepas de *Candida* oriundas de outras espécies animais; outras regiões genômicas polimórficas, que permitem identificar espécies do gênero *Candida*; mecanismos moleculares envolvendo o fenômeno de resistência aos derivados azólicos em cepas de *Candida* spp.; epidemiologia das patologias por *Candida* spp., utilizando marcadores moleculares polimórficos. Além do que, o incremento do número de estudos utilizando o método de PCR-AGE para identificação de *Candida* spp. poderá direcionar a rápida implementação desta importante ferramenta nos laboratórios de Medicina veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R. C.; IBANEZ, J., F.; MAMIZUKA, E. M.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; LARSSON, C. E. Microbiota indígena do meato acústico externo de gatos hígidos. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 441-445, 1998.

ANTUNES, A.G.V.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 239-241, 2004.

ASAI, K.; TSUCHIMORI, N.; OKONOGI, K.; PERFECT, J. R.; GOTOH, O.; YOSHIDA, Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14 α -demethylase P450. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1163-1169, 1999.

BALASUBRAMANIAM, A.; SUKUMAR, S. An overview on outbreaks of candidiasis in poultry. **Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences**, v.3, n.3, p.121-123, 2007.

BALKIS, M. M.; LEIDICH, S. D.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, v. 62, p. 1025-1040, 2002.

BARADA, G.; BASMA, R.; KHALAF, R. A. Microsatellite DNA identification and genotyping of *Candida albicans* from Lebanese clinical isolates. **Mycopathologia**, DOI: 10.1007/s11046-008-9089-0, 2008.

BLACKWELL, S. S. M.; KURTZMAN, C. P.; LACHANCE, M. A. Phylogenetics of *Saccharomyces*, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006-1017, 2006.

BOCKELMANN, W.; HELLER, M.; HELLER, K. J. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **International Dairy Journal**, v. 18, p. 1066–1071, 2008.

BOND, R., SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E., LLOYD, D. H. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 147-150, 1995.

BOND, R.; HOWELL, S. A.; HAYWOOD, P. J.; LLOYD, D. H. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malssezia globosa* from healthy pet cats. **Veterinary Record**, v. 141, p. 200-201, 1997.

BOTTEREL, F.; DESTERKE, C.; COSTA, C.; BRETAGNE, S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4076-81, 2001.

BRION, L. P.; UKO, S. E.; GOLDMAN, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. **Journal of Infection**, v. 54, p. 521-529, 2007.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. F.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 147-153, 2007.

BROWN, M. R.; THOMPSON, C. A.; MOHAMED, F. M. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 272-276, 2005.

CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6, p. 1064-76, 2007.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, v. 160, p. 143-149, 2005a.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; CHERMETTE, R.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in

healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 316-322, 2005b.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, v. 44, p. 485-492, 2006.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Medical Mycology**, v. 46, p. 1-6, 2008.

CANDELLI, M.; NISTA, E. C.; NESTOLA, M.; ARMUZZI, A.; SILVERI, N. G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. *Saccharomyces cerevisiae*-associated diarrhea in an immunocompetent patient with ulcerative colitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 36, n. 1, p. 39-40, 2003.

CARVALHO, L. P.; BACELLAR, O.; NEVES, N. A.; CARVALHO, E.; DE JESUS, C. R. Evaluation of cellular immune response in patients with recurrent candidiasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 571-576, 2003.

CHANG, H. C.; LEAW, S. N.; HUANG, A. H.; WU, T. L.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3466-3471, 2001.

CHEN, T.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 4-26, 2005.

CHONG, P. P.; HADI, S. R. A.; LEE, Y. L.; PHAN, C. L.; TAN, B. C.; NG, K. P.; SEOWD, H. F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-*albicans* species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 449-456, 2007.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1027-1032, 2003.

CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Candida* spp. from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 201-204, 2005.

CLEFF, M. B.; SILVA, G. M.; MADRID, I. M.; MARTINS, A. A.; FONSECA, A. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 164-168, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institut (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A2. Wayne, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

COLOMBO, A. L.; BARCHIESI, F.; MCGOUGH, D. A.; RINALD, M. G. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 535-540, 1995.

COUTINHO, S. D. A. Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em medicina veterinária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, n. 1, p. 70-73, 2003.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1263–1266, 2000.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Ocorrence of *Malassezia* spp in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**, v. 40, p. 115-121, 2002.

DALE, J. E.. Canine dermatosis caused by *Candida parapsilosis*. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, v.67, p.548-549, 1972.

DALLE, F.; DUMONT, F.; FRANCO, N.; MESMACQUE, D.; CAILLOT, D.; BONNIN, P.; MOIROUX, C.; VAGNER, O.; CUISENIER, B.; LIZARD, S.; BONIN, A. Genotyping of *Candida albicans* oral strains from healthy individuals by polymorphic microsatellite locus analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2203-2205, 2003.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P. A.; CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 303-313, 2001.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

DUARTE, E. R.; RESENDE, J. C.; ROSA, C. A.; HAMDAN, J. S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, p. 631-635, 2001.

DUARTE, E. R.; LACHANCHE, M. A.; HAMDAN, J. S. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 794-752, 2002.

EDELMANN, A.; KRÜGER, M.; SCHIMID, J. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 6164-6166. 2005.

EICHENBERG, M. L., APPELT, C. E., BERG, V., MUSCHNER, A. C., NOBRE, M. O., MATTA, D., ALVES, S., H., FERREIRO, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 75-80, 2003.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* sp. infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

ELAD, D.; BRENNER, J.; MARKOVICS, A.; YAKOBSON, B.; SHLOMOVITZ, S.; BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of reweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 7-14, 1998.

FARIAS, M. R.; GIUFFRIDA, R. **Antifúngicos**. In: ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária. 2.ed. São Paulo: Manole, p. 59-70, 2002.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURE, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 43, n. 7-8, p. 273-279, 2000.

FERREIRO, L.; MOREIRA JR, J. P. R.; APPELT, C. E.; BERG, V.; OLIVEIRA, I. A.; MUSCHNER, A. C.; REISCHAK, D.; CHERMETTE, R. Associações entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FELV), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.3, p.179-183, 2002.

FULLERINGER, S. L.; SEGUIN, D. ; WARIN, S. ; BEZILLE, A. ; DESTERQUE, C. ; ARNE, P. ; CHERMETTE, R. ; BRETAGNE, S. ; GUILLOT, J. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. **Poultry Science**, v. 85, p. 1875–1880, 2006.

FUJITA, S.; SENDA, Y.; NAKAGUCHI, S.; HASHIMOTO, T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3617–3622, 2001.

GARCIA, M. E.; LANZAROT, P.; RODAS, V. L.; COSTAS, E.; BLANCO, J. L. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 10, p. 464–470, 2007.

GARCIA-RUIZ, J. C.; AMUTIO, E.; PONTÓN, J. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 55-62, 2004.

GERDING, P. A.; MORTON, L. D.; DYE, J. A. Ocular and disseminated candidiasis in immunosuppressed cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1635-1638, 1994.

GHANNOUM, M. A. *Candida albicans* antifungal-resistant strains: studies on adherence and other pathogenicity related characteristics. **Mycoses**, v. 35, n. 5-6, p. 131-139, 1992.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRA, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 544-548, 2006.

GRAUMMANN, P.; MARAHIEL, M. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. **Archives of Microbiology**, v. 166, p. 293-300, 1996.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 454-500, 1999.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Leeuwenhoek**. v. 69, p. 337-355, 1996.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v. 37, p. 295-306, 1999.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y.; FAERGEMANN, J.; SUMMERBELL, R. C. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. **British Journal of Dermatology**. v. 142, p. 758-765, 2000.

HEBART, H.; LÖFFLER, J.; REITZE, H.; ENGEL, A.; SCHUMACHER, U.; KLINGEBIEL, T.; BADER, P.; BÖHME, A.; MARTIN, H.; BUNJES, D.; KERN, W.; KANZ, L.; EINSELE, H. Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction

assay in patients at risk for fungal infections: Implications for the management of febrile neutropenia. **British Journal of Haematology**, v. 111, p. 635-40, 2000.

HESELTINE, J. C.; PANCIERA, D. L.; SAUNDERS, G. K. Systemic candidiasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, p. 821-824, 2003.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E. R.; HANDAM, J. S.; LACHANCE, M. A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 623-627, 2004.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed. Baarn/Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultuur/Universitat Rovira i Virgili, 2000.

JACOBSEN, M. D.; BOUGNOUX, M. E.; D'ENFERT, C.; ODDS, F. C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 436 – 440, 2008.

JADHAV, V. J.; PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 233-234, 2006.

JAND, S. K.; PAVITER K.; SHARMA, N. S. Yeasts as animal pathogens. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 115-123, 2003.

JIN, Y.; LIN, D. Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001-2004). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 41, p. 373-381, 2005.

KAKEYA, H.; MIYAZAKI, Y.; MIYAZAKI, H.; NYSWANER, K.; GRIMBERG, B.; BENNETT, J. E. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2985-2990, 2000.

KALKANCI, A.; BERK, E.; AYKAN, B.; CAGLAR, K.; HIZEL, K.; ARMAN, D.; KUSTIMUR, S. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida species* isolated from hospitalized patients. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 17, p. 16-20, 2007.

KANO, R.; SAKAMOTO, Y.; HANAHACHI, A.; KAMATA H.; FUKUDA, Y.; FUJIWARA, K.; HASEGAWA, A. Molecular identification of *Candida parapsilosis* from crop mucosa in a cockatiel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 437-9, 2001.

KANO, R.; HATTORI, Y.; OKUZUMI, K.; MIYAZAKI, Y.; YAMAUCHI, R.; KOIE, H.; WATARI, T.; HASEGAWA, A. Detection and identification of the *Candida* species by 25S ribosomal DNA analysis in the urine of candidal cystitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 2, p. 115-117, 2002.

KENNIS, R. A., ROSSER, E. J. Jr., OLIVIER, N. B., WALKER, R. W. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p.1048-1051, 1996.

KIVARIA, F. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. **The Veterinary Journal**, v.173, p.617–622, 2007.

KLINGSPOR, L.; JALAL, S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 745–753, 2006.

KOEHLER, A. P.; CHU, K. C.; HOUANG, E. T. S.; CHENG, A. F. B. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 422–426, 1999.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; RESENDE, M. A. Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 7-10, 2008.

KOGA-ITO, C. Y.; LYON, J. P.; VIDOTTO, V.; RESENDE, M. A. Virulence factors and antifungal Susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v. 161, p. 219–223, 2006.

KOZAK, M.; BILEK, J.; BELADICOVA, V.; BELADICOVA, K.; BARANOVA, Z.; BUGARSKY, A. Study of the dermatophytes in dogs and the risk of human infection. **Bratisl Lek Listy**, v. 104, n. 7-8, p. 211-217, 2003.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **The Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.

KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJEWSKI, T.; RÓZAŃSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin. **Mycopathologia**, v. 150, p. 5–7, 2000.

LIM, C. S. Y.; TUNG, C. H.; ROSLI, R.; CHONG, P. P. An alternative *Candida* spp. cell wall disruption method using a basic sorbitol lysis buffer and glass beads. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 576–578, 2008.

LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. **Veterinary Ophthalmology**, v. 7, p. 159-162, 2004.

LUNARDI, L. W.; AQUINO, V. R. ; ZIMERMAN, R. A.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 60–63, 2006.

MACHADO, M. L.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v. 44, p. 27-34, 2003.

MARTÍNEZ, M.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; BACHMANN, S. P.; PEREA, S.; RUESGAB, M. T.; PATTERSON, T. F. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 515-524, 2002.

MASSONET, C.; ELDERE, J. V.; VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2209–2211, 2004.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A. C.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MEIS, J.; PETROU, M.; BILLE, J.; ELLIS, D.; GIBBS, D. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. Global Antifungal Surveillance Group. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, n. 4, p. 215-223, 2000.

MELVILLE, P. A.; COGLIATI, B.; MANGIATERRA, M. B. B. C. D; RUZ PERES, M.; MOURA, S. C. A.; MATSUDA, L.; KIM, A.; BENITES, N. R. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1871-1876, 2004.

MILNER, R. J.; PICARD, J.; TUSTIN, R. Chronic episodic diarrhoea associated with apparent intestinal colonisation by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* in a German shepherd dog. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 68, n. 4, p. 147-9, 1997.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, K.; YAMADA, T.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiological Methods**. v. 61, p. 281-284, 2005.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004.

MORETTI, A.; BONCIO, L.; POSTERARO, B.; MECHELLI, L.; BALDUCCI, M.; FADDA, G.; LA SORDA, M.; DI CHIO, M.; GRELLONI, V.; AGNETTI, F. Co-cutaneous infection in a dog: PCR-reverse identification of *Candida tropicalis* on skin biopsy. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 16, p. 30–36, 2006.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; GASPERIS, E.; AGNETTI, F.; RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 139-142, 2004.

MOTA, R. A.; COSTA, N. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; SÁ, M. E. P.; ALMEIDA NETO, J. B. Bovine mastitis caused by *Candida* sp.: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 101-103, 1999a.

MOTA, R. A.; J. K. O. FARIAS; L. B. G. DA SILVA; E. T. DE LIMA; A. A. F. OLIVEIRA; R. T. D. DE MOURA. Eficácia do otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica de cães. **VET NEWS** (www.schering-plough.com.br), 1999b.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **Veterinary Record**, v. 150, p. 728-730, 2002.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, p. 400-428, 2003.

NARDONI, S.; DINI, M.; TACCINI, F.; MANCIANTI, F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosa of atopic dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 172-177, 2007.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M.; RUM, A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathologia**, v. 157, p. 383–388, 2004.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; RUM, A.; CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, p. 141-145, 2005.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

OCHIAI, K.; VALENTINE, B. A.; ALTSCHUL, M. Intestinal candidiasis in a dog. **Veterinary Record**, v. 146, n. 8, p. 228-229, 2000.

OKULICZ, J. F.; RIVARD, R. G.; CONGER, N. G.; NGUYEN, M. X.; HOSPENTHAL, D. R. Primary isolation of *Candida* species from urine specimens using chromogenic medium. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 141-146, 2008.

OLIVEIRA, G. S.; RIBEIRO, E. T.; BARONI, F. A. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 311-315, 2006.

OLLERT, M. W.; WENDE, C.; GORLICH, M.; MCMULLAN-VOGEL, C. G.; BORGVON ZEPELIN, M.; VOGEL, C. W.; KORTING, H. C. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2543-2549, 1995.

OZAWA, H.; OKABAYASHI, K.; KANO, R.; WATARI, T.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. **Mycopathologia**, v. 160, p. 159-162, 2005.

PAIXÃO, G. C.; SIDRIM, J. J. C.; CAMPOS, G. M. M.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, 2001.

PANOFF, J. M.; THAMMAVONGS, B.; GUEGUEN, M.; BOUTIBONNES, P. Cold stress response in mesophilic bacteria. **Cryobiology**, v. 36, p. 75-83, 1998.

PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; McATEE, R. K.; SANTILLAN, R. A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD D.; PATTERSON, T. F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 676–2684, 2001.

POSTERARO, B.; TUMBARELLO, M.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; TRECARCHI, E. M.; DE BERNARDIS, F.; SCOPPETTUOLO, G.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 3046-7, 2006.

PRADO, M. R.; BRITO, E. H. S.; GIRÃO, M. D.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 115-120, 2004.

PRADO, M. R.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A. C.; LEITE, J. J. G.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 341–343, 2008.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L.; LANE, I. F.; COWGILL, L. D.; DYE, J. A. *Candida* spp urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. **The Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, p. 263-270, 2003.

RAPOSO, B. R.; NOBRE, M. O.; FERNANDES, C. G.; PORTO, M. Candidíase cutânea em um canino. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 2-3, p. 11-14, 1996.

REICH, W. J.; NECHTOW, M. J. Canine genital moniliasis as a source of reinfection in the human female. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p.141, 1949.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 31–53, 2003.

RUIZ, L. S.; SUGIZAKI, M. F.; MONTELLI A.; MATSUMOTO, F. E.; PIRES. M. F. C.; DA SILVA, B. C. M.; SILVA, E. H.; GANDRA, R. F.; SILVA, E. G.; AULER, M. E.; PAULA, C. R. Fungemia by yeast in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **Journal of Medical Mycology**, v. 40, n. 15, p. 1413-1421, 2005.

RUZ-PERES, M.; YOKOYA, E.; PASSARELLI, D.; CANTARINO, S.C.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P. A. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, v.71, p.1-749, 2004.

SAMPAIO, P.; GUSMÃO, L.; ALVES, C.; PINA-VAZ, C.; AMORIM, A.; PAIS, C. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 552–57, 2001.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance on *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 73-85, 2002.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v. 159, p. 251–253, 2005.

SCULLION, F. T.; SCULLION, M. G. Pathologic findings in racing pigeons (*Columba livia domestica*) with “Young Bird Sickness”. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 21, n. 1, p. 1–7, 2007.

SENCZEK, D.; SIESENOP, U.; BÖHM, K. H. Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Mycoses**, v. 42, p. 409-414, 1999.

SHIN, J. H.; NOLTE, F. S.; MORRISON, C. J. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1454-1459, 1997.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

SILVA, E. H. Candidúria em Hospital Público Infantil de São Paulo, Brasil: identificação de leveduras, fatores relacionados a virulência, biotipagem "killer" e sensibilidade aos antifúngicos. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)** – Instituto de Ciências biomédicas II, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 261-263, 2005.

SONI, L. M.; BURATTINI, M. N.; PIGNATARI, A. C.; GOMPERTZ, O. F.; COLOMBO, A. L. Comparative study of agar diffusion test and the NCCLS macro broth method for in vitro susceptibility testing of *Candida* spp. **Mycopathologia**, v. 145, n. 3, p. 131-135, 1999.

SOUZA, W. A.; SIQUEIRA, A. M. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, 2003.

STEPHAN, F.; BAH, M. S.; DESTERKE, D.; REZAIGUIA-DELCLAUX, S.; FOULET, F.; DUVALDESTIN, P.; BRETAGNE, S. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 12, p. 1477-83, 2002.

SUCHODOLSKI, J.S.; MORRIS, E. K.; ALLENSPACH, K.; JERGENS, A. E.; HARMOINEN, J. A.; WESTERMARCK, E.; STEINER, J. M. Prevalence and identification

of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 379–388, 2008.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M., T.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**. v. 48, p. 579-583, 2004.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M. T.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 4695-4699, 2003.

SZABÓ, Z.; TÓTH, B.; KOVÁCS, M.; KARDOS, G.; MARÁZ, A.; ROZGONYI, F.; MAJOROS, L. Evaluation of the new Micronaut-*Candida* system compared to the API ID32C method for yeast identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1824–1825, 2008.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. M.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. 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.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 135-140, 2008.

VANDEN BOSSCHE, H.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 5–29, 2003.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGES, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4608–4615, 2005.

VELASCO, M. C. Candidiasis and Cryptococcosis in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n.2, p.75-81, 2000.

VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E. C.; KRITIKOU, S.; GAITANIS, G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3589-3593, 2004.

VIUDES, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; GOBERNADO, M. Correlación entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antigungicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis e cryptococosis. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 15, p. 1-13, 2002.

WEIG, M.; BROWN, A. J. P. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 310-317, 2007.

WILLIAMSON, E. C.; LEEMING, J. P.; PALMER, H. M.; STEWARD, C. G.; WARNOCK, D.; MARKS, D. I.; MILLAR, M. R. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. **British Journal of Haematology**, v. 108, n. 1, p. 132-9, 2000.

WU, T.; WRIGHT, K.; HURST, S. F.; MORRISON, C. J. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 1200-1208, 2000.

ANEXO I

Relação de leveduras que constam no banco de dados do sistema automatizado de identificação VITEK 2:

Candida albicans
C. famata
C. glabrata
C. guilliermondii
C. kefyr
C. krusei
C. lambica
C. lusitaniae
C. parapsilosis
C. rugosa
C. tropicalis
C. zeylanoides
Cryptococcus albidus
C. humicolus
C. laurentii
C. luteolus
C. neoformans
C. terreus
C. uniguttulatus
Geotrichum candidum
G. capitatum
G. idebohnii
Pichia anomala
Pi. ohmeri
Prototheca wickerhamii
Pr. zopfii
Rhodotorula glutinis
R. mucilaginosa
Saccharomyces cerevisiae
Sporobolomyces salmonicolor
Trichosporon beigelii
T. pullulans
Yarrowia lipolytica

(Fonte: Manual de utilização do Sistema automatizado VITEK 2, 2007)

ANEXO II

Identificação das principais espécies de *Candida* de interesse clínico com base em testes fenotípicos realizados manualmente.

LEVEDURAS	Assimilação														Fermenação							Ca	T	U	ant				
	Int	Ram	Ara	Gli	Sac	Lac	Gal	Raf	Ino	Xil	Cel	Tr	Rib	Mal	Mel	Glic	Suc	Raf	Gal	Tre	Mol								
<i>Candida albicans</i>	-	-	V	-	V	-	+	-	+	-	-	-	T-	+	-	-	T-	-	V	V	-	-	-	+	-	-	-		
<i>C. catenulata</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	T-	V	-	V	-	-	-	T-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>C. ciferrii</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	V	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	
<i>C. dubliniensis</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	-	-	-	-	V	-	-	-	V	V	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. famata</i>	V	V	V	+	+	V	V	V	-	F+	-	V	V	-	-	-	F-	F-	F-	F-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. guilliermondii</i>	-	V	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>C. kefyr</i>	-	T+	-	+	+	V	T	+	-	T	V	F-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	
<i>C. lusitanae</i>	-	V	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	V	V	-	-	-	NT	
<i>C. norvergensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	
<i>C. pelliculosa</i>	-	-	V	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F-	V	-	V	-	-	-	-	+
<i>C. rugosa</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	V	+	T+	-	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	T-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	V	NT	+	+	NT	-	NT	NT	NT	NT	F+	NT	V	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>C. albicans</i>	-	NT	V	+	NT	V	NT	NT	NT	NT	-	NT	V	NT	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	NT	+
<i>C. oler</i>	-	NT	V	+	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	V	NT	V	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	+
<i>C. curvatus</i>	-	NT	-	+	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	+	NT	+	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	+
<i>C. haemulonii</i>	F-	NT	+	-	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	+	NT	+	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	+
<i>C. laurentii</i>	-	NT	+	-	NT	+	NT	NT	NT	NT	+	NT	+	NT	+	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	+
<i>C. noncoulteri</i>	+	NT	F	-	NT	-	NT	NT	NT	NT	-	NT	-	NT	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-

(Fonte: Sidrim & Rocha, 2004)

NT = não testado; + = positivo; - = negativo; V = variável; F = reação fraca; F+ = fracamente positivo; T = tardio; Inu = inulina; Ram = ramnose; Ara = arabinose; Gli = glicose; Sac = sacarose; Lac = lactose; Gal = galactose; Raf = rafnose; Ino = inositol; Xil = xilose; Cel = celobiose; Tr = trealose; Rib = ribose; Mal = maltose; Mel = melibiose; Ca = cápsula; T = tubo germinativo; U = urease; KNO₃ = assimilação de nitrato.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)