

BIANCA SILVA NAVARRO

**Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da
mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo**

São Paulo

2016

BIANCA SILVA NAVARRO

Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Diagnóstico Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Navarro, Bianca Silva.

Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo / Bianca Silva Navarro; orientador: Claudete Rodrigues Paula -- São Paulo, 2016.

165 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Cães. 2. Mucosa oral. 3. Leveduras. 4. Antifúngicos. I. Paula, Claudete Rodrigues. II. Título.

Navarro BS. Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho:

*Aos meus amados pais, **José Sabino e Vera Lúcia**, por tudo, em especial, pelo amor, confiança, apoio e estímulo constantes em todas as etapas da minha vida. Vocês são exemplos de honestidade, caráter, sabedoria e perseverança, dos quais tanto me orgulho e nos quais busco sempre me espelhar.*

*As minhas irmãs, **Michelle e Cinthia**, pelo amor e amizade, pelas alegres lembranças de convivência, pela admiração recíproca e por me incentivarem sempre.*

*A minha eterna professora, amiga, **Diana**, pelo companheirismo, auxílio na pesquisa, pelas idéias, conselhos e amizade.*

*As **pessoas amadas e amigos** pelo apoio, paciência, confiança e, sobretudo, pelo amor dedicado durante todos esses anos.*

*A minha querida **Claudete**, que foi muito mais que uma orientadora, uma verdadeira mãe, pelo seu carinho e paciência nos dias difíceis.*

Sem vocês, essa realização não seria possível.

Agradecimentos especiais:

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a. Claudete Rodrigues Paula, pela amizade e confiança depositada em mim e pela orientação persistente que me permitiu vencer as inseguranças ao longo do mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe, que se mostrou um bom amigo, me ajudando e abrindo o espaço para realizar as minhas coletas.

A Prof^a Dr^a Carina Domaneschi, pela sua dedicação, preocupação e auxílio durante esses anos de mestrado.

Agradeço especialmente também a Prof^a Dr^o Luciana da Silva Ruiz Menezes e ao Prof. Dr. Marcos Ereno Auler, que me ajudaram muito na parte laboratorial do estudo, é imensa a gratidão que tenho por vocês.

A minha querida Nina, que foi uma grande amiga durante o meu mestrado, me ajudando e conciliando em todas as etapas percorridas nesses últimos tempos.

Aos professores, Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior e Prof^a Dr^a Maria de Fátima Costa Pires, pela presença e orientação no exame de qualificação, na qual me auxiliou muito para aperfeiçoar minha dissertação.

A minha amada família, que sempre me incentivou, pelo carinho, amor, dedicação. Eu não seria nada na vida sem vocês.

Agradecimentos:

A todos os docentes do curso de Pós-Graduação Diagnóstico Bucal que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento e formação.

Aos demais amigos da Pós-Graduação, Ana Clara Souza, Camila Esteves, Fernanda Salineiro, Solange, Daniele Ferreira, Maria Cecília Cersosimo, entre outros, pelo apoio e cooperação mútuos por todos os momentos de agradável convivência e companheirismo.

Ao Thiago Mendonça, pelo auxílio agil e competente no trabalho estatístico dos dados deste estudo.

Aos coordenadores e funcionários da Faculdade de Odontologia de São Paulo, em especial, aos do Departamento de Estomatologia, pessoas amigas e prestativas.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pela presteza e eficiência dos serviços prestados durante todo o curso, muito obrigada!

Aos funcionários da Biblioteca pela ajuda na normatização deste trabalho.

Ao Marcos, funcionário da gráfica, pela ajuda e excelente trabalho prestado.

A CAPES, FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro que propiciaram o bom andamento desta pesquisa.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

Agradecimentos "Cães especiais"

Gostaria de agradecer aos meus queridos e amados anjos de quatro patas, que sempre serviram de incentivo e inspiração para que eu me dedicasse a esses seres vivos tão especiais. A vocês que estão comigo, Apolo, Feiticeira, Pretinha, Magia, Feitiço, e aos que infelizmente me deixaram saudade, Naja, Pandora, Laidy e Nina, muito obrigada!!!

Não podia deixar de agradecer aos animais tão queridos participantes deste estudo, foi nostálgico trabalhar com vocês.

E por fim, a todos os outros queridos animais desse mundo, nossa luta e trabalho são dedicados a vocês, que, em minha opinião, são os maiores merecedores de nossa atenção!!!



Pretinha



Apolo



Líli - Estudo



Nina



Naja

*“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo
modo que seus animais são tratados”
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

Navarro BS. Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Motivado pela crescente importância que os animais domésticos vêm causando na sociedade humana, tanto em relação à busca de melhor qualidade de vida, quanto em relação ao seu valor epidemiológico, visto que são poucos os estudos sobre este assunto, este trabalho objetivou-se em identificar e traçar o perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos das espécies de leveduras potencialmente patogênicas isoladas da mucosa oral de cães sem raça definida, da cidade de Campinas, São Paulo. Por motivos de segurança, os animais selecionados foram anestesiados para a realização de exame clínico da cavidade oral e coleta de amostras da região de mucosa oral, seguida de inoculação em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol. A partir do crescimento em placa, foram isoladas as colônias de fungos leveduriformes, submetidas a exames macromorfológicos e micromorfológicos, meio cromogênico, provas bioquímicas (urease e método API 20C AUX) e teste de sensibilidade aos antifúngicos. Dos 50 animais participantes do estudo, os cães com idade superior a 4 anos e os que apresentavam doença periodontal tiveram maior percentual de isolamento. Foram identificadas 43 leveduras das 45 amostras isoladas, sendo elas 86% (37) correspondentes ao gênero *Candida spp*, 11,6% (5) pertencentes ao gênero *Trichosporon spp* e 2,3% (1) do gênero *Malassezia pachydermatis*. O perfil de sensibilidade pelo método "Etest" identificou importante resistência de algumas amostras à antifúngicos rotineiramente utilizados na clínica médica veterinária, o que ressalta a importância da continuidade deste trabalho para o melhoramento da conduta clínica e para a explicação dos inúmeros tratamentos recidivos tanto em animais como em humanos.

Palavras-chave: Cães. Mucosa oral. Leveduras patogênicas. Resistência fúngica.

ABSTRACT

Navarro BS. Phenotypes and profiles of antifungal drugs susceptibility of yeasts isolated from the oral mucosa of dogs in the city of Campinas, Sao Paulo [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Regarding the increasing impact that that the pets have been causing to the human society as its relation to the search for a better quality of life, and its relation with the epidemiological value, this study aimed to identify and draw the profile of the susceptibility to the antifungal drugs of the potentially pathogenic species of yeasts isolated from the oral canine mucosa of animals from indefinite breed of the city of Campinas, São Paulo. For their safety, the selected animals were anesthetized to have a short clinic exam of the oral cavity performed and to have samples from the oral mucosa collected. Later an inoculation in Sabouraud Dextrose Agar with chloramphenicol was performed. After the growth on a dish, colonies of fungi with yeast shape were isolated and submitted to macro morphological and micro morphological exams, chromogenous medium, biochemical proofs (urease and API 20C AUX method), and the test of the susceptibility to the antifungal drugs. Among the 50 animals taken part in the study, the dogs over 4 years old and those which presented periodontal diseases had a higher isolation percentage. Yeasts were identified 43 of the 45 isolates, being that 86%(37) were from the genus *Candida spp*, 11,6% (5) belonged to the genus *Trichosporon spp.*, and 2,3% (1) belonged to the genus *Malasseziapachydermatis*.The susceptibility profile through the “Etest®” method identified a relevant resistance of some strains to the antifungal drugs commonly used in the veterinary medical clinic. This found highlights the relevance of the continuity of this study to improve the clinical conduct and to explain many relapse treatments in both animals and humans.

Keywords: Dogs. Canines. Oral and gingival mucosa. Pathogenic yeasts. Fungal resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Dachshund, fêmea, 1,5 anos. Cultura fúngica de pele positiva para *Malassezia pachydermatis*.28
- Figura 2.2 - Aspectos macromorfológicos das colônias de *Candida guilliermondii* (A), *Candida lipolytica* (B), *Cryptococcus uniguttulatus* (C) e *Cryptococcus laurentii* (D), *Trichosporon asahii* (E) e *Trichosporon mucoides* (F) em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 35°C, isoladas de superfície hospitalar veterinária30
- Figura 2.3 - Blastocónídios e clamidocónídios no interior das hifas da levedura *C. albicans*.35
- Figura 2.4 - Teste de microcultivo em ágar fubá Tween 80 de espécies de *Candida* isoladas de onicomicoses em pacientes com HIV. Nota: A *Candida albicans*; B *C. tropicalis*; C *C. parapsilosis*; D *C. glabrata*; E *C. famata*; F *C. guilliermondii*.36
- Figura 2.5 - Formação de Tubo germinativo, característica da espécie *Candida albicans*.....37
- Figura 2.6 - Formação do tubo germinativo (A - seta).38
- Figura 2.7 - Cultivo de *Trichosporon beigeli* em lâmina apresentando hifas artrosporadas e blastocónídios (160x - A e 400x - B).42
- Figura 2.8 - *Malassezia furfur*. Coloração de escamas epidérmicas pelo método de PAS. Formas arredondadas, pseudohifas com brotamento (1000x)..44
- Figura 2.9 - "Etest" para fluconazol e itraconazol51

- Figura 4.1 - Exame clínico da cavidade oral de animais participantes do estudo. Cão classificado como negativo para DP (A) e cão positivo para DP (B), com presença de cálculo dentário (seta). 60
- Figura 4.2 - Animal participante do estudo sob efeito de anestesia dissociativa..... 62
- Figura 4.3 - Coleta das amostras da mucosa oral com o auxílio de um "swab" de cães sem raça definida da cidade de Campinas, São Paulo..... 64
- Figura 4.4 - Extensão não septada, sem (A) e com (B) constrição a partir dos blastoconídios. 68
- Figura 4.5 - Aspécto micromorfológico de *C. dubliniensis* (A), com clamidoconídios em "triplets" ou em formato de "cachos" (seta vermelha) e *C. albicans* (B), com clamidoconídios terminais e intercalares (ágar fubá + Tween 80) (seta preta)..... 69
- Figura 4.6 - Crescimento de *Candida* spp em meio CHROMAGAR *Candida*®..... 70
- Figura 4.7 - Sistema API 20C AUX - Para identificação de leveduras..... 71
- Figura 4.8 - Catálogo analítico digital API 20C AUX. Notam-se os resultados de positividade (+) e negatividade (-) para assimilação de determinado carboidrato devido a opacidade ou não do poço, respectivamente. 72
- Figura 4.9 - Leitura de placa de Petri mostrando as fitas de "Etest" e seus halos de inibição de crescimento. Nota-se isolado sensível ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B..... 75
- Figura 5.1 - Fotografia de alguns dos animais participantes desta pesquisa. Cães sem raça definida, Campinas, São Paulo. 78
- Figura 5.2 - Colônias de leveduras isoladas da mucosa oral de cães SRD, Campinas, São Paulo..... 83

- Figura 5.3 - Amostras de leveduras cultivadas em meio ASD para caracterização macromorfológica. (A) - Colônia de coloração creme, mucosa, lisa e de bordos irregulares; (B) - Colônia de coloração branca, cremosa, lisa e de bordos regulares; (C) - Colônia de coloração branco-amarelada, cremosa, lisa e de bordos regulares; (D) - Colônia de coloração branca, rugosa e de bordos irregulares; (E) - Colônia de coloração branco-rósea, lisa e de bordos regulares. 86
- Figura 5.4 - Formação de tubo germinativo pelas amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, Campinas, São Paulo (inoculação em soro fetal bovino) (seta). 88
- Figura 5.5 - Amostra de levedura isolada na cavidade oral de cão cultivada em ágar fubá, Campinas, São Paulo. Verifica-se a formação de clamidoconídios terminais intercalares únicos (seta) em objetiva 40x. 89
- Figura 5.6 - Crescimento de algumas colônias de leveduras em meio CHROMAGAR®, isoladas da mucosa oral de cães SRD, Campinas, São Paulo. 91
- Figura 5.7 - Teste de urease - Verifica-se positividade da amostra (seta) com a mudança de coloração do meio. 94
- Figura 5.8 - Método "Etest" - Verifica-se crescimento da levedura e formação do halo de inibição, indicando a CIM (seta vermelha). Leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo. 100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 - Indicações e dosagens dos antifúngicos para uso sistêmico nas micoses superficiais, subcutâneas e profundas de cães e gatos.53
- Tabela 4.1 - Interpretação do comportamento de cepas de leveduras frente à concentração dos antifúngicos ($\mu\text{g/ml}$), segundo documentos CLSI M27A2 (2002), CLSI M27S3 (2008) e Dalazen et al. (2011)*.76
- Tabela 4.2 - Categorias de classificação do coeficiente Kappa.77
- Tabela 5.1 - Identificação e dados gerais dos cães sem raça definida (SRD) participantes do estudo (número, nome, sexo, peso, DP, idade), Campinas, SP.79
- Tabela 5.2 - Animais com idade igual ou acima de 4 anos e animais com menos de 4 anos com relação a presença ou não de DP*.82
- Tabela 5.3 - Total de animais do estudo com ou sem doença periodontal relacionados com o isolamento positivo ou negativo para leveduras84
- Tabela 5.4 - Análise comparativa de animais machos e fêmeas com isolamento positivo para levedura e total em porcentagem desses animais com ou sem DP*.84
- Tabela 5.5 - Análise macromorfológicas das leveduras isoladas na cavidade oral de cães.....85
- Tabela 5.6 - Tabela de frequência para as categorias de classificação dos métodos CHROMAGAR *Candida*® e API 20C AUX.97
- Tabela 5.7 - Resultados do coeficiente de concordância para os métodos CHROMAGAR *Candida*® e API 20C AUX97

Tabela 5.8 - Resultados pareados com relação as cepas identificadas como <i>C. albicans</i> , formação de tubo germinativo e pesquisa para clamidoconídio.	98
Tabela 5.9 - Resultados da CIM ($\mu\text{g/mL}$) obtidos no teste de difusão em ágar pelo método "Etest"	101
Tabela 5.10 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Miconazol.	105
Tabela 5.11 -Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Cetoconazol.	106
Tabela 5.12 -Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Fluconazol.....	107
Tabela 5.13 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Itraconazol.....	108
Tabela 5.14 -Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Voriconazol.	109
Tabela 5.15 -Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente a Caspofungina	110

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 - Resultados em porcentagem da prova de tubo germinativo e do teste do microcultivo, indicando positividade ou negatividade para a ..formação do tubo germinativo, de clamodoconídios, de artroconídios e de filamentação das leveduras.....90
- Gráfico 5.2 - Resultado presuntivo das espécies de leveduras de acordo com o meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®.92
- Gráfico 5.3 - Resultado da identificação das espécies de leveduras isoladas através do sistema API 20C AUX (bioMérieux).93
- Gráfico 5.4 - Comparação de igualdade dos resultados de identificação de leveduras pelos métodos comerciais CHROMAGAR *Candida*® e API 20C AUX...
.....96
- Gráfico 5.5 - Classificação leveduras isoladas da cavidade oral de cão em sensíveis (S), sensíveis dose dependente (SD) e resistentes aosantifúngicos MYC, IT, CET, FL, CS e VOR, segundo documentos CLSI M27A2 (2002), CLSI M27S3 (2008) e Dalazen et al. (2011) 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFST-EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. famata</i>	<i>Candida famata</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	Complexo <i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. utilis</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>C. viswanathii</i>	<i>Candida viswanathii</i>
<i>Candida spp</i>	Espécies de <i>Candida</i>
CFU	Unidades Formadoras de Colônia
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
CET	Cetoconazol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CS	Caspofungina
DP	Doença Periodontal
DPBEA	Departamento de Proteção e Bem-Estar Animal
E. Def. 7.1; E. Def. 7.2	Eucast Definitive Document
et al	El Alli, e outros
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fluconazol
GRAM	Método de Coloração com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica.

HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC	Intra-Class Coefficient
IT	Itraconazol
<i>M. baillon</i>	<i>Malassezia baillon</i>
<i>M. dermatis</i>	<i>Malassezia dermatis</i>
<i>M. furfur</i>	<i>Malassezia furfur</i>
<i>M.globosa</i>	<i>Malassezia globosa</i>
<i>M. japonica</i>	<i>Malassezia japonica</i>
<i>M. nana</i>	<i>Malassezia nana</i>
<i>M. obtusa</i>	<i>Malassezia obtusa</i>
<i>M. pachydermatis</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
<i>M. restricta</i>	<i>Malassezia restricta</i>
<i>M. slooffiae</i>	<i>Malassezia slooffiae</i>
<i>M. sympodialis</i>	<i>Malassezia sympodialis</i>
<i>M. yamatoensis</i>	<i>Malassezia yamatoensis</i>
<i>Malassezia spp</i>	Espécies de <i>Malassezia</i>
MOPS	Morpholinepropanesulfonic Acid
MYC	Miconazol
M27; M27A; M27-A2;A3	Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCCLS	Comitê Nacional de Padronização Laboratorial
NS	Não Sensível
PAS	Coloração Ácido Periódico-Schiff
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Resistente
®	Marchio Registrato
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Sensível
SDD	Sensibilidade Dose Dependente
SP	São Paulo

SRD	Sem Raça Definida
<i>T. asahii</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
<i>T. asteroides</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>T. beigelii</i>	<i>Trichosporon beigelii</i>
<i>T. cutaneum</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>T. inkin</i>	<i>Trichosporon inkin</i>
<i>T. mucoides</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>
<i>T. ovoides</i>	<i>Trichosporon ovoides</i>
TG	Tubo Germinativo
<i>Trichosporon spp</i>	Espécies de <i>Trichosporon</i>
VOR	Voriconazol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
h	Horas
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
kg	Kilograma
g	Gramas
L	Litro
M	Massa Molar
mm	Milímetro
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Importância da saúde oral dos animais	25
2.2	Leveduras de interesse médico	27
2.2.1	Fatores predisponentes a infecção por leveduras	28
2.2.2	Identificação das leveduras	29
2.2.3	Gênero <i>Candida</i> e Candidíase.....	31
2.2.3.1	provas para identificação do gênero <i>Candida</i>	34
2.2.3.2	tratamento das candidíases	40
2.2.4	Gênero <i>Trichosporon</i> e Trichosporose.....	41
2.2.5	Gênero <i>Malassezia</i> e Malasseziose.....	43
2.3	Leveduras isoladas do trato digestivo de cães	45
2.4	Testes de sensibilidade aos Antifúngicos	47
2.4.1	Resistência a Antifúngicos	47
2.4.2	Determinação da sensibilidade a antifúngicos	49
2.4.3	Método comercial “ <i>Etest®</i> ”.....	50
2.4.4	Principais Antifúngicos utilizados na medicina veterinária.....	52
3	PROPOSIÇÃO	58
3.1	Objetivo Geral	58
3.2	Objetivos Específicos	58
4	MATERIAL E MÉTODO	59
4.1	Casuística - Cães que participaram do estudo	59
4.1.1	Crítérios de exclusão e inclusão	59
4.1.2	Aspectos éticos.....	61
4.2	Delineamento e período de estudo	61
4.3	Preparação dos animais para o estudo	62
4.4	Coleta e isolamento das amostras	63
4.5	Seleção dos isolados	65
4.6	Manutenção e armazenamento das leveduras	65
4.6.1	Manutenção das amostras	65
4.6.2	Preservação das amostras - Processo de liofilização	65
4.7	Preparação das amostras para os testes	66

4.8	Identificação das leveduras	66
4.8.1	Caracterização macromorfológica	66
4.8.2	Caracterização micromorfológica	67
4.8.2.1	coloração de GRAM.....	67
4.8.2.2	prova do Tubo Germinativo	67
4.8.2.3	microcultivo em Ágar fubá - Pesquisa de clamidoconídios.....	68
4.8.3	Semeadura em meio Cromogênico - Identificação Presuntiva.....	69
4.8.4	Identificação bioquímica	71
4.8.4.1	assimilação de fontes de carbono - Sistema API 20C AUX.....	71
4.8.4.2	hidrólise da uréia	72
4.9	Teste de sensibilidade aos antifúngicos - "Etest"	73
4.9.1	Preparação do meio RPMI	73
4.9.2	Preparação do inóculo	74
4.9.3	Método "Etest"	74
4.9.4	Leitura dos resultados.....	75
4.10	Análise estatística	76
5	RESULTADOS	78
5.1	População estudada	78
5.2	Crescimento das amostras	82
5.3	Resultados dos testes de identificação das leveduras	85
5.3.1	Caracterização macromorfológica	85
5.3.2	Caracterização micromorfológica	87
5.3.2.1	coloração de GRAM.....	87
5.3.2.2	prova do tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídios	87
5.3.3	Semeadura em meio "CHROMAGAR <i>Candida</i> ®"	90
5.3.4	Sistema API 20C AUX (BioMérieux®).....	92
5.3.5	Prova bioquímica da urease.....	94
5.4	Resultados comparativos - Identificação fenotípica e bioquímica	95
5.5	Perfil de sensibilidade antifúngica - Método "Etest"	99
6	DISCUSSÃO	111
7	CONCLUSÕES	135
	REFERÊNCIAS	137
	ANEXOS	157

1 INTRODUÇÃO

A microbiota normal dos humanos e dos animais alberga variadas espécies de fungos desempenhando variadas funções, como na produção de ácido láctico e acético (auxiliando no processo digestivo) e na competição por receptores de mucosas, sendo considerados como comensais no trato gastrointestinal e na pele (Marinho et al., 2004; Santin, 2009). A cooperação entre diversas espécies de microrganismos proporcionam uma sobrevivência mútua e a ação competitiva mantém o equilíbrio da microbiota natural, impedindo que certas espécies se tornem patogênicas (Marinho et al., 2004).

Quando um organismo se encontra debilitado, criam-se condições favoráveis para que fungos, presentes no meio ambiente ou integrantes da microbiota, passem de saprófitos para patogênicos. Fungos que apresentam essa característica são denominados “fungos oportunistas” (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002). Como exemplos de levedura que apresenta essa característica estão as espécies do gênero *Candida*, que podem estar presentes no sistema digestivo, urinário e reprodutivo dos animais (Brito et al., 2009; Vieira; Coutinho, 2009; Cubas; Godoy, 2010; Wendisch et al., 2010).

Várias espécies de *Candida* apresentam um potencial patogênico que, em virtude de um desequilíbrio nas proteções física, química e imunológica, podem se tornar patogênicas e causar infecções (Soubhia et al., 2008; Brito et al., 2009; Vieira; Coutinho, 2009; Cubas; Godoy, 2010; Lachance et al., 2011). A *Candida albicans* é a espécie mais comum em casos de infecções, podendo ser isolada do sistema gastrointestinal, respiratório, com predileção pela superfície de mucosas e áreas mucocutâneas (Lacaz et al., 2002; Gompertz et al., 2008b; Brito et al., 2009; Cubas; Godoy, 2010). Outras espécies encontradas são: *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. utilis*, entre outras (Lacaz et al., 2002; Cubas; Godoy, 2010; Lachance et al., 2011).

A candidíase representa um problema importante nos hospedeiros imunocomprometidos, nos quais as manifestações clínicas, se não diagnosticadas e tratadas precocemente, podem variar desde infecções superficiais até infecções

sistêmicas, podendo ser fatais (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002; Miyasaka et al., 2008).

Além de *Candida spp*, outras leveduras já foram isoladas da cavidade oral de animais domésticos e silvestres, como por exemplo, *Malassezia pachydermatis* (Braga et al., 2005; Brito et al., 2008), *Rhodotorula spp.* (Braga et al., 2005), *Trichosporonspp.*, *Cryptococcuspp*, *Geotrichum spp.*, entre outros (Bentubo et al., 2010). Estas leveduras também podem ser destacadas como importantes fontes de infecção nos humanos e nos animais, podendo ocasionar manifestações clínicas superficiais e profundas (Lacaz et al., 2002; Zaitz et al., 2010; Kurtzman et al., 2011).

Ao longo das décadas, vem aumentando os relatos de manifestações clínicas em humanos relacionadas com infecções por leveduras (Koneman et al., 2001; Miyasaka et al., 2008; Brito et al., 2009). Como decorrência deste aumento, levando em consideração a extrema proximidade dos cães com os humanos, o conhecimento das leveduras presentes na cavidade oral desses animais se torna de grande importância, assim como o conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos das mesmas (Gioso; Carvalho, 2004; Santin, 2009).

Além desse fato epidemiológico, nos últimos anos a saúde oral dos pequenos animais vem ganhando espaço na rotina do odontologista veterinário. Desta forma, o aprimoramento do conhecimento microbiológico da cavidade oral fará um papel importante como suporte clínico para o diagnóstico e tratamento das leveduroses dos animais (Braga et al., 2005; Santin, 2009).

Levando em consideração a importância e a relevância dos fatos acima descritos, este estudo objetivou realizar a identificação fenotípica das espécies de leveduras isoladas da cavidade oral de cães e traçar o perfil de sensibilidade das mesmas frente aos principais antifúngicos utilizados na rotina veterinária, no intuito de auxiliar o tratamento de candidíases em cães e até mesmo no humano como fator epidemiológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A ciência odontológica é uma nova especialidade na medicina veterinária que vem crescendo nos últimos anos, acompanhada do desenvolvimento dos profissionais da área que buscam melhorar a qualidade de vida dos animais de estimação (Gioso; Carvalho, 2004; Santin, 2009).

Casos relacionados com problemas na cavidade oral têm ganhado significativa importância na clínica médica de pequenos animais (Roza, 2004; Santin, 2009). Devido fatores de desconhecimento do profissional ou por problemas comportamentais do animal (por exemplo, a agressividade), a anamnese da cavidade oral não é na maioria das vezes realizada, o que acaba por retardar o diagnóstico da patologia (Corrêa et al., 1998). Além disso, um animal com problemas na cavidade oral pode demorar anos para demonstrar sinais da afecção (Venturini et al., 2007).

Em geral, os animais possuem uma microbiota oral composta por variadas espécies de fungos, que em condições específicas, podem passar de saprófitos para patogênicos, comprometendo sua saúde (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002; Marinho et al., 2004). Dessa maneira, o pré conhecimento das leveduras potencialmente patogênicas pertencentes a microbiota oral dos animais é de fundamental importância, pois garante um suporte clínico auxiliar para o diagnóstico e tratamento de grande parte das enfermidades da cavidade oral (Braga et al., 2005).

2.1 Importância da saúde oral dos animais

Os distúrbios da cavidade oral têm grande importância na medicina veterinária devido a sua alta prevalência em cães e suas graves conseqüências, podendo afetar até mesmo a sua saúde sistêmica (Kyllar; Witter, 2005; Reis et al., 2011).

Em um estudo realizado nos Estados Unidos, foi visto que apenas 7% da população canina podem ser consideradas em estado de condições bucais saudáveis (Kyllar; Witter, 2005).

As anormalidades, injúrias ou afecções deste órgão podem gerar incômodo e dor, levando o animal a anorexia, pela falta de alimentação, e adipsia (a não ingestão

água), predispondo-o a condições de queda da imunidade e complicações clínicas (Venturini, 2006).

Além deste grande desconforto e do comprometimento de outros órgãos, a resposta inflamatória provocada pelas enfermidades da cavidade oral podem levar ao tecido gengival uma perda progressiva da fixação do dente ao osso alveolar e, como consequência, o afrouxamento e perda deste dente (Kyllar; Witter, 2005).

A especialidade odontologia na medicina veterinária vem evoluindo nos últimos anos, ganhando espaço na grade curricular de algumas faculdades (Duboc, 2009). Apesar de o ramo alimentício ter sofrido grandes avanços na produção de dietas que visam melhorias para a saúde oral (Kyllar; Witter, 2005), o número de profissionais que realizam um adequado exame clínico ainda não é significativo (Duboc, 2009).

Além desse fator importante, a falta de fornecimento adequado dos cuidados da higiene oral é preocupante. O desconhecimento do assunto por parte dos responsáveis acaba por dificultar a adoção de medidas preventivas, como a escovação (Kyllar; Witter, 2005; Duboc, 2009).

Segundo estudos, 95% dos cães com mais de um ano de idade possuem algum grau de afecção, e na clínica acredita-se que 100% dos animais adultos apresentam graus variáveis de doença periodontal (Duboc, 2009).

Devido a estes fatores, é possível afirmar que a saúde oral dos pequenos animais ainda necessita de maior enfoque nas pesquisas e na conscientização dos responsáveis, no que se diz respeito à alimentação, a importância da higienização bucal, e também a atenção do dono e do médico veterinário em relação a etiopatogenia da doença, do tratamento e do seu controle (Roza, 2004).

2.2 Leveduras de interesse médico

As leveduras possuem ampla distribuição, regida por vários fatores ambientais como clima, vegetação, solo, poluição, entre outros (Gambale et al., 1987).

São fungos unicelulares que, diferente dos fungos filamentosos, não formam hifas aéreas, são glabras, com textura cremosa, úmidas e membranosas. São classificadas em quatro grupos, as ascosporadas, que formam ascos com ascosporos (por exemplo, a família *Saccharomycetaceae*), o grupo das anascosporadas, que não formam ascos e ascosporos (família *Cryptococcaceae*), as balistosporadas, que apresentam balistosporos na célula vegetativa (família *Sporobolomycetaceae*) e as do grupo basidiosporadas, que possuem basidióforos e basídios, teliosporos, esporídios, promicélio e hifas septadas com e sem ansas (família *Filobasidiaceae* e *Ustilaginaceae*) (Kurtzman; Fell, 1998; Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002).

As características de brotamento das leveduras podem variar em unipolar, bipolar e multilateral, e o tipo de reprodução pode ser por cissipariedade, por brotamento único, fissão binária ou por brotamento-fissão. Em alguns casos, as gêmulas acabam por formar cadeias de células alongadas que possuem no local dos septos constrições denominadas por pseudo-hifas. Leveduras do gênero *Candida*, por exemplo, dependendo da sua condição de crescimento, produzem as chamadas pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Leveduras do gênero *Cryptococcus* se reproduzem por brotamento, produzindo hifas apenas no seu ciclo sexuado. *Malassezia spp* possuem brotamento único em base larga, já leveduras do gênero *Trichosporon* apresentam como característica o brotamento-fissão (Kurtzman; Fell, 1998; Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002).

São diversas as leveduroses que apresentam interesse para o médico veterinário, podendo provocar lesões superficiais, de pele, de mucosas e até processos granulomatosos (Figura 2.1) (Machado et al., 2004). A transição do estágio da levedura de comensal para patogênico irá depender tanto dos fatores relacionados com a virulência do agente, como também da própria suscetibilidade do hospedeiro (Gasparetto et al., 2005).

Figura 2.1 - Dachshund, fêmea, 1,5 anos. Cultura fúngica de pele positiva para *Malassezia pachydermatis*



Fonte: Machado et al. (2004)

2.2.1 Fatores predisponentes a infecção por leveduras

Os fatores que podem predispor o homem e o animal a uma infecção por leveduras são inúmeros, resultantes de alterações nos mecanismos de defesa ou por comprometimento das barreiras anatômicas de proteção do organismo (Lacaz et al., 2002; Gompertz et al., 2008a; Brito et al., 2009).

Dentre esses fatores podemos citar: estresse; uso de antibiótico de amplo espectro ou antibioticoterapia prolongada; agentes antineoplásicos; neutropenia; imunossupressão; idade (senilidade/filhote); ambiente inadequado (superlotação); uso por longo prazo de corticosteróides; deficiências nutricionais; dietas com alta concentração de carboidratos; alterações do pH, deficiência de vitamina A, tricomoníase; presença de doenças auto-imunes; alterações das barreiras anatômicas por traumas (maceração); anemia aplástica; infecções hematológicas; permanência de cateter intravenoso por longo período em pacientes críticos; pacientes transplantados;

entre outras doenças concomitantes (Tsa et al., 1992; Koneman et al., 2001; Deem, 2003; Garcia et al., 2007; Soubhia et al., 2008; Brito et al., 2009; Santin, 2009; Vieira; Coutinho, 2009; Wendisch et al., 2010).

A antibioticoterapia prolongada e a alta concentração de carboidratos na dieta acarretam a destruição ou inibição da microbiota bacteriana competitiva, rompendo o equilíbrio desta com o organismo do hospedeiro, permitindo assim o crescimento acentuado de leveduras (Lacaz et al., 2002; Soubhia et al., 2008; Vieira; Coutinho, 2009; Wendisch et al., 2010).

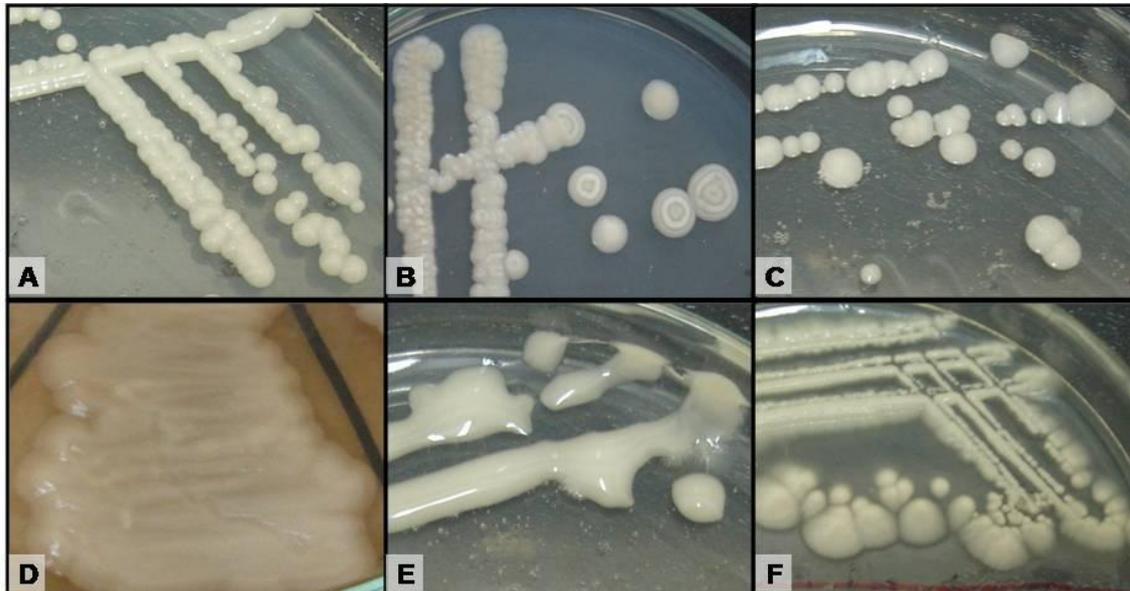
Além desses fatores, a alta concentração do microrganismo também é importante, gerando uma maior probabilidade de desenvolvimento da infecção (Scott et al., 1996).

2.2.2 Identificação das leveduras

A identificação dos fungos consta de exames macroscópicos, microscópicos e fisiológicos dos isolados (Fisher; Cook, 2001; Bentubo et al., 2013). Para uma cultura primária de uma amostra fúngica é desejável a combinação de meios de cultivo, aumentando assim a oportunidade de isolamento (Fisher; Cook, 2001).

Macroscopicamente, as leveduras podem apresentar características de colônia lisa, cremosa, mucosa ou enrugada, de coloração branca a amarelada, alguns com pigmento carotenóide e outras com aspecto amarronzado (Figura 2.2) (Koneman et al., 2001).

Figura 2.2 - Aspectos macromorfológicos das colônias de *Candida guilliermondii* (A), *Candida lipolytica* (B), *Cryptococcus uniguttulatus* (C) e *Cryptococcus laurentii* (D), *Trichosporon asahii* (E) e *Trichosporon mucoides* (F) em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 35°C, isoladas de superfície hospitalar veterinária



Fonte: Mattei (2010)

Para a identificação microscópica devem ser seguidos os seguintes critérios básicos: as características da célula fúngica e formação de pseudomicélios e/ou micélios (Kurtzman; Fell, 1998; Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002).

Candida albicans, por exemplo, é reconhecida pela sua produção de clamidoconídios de paredes espessas, em meio de baixo valor de nutrientes, de difícil assimilação, como o ágar fubá acrescido por Tween-80. A produção de micélio e de artroconídios é característica do gênero *Trichosporon*, já no gênero *Cryptococcus* é a cápsula que geralmente o representa (Lacaz et al., 2002; Paula et al., 2011; Paula et al., 2013).

Além desses aspectos macro e microscópicos, estudos bioquímicos são de extrema importância na identificação das leveduras, principalmente, na classificação das espécies. As principais provas bioquímicas estão relacionadas com o perfil fermentativo e o perfil de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Kurtzman; Fell, 1998; Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002).

2.2.3 Gênero *Candida* e Candidíase

A descoberta das leveduras presentes na microbiota dos animais vem ganhando um grande destaque na micologia médica, principalmente sobre os agentes etiológicos da candidíase (Brito et al., 2009). Nos indivíduos humanos saudáveis, espécies de *Candida* são comumente isoladas na cavidade oral, fazendo parte da microbiota deste hospedeiro (Gasparetto et al., 2005).

Entretanto, nos últimos anos, a incidência de candidíase oral em humanos vem aumentando, juntamente com a resistência aos antifúngicos (Arraes, 2012), o que torna de grande importância o conhecimento de uma possível e importante fonte epidemiológica: o cão (Gambale et al., 1987; Santin, 2009).

Assim como os fungos filamentosos, as leveduras são seres ubiqüitários, encontradas em vários nichos na natureza. O primeiro relato de isolamento de uma levedura da cavidade oral de um humano foi em 1839, por Lagenbeck, isolada a partir de aftas de um paciente com tifo (Sidrim; Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002).

Em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou esse microrganismo no gênero *Sporotrichum*. Berg, em 1846, estabeleceu definitivamente a relação desta levedura com candidíase oral. Em 1853, Charles e Robin denominaram esta levedura como *Oidium albicans*, renomeado por Zopf, em 1890, de *Monilia albicans*. Foi em 1923 que Berkhout denominou esta levedura como gênero *Candida* e *Candida albicans* (Sidrim; Moreira, 1999). Até 1963 eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* capazes de causar doença, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* variedade *stellatoidea*) e *C. guilliermondii* (Pfaller et al., 2007).

São reconhecidas hoje cerca de 317 espécies deste gênero (Lachance et al., 2011). Varias dessas espécies apresentam um potencial patogênico, classificadas como agentes oportunistas que, em virtude de um desequilíbrio das proteções física, química e imunológica, podem causar infecção em diversas espécies de animais, tanto silvestres como domésticos (Cleff et al., 2008; Soubhia et al., 2008; Brito et al., 2009; Vieira; Coutinho, 2009; Cubas; Godoy, 2010; Lachance et al., 2011).

Grande parte das leveduras do gênero *Candida* são componentes da microbiota de mucosas e pele de mamíferos, podendo estar presentes no sistema digestivo e também no sistema urinário e reprodutivo (Cleff et al., 2008; Brito et al.,

2009; Santin, 2009; Vieira; Coutinho, 2009; Cubas; Godoy, 2010; Wendisch et al., 2010). Sua relação com o hospedeiro pode ser de comensal, parasita ou saprófito, encontrada na forma de levedura e na forma de pseudohifas, um sistema vegetativo ligado ao seu desenvolvimento e absorção de alimentos (Nonaka et al., 2008; Lins, 2013).

Espécies do gênero *Candida* possuem reprodução assexuada com formação de blastoconídeos, pseudohifas e, ocasionalmente hifas verdadeiras. Este gênero está classificado na divisão Deuteromicota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem Moniliales e família Cryptococcaceae, com exceção das espécies como *C. guilliermondii* e *C. krusei*, que têm a forma sexuada ou teleomorfa conhecida, e são classificadas na subdivisão ascomycotina, classe Hemiascomycetes, ordem Endomycetales, família Saccharomycetaceae, gênero *Pichia* e gênero *Issatchenkia*, respectivamente (Kurtzman; Fell, 1998; Lacaz et al., 2002).

Candida albicans é a espécie mais comumente isolada nos casos de infecções por este gênero, podendo infectar o sistema gastrointestinal, respiratório, com predileção pela superfície de mucosas e áreas mucocutâneas, com potencial para desencadear infecção fúngica sistêmica (Lacaz et al., 2002; Gompertz et al., 2008b; Brito et al., 2009; Cubas; Godoy, 2010). Além da espécie *C. albicans*, infecções por *C. dubliniensis*, uma espécie fenotipicamente e bioquimicamente semelhante a *C. albicans*, tem sido amplamente relatadas desde sua primeira identificação no ano de 1995 (Chavasco et al., 2006).

Outras espécies encontradas são: *C. kefyr*, *C. zelanoides*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. famata*, complexo *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. utilis*, entre outras (Sidrim; Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002; Cubas; Godoy, 2010).

Essas leveduras possuem fatores relacionados a virulência como fosfolipases, proteinases e adesinas, que lisam as células do hospedeiro e facilitam a adesão (Pires et al., 1996; Menezes et al., 2013). Outro mecanismo é o “switching”, que altera a morfologia da levedura, fazendo com que a sensibilidade aos antifúngicos seja alterada (Menezes et al., 2013).

Em pequenos animais eram poucos os casos encontrados na literatura (Cleff et al., 2007; Brito et al., 2009), entretanto, os relatos de candidíases em várias espécies de animais também estão cada vez mais comuns, descritos em quadros de

piodermatite das pregas labiais, dermatite mucocutânea disseminada e localizada, infecções do trato urinário, otites, infecções sistêmicas e oral (Santin, 2009).

Recentemente, existem casos clínicos de candidíase em humanos e em animais envolvendo espécies não-*albicans*, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Cleff et al., 2007; Brito et al., 2009). Espécies como *C. guilliermondii*, complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm apresentado crescente importância nos quadros clínicos (Cleff et al., 2008), assim como as espécies *C. tropicalis*, complexo *C. glabrata* e *C. dubliniensis* (Lacaz et al., 2002; Nonaka et al., 2008).

Apesar do isolamento de *Candida spp* a partir da microbiota oral de animais saudáveis ser pouco relatado, sabe-se que esta levedura habita sítios como sistema digestivo, mucosas e pele de vários animais, até mesmo em pássaros, sendo *C. albicans* a espécie mais freqüente nestes casos (Brito et al., 2009).

As áreas mais freqüentes em caso de infecção nos pequenos animais são a pele, unhas, ouvido, trato urinário, sistema gastrintestinal e reprodutor. As enfermidades com quadros cutâneos nos animais, na maioria das vezes, não são atribuídos a levedura e sim a fungos filamentosos, bactérias e parasitas. Devido a esse fato gera-se a necessidade da realização do diagnóstico diferencial junto ao laboratorial (Brito et al., 2009).

Em cães, o primeiro relato de candidíase foi em 1949, e se tratou de um caso de dermatomicose por *C. albicans* (Reich; Nechtow, 1949). No Brasil, existem relatos de otite fúngica e dermatomicose em cães (*C. guilliermondii*), e também casos clínicos de endoftalmite causados por *C. albicans*, com etiologia por difusão hematogênica ou secundária a uma inflamação da córnea. Apesar de serem menos freqüentes, as infecções sistêmicas também podem ocorrer (Brito et al., 2009).

Os quadros de infecção urinária ocasionados por *C. albicans* em cães e gatos são caracterizados por disúria, hematúria, anorexia, depressão, aumento da freqüência de micção e pirexia (Jin; Lin, 2005). Nas dermatomicoses, os sinais clínicos apresentam lesões de contorno irregular, levemente edemaciadas e com vesículas, principalmente em áreas com dobras cutâneas como, por exemplo, nos espaços interdigitais, região perianal e prepúcio (Moretti et al., 2004). No caso das otites, tanto as de origem bacteriana como as de origem fúngica por candidíase, os sintomas são semelhantes, caracterizados pela presença de prurido, inflamação, dor, descamação e edema (Brito et al., 2009).

2.2.3.1 provas para identificação do gênero *Candida*

São vários os procedimentos que podem ser utilizados para o diagnóstico micológico das infecções ocasionadas pelas leveduras do gênero *Candida*. A identificação tem como base associação de: exame direto, isolamento em cultura, identificação por provas fenotípicas, bioquímicas e até mesmo análise molecular (Murray et al., 1992; Ferreira et al., 2002; Lachance et al., 2011; Tortora et al., 2012).

Inicialmente, o diagnóstico laboratorial para as espécies do gênero *Candida* consiste na microscopia direta para a observação de elementos fúngicos (Lacaz et al., 2002; Brito et al., 2009; Paula; Ruiz, 2010; Wendisch et al., 2010).

O material biológico pode ser cultivado em ágar Sabouraud dextrose com antibióticos, com ou sem cicloheximida, devido à sensibilidade de algumas espécies a esse inibidor de crescimento de bolores (Lacaz et al., 2002; Brito et al., 2009; Wendisch et al., 2010). O meio ágar Sabouraud dextrose possui pH baixo, inibindo o crescimento de algumas bactérias e permite o crescimento de leveduras, mantidas a 25–28°C. O cultivo deve ser examinado após 48h, sendo mantidos por 2 a 3 semanas em temperatura ambiente (Lacaz et al., 2002).

No cultivo em ágar Sabouraud dextrose é observado colônias brilhantes ou opacas, de coloração que varia de branco a creme, ligeiramente acinzentada ou rósea, com aspecto cremoso, liso, rugoso e/ou sulcado, bordas regulares ou irregulares, odor de levedo com ou sem franjas micelianas (Lacaz et al., 2002; Navarini, 2007; Gompertz et al., 2008b; Brito et al., 2009). A coloração de gram é a mais empregada em esfregaços e, para o clareamento do material clínico, é muito utilizado o hidróxido de potássio (Lacaz et al., 2002; Serracarbassa; Dotto, 2003; Gompertz et al., 2008b; Lachance et al., 2011).

Na micromorfologia, as células dessa levedura caracterizam-se por apresentarem paredes finas, com ausência de cápsula, presença de blastoconídios esféricos ou ovais, de 8 à 12µm, em freqüente brotamento, pseudo-hifas e hifas com blastoconídeos de 2 à 6 µm de diâmetro e algumas espécies podem apresentar clamidoconídios terminais ou intercalares (Raposo et al., 1996; Lacaz et al., 2002; Serracarbassa; Dotto, 2003; Gompertz et al., 2008b; Lachance et al., 2011).

Quando se utiliza meios de cultura adequados, as leveduras do gênero *Candida* crescem bem "in vitro" dentro de 24-48 horas em temperatura de 25 e 37°C (Lacaz et al., 2002).

Na micromorfologia de *C. albicans* podemos observar em microcultivo com meio ágar fubá, acrescido de Tween 80, a formação de clamidoconídios de forma esférica, com parede celular espessa, geralmente produzidos nas pontas das pseudohifas (Figura 2.3) (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002; Brito et al., 2009; Lachance et al., 2011).

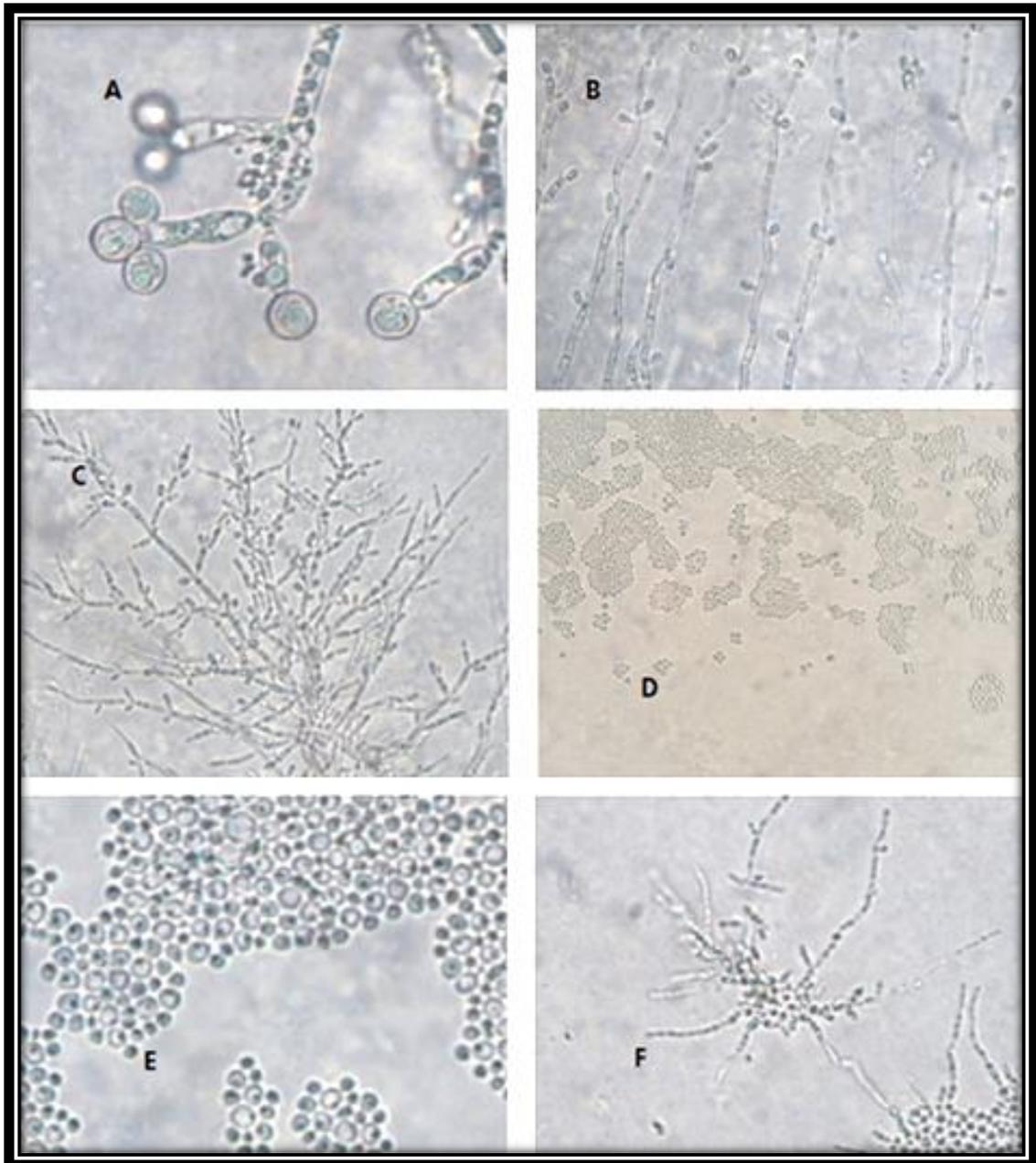
Figura 2.3 - Blastoconídios e clamidoconídios no interior das hifas da levedura *C. albicans*.



Fonte: Tortora et al. (2012)

Os clamidoconídios terminais e intercalares formados no microcultivo é uma características de *C. albicans* (Figura 2.4); já os aglomerados em cacho é característica de *C. dubliniensis* (Mattei, 2010).

Figura 2.4 - Teste de microcultivo em ágar fubá Tween 80 de espécies de *Candida* isoladas de onicomioses em pacientes com HIV. Nota: A *Candida albicans*; B *C. tropicalis*; C *C. parapsilosis*; D *C. glabrata*; E *C. famata*; F *C. guilliermondii*

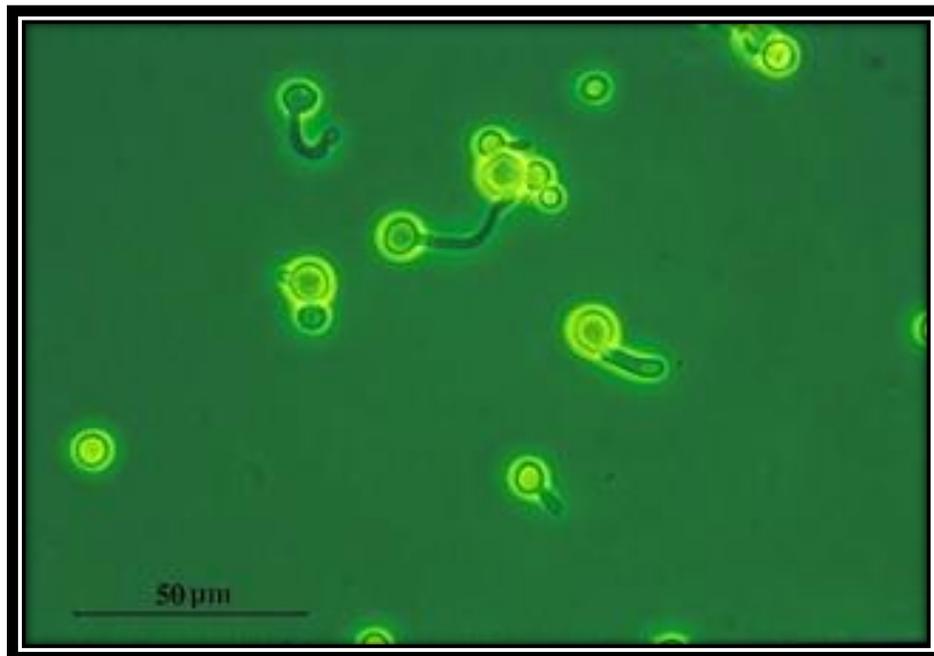


Fonte: Mattei (2010)

Outro método de identificação é a prova de formação de tubo germinativo. Esta estrutura é formada em um blastoconídeo sem constrição (Koneman et al., 2001). Sua

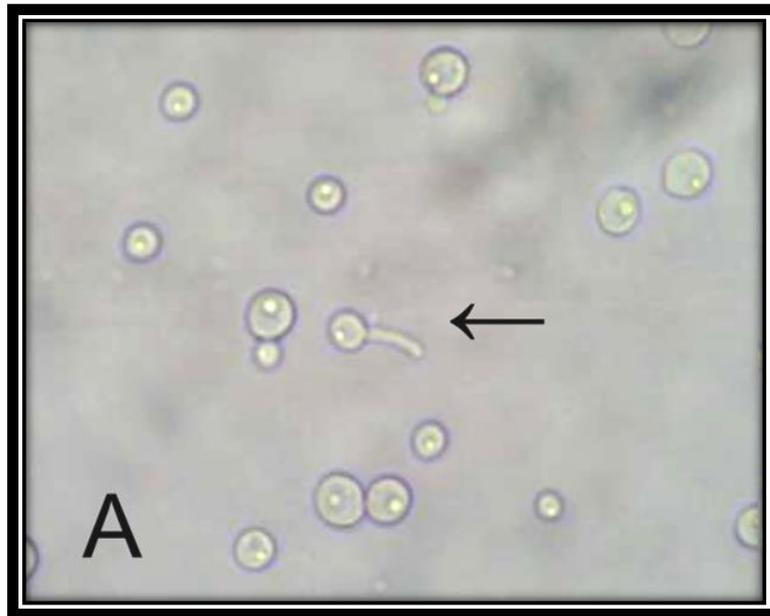
formação pode ser observada utilizando soro de cavalo, soro fetal bovino, entre outros substratos (Lacaz et al., 2002) (Figura 2.5 e 2.6). A leitura é realizada por observação em microscópio óptico após 2 a 3 horas de incubação da amostra diluída no soro, e em temperatura de 37°C (Lacaz et al., 2002; Melo, 2002; Neufeld, 2009; Paula; Ruiz, 2010). A presença do tubo germinativo caracteriza as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* e, a ausência, caracteriza as demais espécies do gênero *Candida* (Mattei, 2010; Paula; Ruiz, 2010). *C. tropicalis* apresenta pseudo-hifas precoces, que podem ser confundidas com tubos germinativos (Koneman et al., 2001).

Figura 2.5 - Formação de Tubo germinativo, característica da espécie *Candida albicans*



Fonte: La Candidiasis (2016)

Figura 2.6 - Formação do tubo germinativo (A - seta)



Fonte: Rocha et al. (2011)

Para a diferenciação entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* existe ainda a prova de termotolerância, onde se incuba as culturas a 42°C e 45°C. Nestas condições, apenas *C. albicans* tem a capacidade de sobrevivência (Paula; Ruiz, 2010).

A variabilidade de comportamento das diferentes espécies de *Candida*, a indisponibilidade de tempo para a diferenciação destas espécies, trouxe a necessidade de desenvolvimento de métodos comerciais de fácil manipulação, identificação rápida e precisa das espécies (Navarini, 2007; Paula; Ruiz, 2010). Existem hoje, técnicas de identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida*, como por exemplo, o meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®, que diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias. Este meio de cultura é muito útil para a purificação e separação de diferentes colônias e rápido diagnóstico presuntivo (Navarini, 2007; Brito et al., 2009; Paula; Ruiz, 2010; Lachance et al., 2011).

A cor das colônias de *C. albicans* no meio CHROMAGAR *Candida*® são verdes, as de *C. tropicalis* são escuras e azuladas, com um halo púrpura-marrom, e as de *C. krusei* aparecem com centro róseo e bordos brancos (Melo, 2002; Araujo et al., 2005; Navarini, 2007; Viana; Carvalho, 2012). *C. dubliniensis* apresenta crescimento da colônia em tonalidade verde escuro (Paula; Ruiz, 2010; Viana;

Carvalho, 2012). As colônias do complexo *C. glabrata* apresentam coloração de rosa a violeta e as demais espécies variam entre colônias de coloração branca e rosa (Melo, 2002; Ribeiro et al., 2009; Viana; Carvalho, 2012).

Como principais métodos de identificação espécie-específica do gênero *Candida*, existem as provas bioquímicas (Koneman et al., 2001; Brito et al., 2009; Wendisch et al., 2010). Dentre os testes laboratoriais utilizados para identificação bioquímica de leveduras, podemos destacar: provas de assimilação de fontes de carboidratos e nitrogênio (Auxanograma); e provas de fermentação de fontes de carbono (Zimograma) (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002; Serracarbassa; Dotto, 2003; Gompertz et al., 2008b; Soubhia et al., 2008; Lachance et al., 2011).

O auxanograma é composto por provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, que determinam a capacidade das diferentes espécies de se desenvolverem a partir dos diferentes substratos. Os principais açúcares utilizados neste teste são: glicose, manitol, inulina, ramnose, L-arabinose, celobiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melibiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose. A assimilação positiva é caracterizada pelo crescimento da levedura (presença de halo) ao redor da fonte de carbono e nitrogênio, e a identificação é realizada de acordo com os resultados pré determinados por cada espécie (Koneman et al., 2001; Atique, 2006; Brito et al., 2009; Lachance et al., 2011).

Como fontes de nitrogênio para verificação da assimilação, são utilizadas a peptona e o nitrato de potássio, incubados a 30°C, com leitura de 24 a 96 horas (Koneman et al., 2001; Atique, 2006; Lachance et al., 2011).

O teste bioquímico que avalia a capacidade de uma levedura em fermentar determinado açúcar, em baixas tensões de oxigênio, é o teste de zimograma. Este teste é realizado em meio líquido, acrescido de diferentes açúcares em tubos de ensaio com tubos de Durham no interior. Os principais carboidratos utilizados neste teste são dextrose, sacarose, maltose, galactose, lactose, trealose e rafinose, e a incubação é feita a 30°C por até 15 dias. Quando se tem a produção de gás carbônico, formam-se bolhas no interior do tubo de Durham, indicando positividade de fermentação da levedura para o determinado açúcar utilizado (Atique, 2006; Brito et al., 2009).

O primeiro sistema comercial de testes bioquímicos desenvolvido foi o API 20C AUX, e, posteriormente, o sistema API 32C. Trata-se de sistemas de identificação

rápidos, baseados na capacidade das leveduras em assimilarem fontes de carbono (Brito et al., 2009).

Um método de identificação mais sensível e específico é através de biologia molecular. Os métodos moleculares como o PCR ("polimerase chain reaction") têm fornecido suporte aos taxonomistas para definição de agrupamentos taxonômicos. Entretanto, trata-se de testes complexos e de alto custo, não sendo utilizados na rotina laboratorial (Paula; Ruiz, 2010).

2.2.3.2 tratamento das candidíases

Diferentes drogas antifúngicas são utilizadas para o tratamento das candidíases em animais (Brito et al., 2009). Nas clínicas de pequenos animais o cetoconazol é um dos fármacos mais utilizados, pois apresenta amplo espectro de atividade, englobando várias espécies de *Candida* e dermatófitos. Possui várias apresentações para uso veterinário e representa uma alternativa economicamente viável. Entretanto, a atividade deste fármaco tem mostrado certa resistência por parte das leveduras (Cleff et al., 2007; Brito et al., 2009).

Os triazólicos vêm recebendo também grande destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, devido também ao seu largo espectro de ação e reduzidos efeitos tóxicos; entretanto, tem aumentado a resistência por este fármaco, principalmente pelas leveduras do gênero *Candida*. O fluconazol também é utilizado para o tratamento de endoftalmites por *Candida spp*. Nos casos de infecções urinárias o derivado azólico mais utilizado é o itraconazol, que ainda mostra ser eficiente também nas candidíases sistêmicas, superficiais e refratárias (Brito et al., 2009).

Em casos de infecções sistêmicas, acometendo diferentes espécies de animais, o uso de anfotericina B, uma droga que atua na membrana da célula fúngica, tem mostrado grande eficiência contra cepas de *Candida spp*, isoladas de bovinos com mastite (Brito et al., 2009). Porém, devido o seu custo elevado e dos severos efeitos colaterais, como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, mielotoxicidade e cardiotoxicidade, este fármaco é pouco empregado (Brito et al., 2009; Lins, 2013).

Atualmente, estudos mostram que vem crescendo a incidência de candidíase, com alto percentual de mortalidade e de cepas resistentes aos antifúngicos,

comumente usados na prática clínica (Nunes et al., 2011). Frente a isso, somente o conhecimento do perfil de sensibilidade das leveduras permitirá uma conduta segura de tratamento tanto em animais como em humanos (Nunes et al., 2011; Menezes et al., 2013).

Outro fator que tem dado origem a casos alarmantes de resistência aos antifúngicos, entre as espécies de *Candida*, é a administração por períodos prolongados do fármaco em casos de infecção e o uso profilático dos antifúngicos tais como a anfotericina B e os azóis menos tóxicos (Pfaller et al., 1995; Matsumoto et al., 2007).

2.2.4 Gênero *Trichosporon* e Trichosporose

O gênero *Trichosporon* está classificado na divisão Deuteromycota, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales* e família *Moniliaceae* (Sidrim; Rocha, 2004).

São 37 as espécies que habitam diferentes nichos ecológicos, podendo ser encontradas em água, solo e superfícies corpóreas de humanos e animais (Fisher; Cook, 2001; Bentubo et al., 2013). Várias espécies são capazes de causar infecções superficiais e profundas, destacando *Trichosporon asahii*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. inkin*, *T. asteroides* e *T. cutaneum* (Framil, 2010; Bentubo et al., 2013).

O gênero em questão é caracterizado pela formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas, apresentado semelhança entre as espécies (Figura 2.7). Devido a esse fato a busca de métodos rápidos de diferenciação das espécies, vem sendo utilizado como meio CHROMAGAR *Candida*®, mas que ainda não demonstrou ser um método específico para este gênero (Bentubo et al., 2013).

Figura 2.7 - Cultivo de *Trichosporon beigeli* em lâmina apresentando hifas artrosporadas e blastoconídios (160x-A e 400x-B)



Fonte: Lacaz et al. (2002)

O isolamento desta levedura é feito em meio de ágar-Sabouraud dextrose, com temperatura de 25°C a 30°C, após 2 a 5 dias (Lacaz et al., 2002; Framil, 2010). A espécie *T. beigeli* é sensível a cicloheximida e sua colônia apresenta coloração branca a creme, podendo se tornar amarelo-acinzentada com o tempo; com superfície lisa, tornando-se enrugada e elevada, com pregas centrais, envolvidas por sulcos rugosos (Fisher; Cook, 2001; Bentubo et al., 2013). Na micromorfologia pode-se observar hifas hialinas e septadas que se fragmentam em artroconídios retangulares, ovoides ou redondos, com presença de blastoconídeos (Lacaz et al., 2002; Framil, 2010). Pseudo-hifas também podem ser formadas a partir de cadeias de blastoconídios (Fisher; Cook, 2001).

Leveduras do gênero *Thichosporon* não demonstram capacidade de fermentação de carboidratos e a maioria das cepas apresenta reação positiva para o teste de produção da urease (Fisher; Cook, 2001).

Uma das principais micoses superficiais relacionadas com *Thichosporon spp*, em humanos, é a piedra branca, caracterizada pela presença de nódulos claros e aderentes ao pêlo (Fisher; Cook, 2001; Lacaz et al., 2002; Sidrim; Rocha, 2004). As infecções invasivas são geralmente precedidas da colonização do trato gastrointestinal ou respiratório (Sidrim; Rocha, 2004). Além destas manifestações

clínicas, endocardite, septicemia, abscesso cerebral e infecções pulmonares também podem ser causadas por espécies do gênero *Trichosporon* (Fisher; Cook, 2001).

Segundo Mattei (2010), ainda não foram encontrados relatos de infecção por leveduras do gênero *Trichosporon* em animais. Entretanto, alguns autores consideram a possibilidade da transmissão da doença por contato com animais domésticos (Framil, 2010).

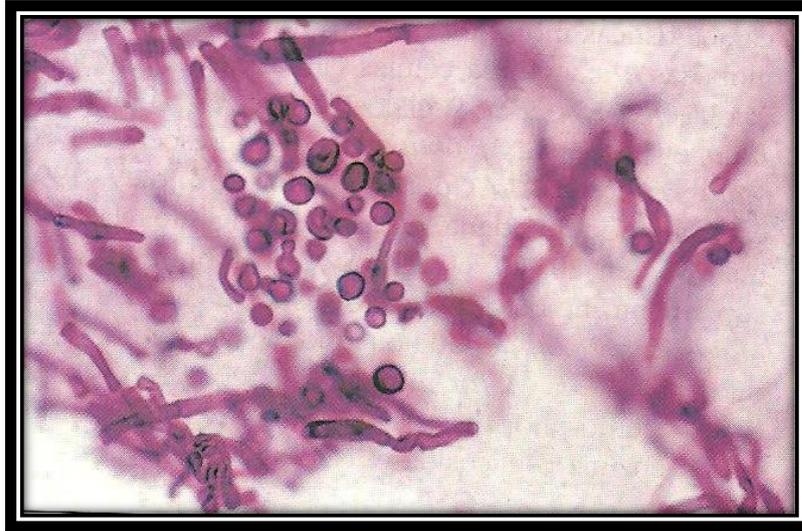
2.2.5 Gênero *Malassezia* e Malasseziose

O gênero *Malassezia* compreende leveduras lipofílicas que fazem parte da microbiota cutânea do homem e dos animais (Coutinho et al., 1997; Fisher; Cook, 2001).

Apesar de serem leveduras consideradas como comensais da pele e mucosa dos mamíferos, são microrganismos oportunistas, e em algumas circunstâncias, levam a manifestações clínicas (Coutinho et al., 1997; Gandra et al., 2006; Gandra et al., 2008).

Malassezia spp. pertencem a divisão *Basidiomycota*, subdivisão Basidiomycotina, pertencente a classe *Hymenomyces*, ordem *Tremellales* e família *Filobasidiaceae* (Sidrim; Rocha, 2004). Essa levedura é caracterizada por células esféricas ou elipsoides, com brotamento único e em base larga (Figura 2.8), lipofílica, podendo ou não ser lipodependente (Lacaz et al., 2002; Mattei, 2010).

Figura 2.8 - *Malassezia furfur*. Coloração de escamas epidérmicas pelo método de PAS. Formas arredondadas, pseudohifas com brotamento (1000x)



Fonte: Lacaz et al. (2002)

O gênero em questão possui 12 espécies descritas, *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M.globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*; *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. japonica* e a *M. baillon*, sendo que destas espécies, 10 são lipofílicas (Framil, 2010; Melhem et al., 2010).

O seu isolamento no meio ambiente não é freqüente, pois, para sua sobrevivência, grande parte das espécies necessita da presença de uma fonte lipídica, com exceção da espécie *M. pachydermatis*, que é capaz de crescer em ágar Sabouraud dextrose sem a adição de suplemento lipídico (Sidrim; Rocha, 2004; Gandra et al., 2008).

Uma grande variedade de manifestações clínicas em mamíferos tem sido associada com *Malassezia spp*, particularmente em casos de otite e dermatite em cães (Coutinho; Paula, 2000; Gandra et al., 2008). Em 80% dos casos de otite externa em cães, a espécie *M. pachydermatis* é a mais freqüente (Gandra et al., 2008).

O meio de cultura utilizado para o isolamento de espécies desse gênero deve ser enriquecido com lipídeos, e a incubação feita a 32°C a 35°C, por 15 dias (Framil, 2010). A morfologia macróscópica das colônias revela uma coloração de crescimento branco-amarelada, brilhantes ou pastosas (Fisher; Cook, 2001; Framil, 2010); passando á marrom-alaranjado, de superfície em forma de cúpula ou redonda, de textura friável, seca e granulosa (Mattei, 2010).

Malassezia pachydermatis é a mais estudada em animais, presente principalmente em cães e gatos, especialmente, no tegumento cutâneo e no meato acústico externo, descrita como um dos principais agentes causadores de otites em cães (Bond et al., 2000; Mattei, 2010).

A infecção humana cutânea ocasionada pela espécie *M. furfur* é conhecida como pitíriase versicolor ou tinea versicolor (Fisher; Cook, 2001; Lacaz et al., 2002; Gandra et al., 2006; Gandra et al., 2008). Esta enfermidade possui distribuição mundial, com maior frequência em áreas de clima tropical ou subtropical, sendo mais frequentemente isolada nas áreas seborréicas do corpo, como a região torácica, parte superior das costas, pescoço e braços (Fisher; Cook, 2001; Sidrim; Rocha, 2004; Gandra et al., 2006).

A forma sistêmica dessa levedurose é conhecida por Malasseziose e afeta, principalmente, os pacientes imunodeprimidos, sendo o coração e o pulmão os órgãos mais acometidos (Framil, 2010).

Testes moleculares para o diagnóstico rápido de afecções por esta levedura ainda não obtiveram significativos avanços e, dessa maneira, sua aplicação clínica e terapêutica ainda está por ser definida (Melhem et al., 2010).

Como medida preventiva para evitar recidivas das enfermidades provocadas por *Malassezia pachydermatis* está o teste de sensibilidade aos antifúngicos (Nobre et al., 2002). Em 2001, Coutinho e Paula (2001), determinaram a sensibilidade da espécie *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, flucitocina, fluconazol e itraconazol, pelo método de "Etest". Dentre estes antifúngicos, apenas a flucitocina não se mostrou eficaz (Coutinho; Paula, 2001).

2.3 Leveduras isoladas do trato digestivo de cães

Segundo Braga et al. (2005), o conhecimento da microbiota oral humana e de animais ainda não está descrita completamente, devido a sua grande complexidade e diversidade. Nos cães, a mucosa oral é classificada como o segundo sítio que alberga leveduras (Brito et al., 2008).

No estudo de Braga et al. (2005) foi analisada a microbiota periodontal de 29 cães da raça pastor alemão. Pode se observar que a composição da microbiota

desses animais era de 56,4% de bactérias anaeróbicas estritas; 35,1% de anaeróbicas facultativas; 6,4% de aeróbicas estritas e 1,6% de leveduras (*M. pachydermatis* e *Rhodotorula spp*).

Brito et al. (2008) conduziu um estudo no qual foram isoladas, a partir da mucosa oral de 203 cães, 75 cepas de leveduras, sendo 69 classificadas como *M. pachydermatis*, quatro como *C. parapsilosis*, uma como *C. tropicalis* e uma como *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo Bentubo et al. (2010) as principais espécies de fungos relacionadas com a colonização de cavidades naturais em cães foram: *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Geotrichum spp.*, *Trichosporon spp*, *Rhodotorula spp.*, *Cladosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Malassezia spp.*, *Microsporum spp.*, *Penicillium spp.* e *Scopulariopsis spp*.

Em estudo com cães que apresentavam alergia atópica, Nardoni et al. (2007), isolaram da cavidade oral *M. pachydermatis*. Canizzo et al. (2007) isolaram da cavidade oral *M. pachydermatis* e demonstraram a capacidade desta levedura em formar biofilme. Essa formação de biofilme já foi demonstrada também em várias espécies de *Candida* (Gasparetto et al., 2005).

Também foram descritas, como fazendo parte da microbiota oral de cães os fungos: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. viswanathii*, *C. glabrata*, *Aureobasidium pullulans* e *Debaryomyces nepalensis* (Moretti et al., 2007). No trabalho de Jadhav e Pal (2006) *C. albicans* foi isolada da mucosa oral de cães com sinais de gengivite e estomatite.

Santin (2009) isolou da cavidade oral de 59 cães, 61 amostras de leveduras pertencentes a 11 espécies diferentes, estas foram: *M. pachydermatis*, *Rhodotorula spp*, *Candida albicans*, *C. catenulata*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. intermedia*, *Trichosporon asahii*, *T. mucoide* e *Cryptococcus albidus*.

Segundo Greene (2006), os principais microrganismos presentes na cavidade oral normal de cães pertencem aos gêneros *Actinomyces*, *Bacterioides*, *Candida*, *Fusobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria* e *Propionibacterium*.

Em pequenos animais, a estomatite fúngica é menos freqüente, porém quando ocorre, observam-se espécies do gênero *Candida*. As candidíases podem estar associadas com inflamação oral difusa, especialmente na língua e nas junções mucocutâneas (Greene, 2006).

Leveduras do gênero *Candida* também já foram isoladas do trato digestivo de diversas espécies de aves, sendo transportadas na cloaca desses animais, podendo assim disseminar esse fungo no ambiente (Brito et al., 2009). Além dessa levedura, Nascimento (2013), pesquisou na cloaca e no Inglúvio de papagaios da espécie *Amazona aestiva* leveduras do gênero *Cryptococcus*.

Já foram descritas diferentes espécies de leveduras presentes na mucosa vaginal, anal, pele, meato acústico externo, espaço interdental, e na mucosa oral de cães. Entretanto, são raros os trabalhos de identificação e testes de sensibilidade das espécies frente aos antifúngicos comumente utilizados na medicina veterinária (Santin, 2009).

2.4 Testes de sensibilidade aos Antifúngicos

2.4.1 Resistência a Antifúngicos

Os crescentes dados de aumento de resistência dos fungos frente as drogas antifúngicas vem causando grande preocupação para médicos humanos e veterinários (Navarini, 2007; Brito et al., 2009).

As micoses de caráter invasivo e de difícil tratamento vêm crescendo, estando geralmente associadas a diversos fatores como a queda da imunidade dos pacientes, o uso indiscriminado de antibióticos (Cury, 2010) e o uso empírico de terapias antifúngicas, levando a resistência das leveduras aos antifúngicos (Navarini, 2007; Lins, 2013).

A resistência dos fungos frente aos antifúngicos pode ser classificada em resistência clínica e microbiológica (Perea; Patterson, 2002; Neufeld, 2009; Cury, 2010; Lins, 2013).

O conceito de resistência clínica é definido quando se tem a persistência ou progressão de uma infecção fúngica mesmo com a administração do fármaco escolhido como adequado (Perea; Patterson, 2002; Neufeld, 2009; Cury, 2010; Lins, 2013). Neste caso, testes "in vitro" podem indicar a sensibilidade do agente ao antifúngico. Normalmente, a ocorrência da resistência clínica está associada a fatores

do hospedeiro, iatrogênicos, farmacológicos e fatores relacionados a virulência do fungo (Cury, 2010).

A resistência microbiológica é um fenômeno no qual o agente etiológico consegue se desenvolver na presença de concentrações terapêuticas dos antifúngicos, capacidade verificada "in vitro". Pode ser intrínseca, quando nenhum membro de uma espécie é sensível; primária, quando em uma espécie normalmente sensível a um antifúngico encontramos cepa resistente, sem exposição ao mesmo e resistência secundária ou adquirida, quando uma cepa previamente sensível desenvolve resistência após exposição a uma droga, por alterações fenotípicas ou genotípicas (Mellado et al., 2002; Melhem, 2004; Melhem; Szeszs, 2010).

O mecanismo de resistência aos antifúngicos pelos fungos, tanto para resistência clínica ou microbiológica, está envolvido com respostas celulares, bioquímicas e/ou moleculares. No mecanismo celular ocorre a troca de cepas ou espécimes sensíveis por endógenas resistentes, alteração genética, fato que garante resistência secundária, expressão genética transitória e alteração no tipo celular. Em relação ao mecanismo bioquímico, ocorrem alterações fenotípicas nos fungos, permitindo que a absorção da droga seja mais lenta, que altere o sítio alvo e que aumente a excreção da droga (Cury, 2010).

As alterações do ponto de vista molecular fazendo com que ocorra uma ampliação gênica, mutações, entre outras modificações em gene envolvidas na defesa contra o antifúngico. Além dessas alterações, outra alternativa molecular de resistência é a capacidade de formar biofilmes, uma barreira física eficiente (Cury, 2010).

A maior variabilidade fenotípica das espécies de *Candida*, por exemplo, junto com o aumento da resistência de cepas aos antifúngicos, assumiu papel de destaque como problema clínico (Melo, 2002). As diferentes espécies dessa leveduravariam com relação a sua sensibilidade aos antifúngicos existentes no mercado, fato que mostra a grande importância da identificação e a determinação da CIM (St-Germain et al., 2001; CLSI, 2008). Devido a este aspecto, o desenvolvimento de métodos padronizados de sensibilidade "in vitro" é de vital importância e servem como um guia para indicar a escolha terapêutica, monitorar a eficácia do antifúngico e diminuir a formação de cepas resistentes (St-Germain et al., 2001; CLSI, 2008; Nunes et al., 2011).

2.4.2 Determinação da sensibilidade a antifúngicos

O parâmetro mais utilizado para a determinação da sensibilidade aos antifúngicos é a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de um agente antifúngico que inibe o crescimento do fungo (Navarini, 2007; EUCAST, 2008; Purisco, 2010). A partir do valor de CIM, a amostra de levedura é classificada segundo os *breakpoints* estabelecidos pelos comitês internacionais, que permite a caracterização do fungo em sensível, intermediário, sensibilidade dependente a dose e resistente (CLSI, 2002; CLSI, 2008).

A crescente diminuição da susceptibilidade das leveduras aos derivados azólicos é observada em muitas das espécies de *Candida não albicans*, acarretando um grande desafio para um tratamento eficaz da candidíase (Bonifácio; Souza et al., 1990; Lins, 2013).

Devido ao interesse pela busca do perfil de sensibilidade de cepas fúngicas, o Comitê Nacional de Padronização Laboratorial - NCCLS (atualmente CLSI - "Clinical and laboratory standards institute") publicou em 1992 o documento M27, para testes de sensibilidade "in vitro" para as leveduras, em especial, para *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans* (Linares et al., 2004). Em 2002, o documento M27A passou por alterações, sendo aprovado então o documento M27-A2 (Arendrup et al., 2001; Acikgoz et al., 2004).

O M27-A2 estabelece valores de referência para a realização dos testes de sensibilidade "in vitro" por métodos de macro e microdiluição em caldo. Para avaliar a eficácia de alguns antifúngicos, este documento define também a interpretação da CIM (Sanglard, 2002). Em 2008, o documento M27-A3 (com o suplemento M27-S3) foi publicado pelo "Clinical and laboratory standards institute" (CLSI), que inclui os valores de sensibilidade e resistência às drogas caspofungina e anidulafungina para os ensaios de sensibilidade para *Candida spp* e *Cryptococcus spp* (CLSI, 2008), diante dos antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol e os da classe equinocandinas (Melhem; Szeszs, 2010).

Em 2002 o subcomitê europeu, European Committee on Antibiotic Susceptibility (AFST-EUCAST), publicou técnicas sobre antifúngicos e métodos de

determinação de resistência. Em 2008, o E. Def. 7.1, que descreve método de microdiluição para leveduras como as espécies de *Candida*, teve uma atualização sob mesma designação (E Def 7.2). Esta metodologia apresenta algumas alterações em relação ao método de referência do CLSI como: maior concentração de células para inóculo da levedura, meio de cultura com 2% de glicose, uso de placas de microtitulação de fundo plano e leitura em espectrofotômetro, que permite maior objetividade na leitura dos resultados e menor tempo de incubação da reação (AFSTEUCAST E Def 7.2, 2008, disponível em www.eucast.org, acessado em 2/11/2015) (EUCAST, 2008; Melhem; Szeszs, 2010). Atualmente, foi publicado o documento E. Def. 7.3 (2015), disponível em http://www.eucast.org/ast_of_fungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/.

A determinação da sensibilidade de um fungo aos antifúngicos pode ser determinada também por métodos comerciais, pelos quais podem ser determinados parâmetros para as variáveis como: tamanho do inóculo, temperatura, duração de incubação, meio de cultura e critério de leitura (Navarini, 2007; Brito et al., 2009; Melhem; Szeszs, 2010). Um exemplo de método comercial é o "Etest", uma excelente alternativa para a rotina laboratorial, de resultado rápido e compatível com os testes preconizados pelo CLSI (Navarini, 2007; Brito et al., 2009).

2.4.3 Método comercial "Etest®"

Os testes de sensibilidade utilizando meio sólido como o método comercial "Etest" são de real interesse em várias pesquisas e na rotina laboratorial. É uma excelente técnica de determinação da sensibilidade aos antifúngicos "in vitro", simples, de fácil execução, com resultados rápidos, não necessitando de equipamentos de custos elevados ou especializados (Pfaller et al., 1995; Silva et al., 2002; Matsumoto et al., 2007; Navarini, 2007).

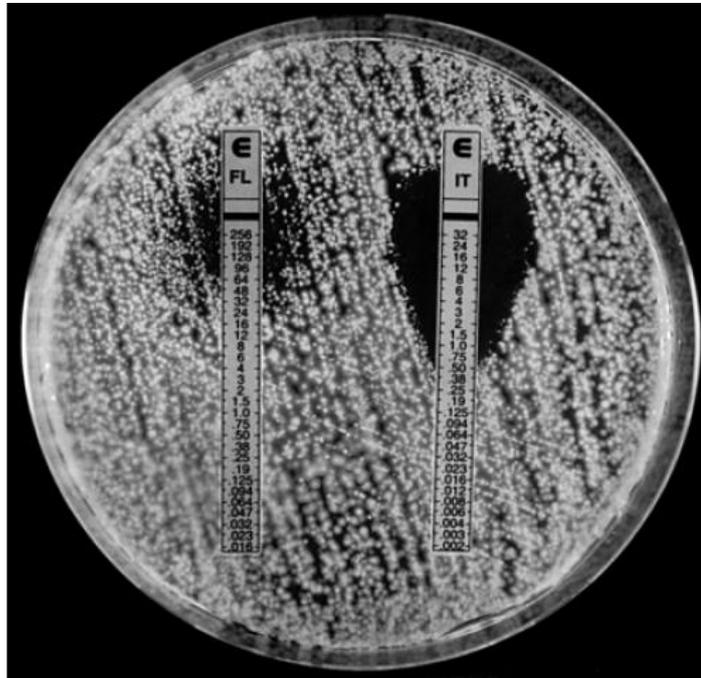
O "Etest" é baseado em uma combinação de conceitos de testes de diluição e difusão que quantifica diretamente a sensibilidade antifúngica (Navarini, 2007). Ele consiste em fitas contendo concentrações pré-estabelecidas do agente antifúngico, que são colocadas em meio sólido e com a amostra da levedura. Quando a fita é aplicada na placa, ocorre a liberação imediata do fármaco, dessa maneira a CIM é

determinada pela intersecção da hipérbole inibitória formada pelo crescimento da levedura na placa (Figura 2.9) (Melo, 2002; Navarini, 2007).

Devido o fato dos valores de CIM do "Etest" serem diretamente proporcionais aos valores referenciados pelo CLSI de diluição, este método tem boa correlação com este teste, entretanto, pode mesmo assim, apresentar diferenças inerentes ao processo (Navarini, 2007).

A classificação por este método determina o isolado em sensível, sensibilidade dose dependente e em resistente (Melhem; Szeszs, 2010).

Figura 2.9 - "Etest" para fluconazol e itraconazol



Fonte: Navarini (2007)

Em um de seus estudos, Matsumoto et al. (2007), comparou resultados de dois métodos de avaliação da sensibilidade aos antifúngicos, o AFST-EUCAST e o "Etest", para as mesmas cepas de leveduras. Ambos os testes mostraram confiabilidade, porém não 100% concordantes, o que demonstra uma maior necessidade de estudo e de padronização das CIMs (Matsumoto et al., 2007).

Existem vários outros métodos comerciais além do "Etest", porém apenas este e o ATB Fungus 2 (Api-BioMérieux, França) possuem distribuição aqui no Brasil. Ambos são considerados de boa reprodutibilidade e de indiscutível capacidade de

detecção da resistência "in vitro" aos azóis, principalmente, ao fluconazol (Melhem; Szeszs, 2010).

2.4.4 Principais Antifúngicos utilizados na medicina veterinária

As drogas antifúngicas utilizadas na medicina humana e veterinária possuem características especiais quanto a estrutura química e ao mecanismo de ação, interferindo diretamente ou indiretamente na célula fúngica, com ações fungistáticas ou fungicidas (Nobre et al., 2002; Appelt; Cavalcante, 2008).

Para o tratamento das infecções fúngicas por leveduras existem então diferentes fármacos, que podem ser divididos em três grupos de acordo com sua forma de ação: 1- os que alteram a parede celular (equinocandinas), 2- os que atuam interrompendo os processos celulares vitais para a célula, inibindo a mitose (benzofurano), 3- os que agem na função da membrana citoplasmática (polienos, azóis, tiocarbamatos, alilaminas e morfolinás) e 4- os que atuam contra ácidos nucleicos (pirimidina) (Cury, 2010).

Dentre as drogas antifúngicas existentes, as mais utilizadas e conhecidas são os derivados poliênicos, imidazólicos, pirimidínicos, sulfamídicos, benzofurênicos e outros compostos com grau de sucesso variado, como iodetos, tiosulfatos, sulfetos e tolnaftatos (Pappas et al., 2003; Pappas et al., 2009; Purisco, 2010).

No tratamento das infecções fúngicas invasivas são utilizados principalmente as classes de antifúngicos polienos (ex. anfotericina B), os azóis (fluconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol, posaconazol), as pirimidinas (5-fluorocitosina) e as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) (Pappas et al., 2003; Pappas et al., 2009).

Os azóis possuem largo espectro de ação e são muito utilizados na prática clínica da medicina veterinária no tratamento das infecções fúngicas (Appelt; Cavalcante, 2008). Estruturalmente, essa classe, descoberta em 1949, apresenta um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos, com ação fungistática ou fungicida dependente da concentração utilizada (Appelt; Cavalcante, 2008; Nobre et al., 2002). Quando em doses baixas, possuem uma atividade fungistática e, quando em alta

concentração, danificam rapidamente a membrana da célula fúngica, causando assim um efeito fungicida (Appelt; Cavalcante, 2008).

Nos animais, o uso de cada um desses antifúngicos é bastante variado e sua recomendação e dose irão depender muito do agente etiológico em questão e dos efeitos colaterais da droga, como por exemplo, mostram as Tabelas 2.1 e Quadro 2.1 (Nobre et al., 2002).

Tabela 2.1 - Indicações e dosagens dos antifúngicos para uso sistêmico nas micoses superficiais, subcutâneas e profundas de cães e gatos

ANTIFÚNGICOS	MICOSE			
	SUPERFÍCIAIS (mg/kg/dia)		SUBCUTÂNEAS E PROFUNDAS (mg/kg/dia)	
	CÃES	GATOS	CÃES	GATOS
Cetoconazol	5-30	5-30	10-30	10-30
Itraconazol	até 5	1,5-3	10-20	10-20
Fluconazol	2,5-5,5	2,5-5	2,5-5,5	2,5-5
Terbinafina	-	Até 20*	-	-
Griseofulvina	25-50	25-50	-	-
Flucitosina	-	-	125-250	125-250
Anfotericina B	-	-	0,2-0,8**	0,1-0,8**

* a cada 24 ou 48 horas;
** deve ser avaliado a condição geral do animal para estipular o intervalo entre doses.

Fonte: Nobre et al. (2002)

Quadro 2.1 - Indicações dos antifúngicos mais freqüentemente utilizados nas micoses em animais

ANTIFÚNGICOS	MICOSES
Captan	Dermatofitose
Solução de iodo, tolnaftato e tolclolato	Dermatomicoses
Iodeto de potássio	Esporotricose
Clotrimazol	Otites fúngicas, dermatofitose, malassezioses, candidoses e aspergilose nasal
Econazol	Dermatofitose, malassezioses e candidoses
Miconazol	Dermatofitose, malassezioses, candidoses, mastite fúngica bovina, queratomicoses de eqüinos
Enilconazol	Aspergilose aviária, aspergilose nasal de caninos e eqüinos, dermatofitose e malasseziose
Cetoconazol	Micoses superficiais, subcutâneas e sistêmicas
Itraconazol	Micoses superficiais subcutâneas e sistêmicas
Fluconazol	Micoses superficiais, subcutâneas e sistêmicas
Voriconazol*	Micoses sistêmicas, principalmente na candidose, aspergilose e criptococose em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou quando houve resistência para outro antifúngico
Posoconazol*	Micoses sistêmicas, principalmente na aspergilose, em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou em falha de outro antifúngico
Terbinafina	Dermatofitose
Flucitosina	Criptococose
Anfotericina B	Micoses sistêmicas
Nistatina	Micoses superficiais, otites e metrites, principalmente candidose
Nistatina Lipossomal	Micoses sistêmicas, principalmente na candidose, criptococose e aspergilose em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou quando houve resistência para outro antifúngico
Natamicina	Mastites fúngicas bovinas e queratomicose de eqüinos
Griseofulvina	Dermatofitose
Pneumocandinas e Echinocandinas *	Micoses sistêmicas, principalmente em candidose e aspergilose em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou quando houve resistência para outro antifúngico

*Antifúngicos em fase I, II ou III de estudo para liberação comercial do medicamento

Fonte: Nobre et al. (2002)

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, reação importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular fúngica (Nobre et al., 2002; Appelt; Cavalcante, 2008). Devido sua metabolização ser principalmente por via hepática, os efeitos colaterais comumente observados quando utilizado por via sistêmica são náuseas e vômitos, e quando

utilizados por via tópica são eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas (Nobre et al., 2002).

Os antifúngicos derivados de imidazóis e triazóis, por serem estruturalmente relacionados, possuem espectro e mecanismos de ações similares (Campos et al., 2009). Entre esses derivados, os triazóis têm recebido maior destaque na medicina veterinária, representando um grupo de antifúngicos de grande eficiência e de baixa toxicidade em mamíferos (Appelt; Cavalcante, 2008; Nobre et al., 2002). Entretanto, decorrente da sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Candida* (Nobre et al., 2002).

O cetoconazol é um derivado imidazólico sintético utilizado desde os anos 80 para o tratamento de micoses superficiais e sistêmicas (Lins, 2013; Nobre et al., 2002). A sua metabolização ocorre no fígado, sendo eliminado, predominantemente, por via biliar (Campos et al., 2009). O mecanismo de ação desta droga está relacionado com a inibição da biossíntese de metabólitos importantes para a célula fúngica (Lins, 2013; Nobre et al., 2002).

A atividade fungicida "in vitro" do cetoconazol, frente a leveduras isoladas de animais, tem sido variada. Concentrações a partir de 10µg/mL têm ação fungicida sobre *Trichophyton verrucosum* e *Malassezia pachydermatis*, enquanto sobre o *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, é necessária uma concentração de 20µg/mL (Nobre et al., 2002).

Nas infecções auriculares causada pela levedura *Malassezia pachydermatis*, os antifúngicos cetoconazol e o miconazol têm mostrado bons resultados, e nos casos de malassezíases cutânea, o cetoconazol é a droga de eleição (Appelt; Cavalcante, 2008).

Por ser hepatotóxico, o uso de cetoconazol para pacientes idosos não é indicado. Para tratamentos prolongados, devem ser realizados constantemente exames para avaliação da função hepática (Mangueira et al., 2010; Lins, 2013).

O miconazol também é um imidazól comumente recomendado nas dermatofitose, malasseziose e nas candidoses mucocutânea. Quando utilizado pela via tópica, ele penetra rapidamente na camada córnea da pele e seus efeitos persistem por quatro dias após sua aplicação, sendo que menos de 1% é absorvido na circulação. Além dessas enfermidades, o seu uso também tem sido indicado para o tratamento intramamário em vacas com mastite por *Candida spp*, na

queratomicoses de eqüinos com envolvimento de *Aspergillus spp* e *Fusarium spp* e nas dermatites seborréica dos cães associadas a malasseziose (Nobre et al., 2002).

O fluconazol é um bitriazólico sintético comumente utilizado no tratamento e profilaxia das infecções fúngicas (Navarini, 2007; Campos et al., 2009; Lins, 2013). Por agir na inibição da síntese de esteróide fúngico, sem praticamente alterar a síntese do ergosterol dos mamíferos, o fluconazol tem mostrado maior eficácia, menor toxicidade e melhor absorção do que os outros azóis no tratamento das infecções micóticas na medicina veterinária (Nobre et al., 2002; Campos et al., 2009).

Entre os azólicos, é o de maior ação no sistema nervoso central e tem se mostrando efetivo nos casos de candidíases oral e esofagiana (Navarini, 2007).

Devido seu uso rotineiro, a resistência de cepas fúngicas vem crescendo, principalmente em indivíduos imunossuprimidos e portadores de candidíases (principalmente por *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*) (Nobre et al., 2002; Navarini, 2007).

Testes de sensibilidade da levedura *Malassezia pachydermatis* ao fluconazol mostraram que 66,7% das amostras eram sensíveis, 23,3% apresentaram sensibilidade intermediária e 10% eram resistentes (Nobre et al., 2002).

O aumento de espécies de *Candida* potencialmente resistentes às drogas azólicas já existentes levou os pesquisadores a desenvolver novos antifúngicos como o voriconazol, um derivado triazólico, mais solúvel e mais eficaz do que o fluconazol (Pelletier et al., 2002).

O voriconazol possui um largo espectro de atividade e potente ação "in vitro". Seu mecanismo de ação é semelhante aos outros antifúngicos azólicos, inibindo a enzima 14 alfa-desmetilase, dependente do citocromo P-450, essencial para a biossíntese de ergosterol. Este antifúngico "in vitro" mostra ser ativo frente a uma série de infecções fúngicas em modelos animais, incluindo infecções sistêmicas por *Aspergillus spp*, *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans* (Nobre et al., 2002).

Outro antifúngico muito utilizado no tratamento de micoses superficiais por candidíases, malasseziose e em micoses sistêmicas é o itraconazol. O itraconazol é um derivado triazólico sintético de largo espectro de ação. Quando utilizado por via oral logo após a uma refeição, sua biodisponibilidade é máxima, com eliminação bifásica. Um estudo "in vitro" de sensibilidade do itraconazol frente a 30 amostras de *Malassezia pachydermatis* coletadas de cães, demonstrou que 73,3% dessas

amostras eram sensíveis, 26,7% possuíam sensibilidade intermediária e nenhuma cepa foi resistente (Nobre et al., 2002).

Este antifúngico também vem sendo utilizado com sucesso em cães com rinite micótica e em micoses sistêmicas, como blastomicose. Entretanto, o seu uso em cães pode levar a erupções cutâneas e, em dosagens elevadas, pode causar anorexia e aumento da concentração plasmática das enzimas fosfatase alcalina e aminotransferase (Nobre et al., 2002).

Em 2001 foi aprovada, pelo “*Food and Drug Administration*” (FDA), a caspofungina, uma equinocandina, que tem mostrado um papel importante no tratamento de algumas infecções fúngicas invasivas como a aspergilose e a candidemia, com melhor tolerância e menor toxicidade do que a anfotericina B (Pereira et al., 2010).

Apesar do grande avanço no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, ainda estão restritos a poucas classes químicas, gerando resistência e, conseqüentemente, falhas terapêuticas. Para a resolução deste problema, muitas pesquisas devem prosseguir, envolvendo conhecimentos avançados dos principais fungos patogênicos e seus mecanismos de defesa, e estudos epidemiológicos e farmacológicos (Cury, 2010).

A cada ano que passa os casos de infecções fúngicas em humanos e animais vem sofrendo um considerável aumento, ganhando maior atenção na medicina principalmente devido as elevadas taxas de morbidade e mortalidade e as constantes falhas nos tratamentos destas afecções. Assim como a falta de conhecimento da microbiota normal existente na cavidade oral dos cães, o desconhecimento do perfil de sensibilidade das leveduras potencialmente patogênicas e zoonóticas são graves problemas para a solução e prevenção de muitas doenças. Dessa maneira, esta pesquisa teve como objetivo identificar as espécies de leveduras presentes nessa microbiota e o seu perfil de sensibilidade aos principais antifúngicos, agregando assim informações valiosas para médicos veterinários odontológicos no tratamento dos animais, e até mesmo dando suporte para a medicina humana em casos de leveduroses zoonóticas persistentes.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os fenótipos e perfil de sensibilidade aos antifúngicos das leveduras existentes na cavidade oral de animais da espécie canina, com a finalidade de colaborar com a cadeia epidemiológica animal/homem.

3.2 Objetivos Específicos

1. Isolamento de leveduras da cavidade oral de cães, sem raça definida da cidade de Campinas, São Paulo;
2. Identificação presuntiva das leveduras isoladas pelo cultivo no meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®;
3. Identificação dos isolados por meio de "kit" comercial API 20C AUX;
4. Comparação entre os resultados obtidos na identificação das leveduras por meio do cultivo em meio cromogênio CHROMAGAR *Candida*® e pelo sistema API 20C AUX;
5. Determinar o perfil de sensibilidade e resistência "in vitro" das leveduras pelo método comercial de "Etest" frente aos antifúngicos: miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina;
6. Correlação entre as espécies de leveduras isoladas com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Casuística - Cães que participaram do estudo

4.1.1 Critérios de exclusão e inclusão

Os animais que participaram deste estudo vivem no Departamento de Proteção e Bem-Estar Animal (DPBEA), localizado no Parque Via Norte, Campinas, São Paulo.

Foram selecionados e incluídos no estudo 50 animais da espécie canina, sem raça definida, com ou sem doença periodontal, sexo, peso e idade variados. Com relação ao requisito "doença periodontal" (DP), foram considerados positivos para DP os animais que no exame clínico apresentaram sinais aparentes de cálculo dentário, sangramento gengival e/ou gengivites (Figura 4.1).

Para a identificação individual de cada cão, foi preenchida uma ficha na qual foram descritos o nome, idade presuntiva, sexo, peso, alimentação, estado geral, presença de doença periodontal e histórico clínico (Anexo A).

Figura 4.1 - Exame clínico da cavidade oral de animais participantes do estudo. Cão classificado como negativo para DP (A) e cão positivo para DP (B), com presença de cálculo dentário (seta)



A partir do preenchimento da ficha de identificação, foram excluídos os animais que em um período de dois meses, antecedentes ao estudo, apresentaram histórico de tratamento farmacológico de classe antifúngica.

4.1.2 Aspectos éticos

Anteriormente a qualquer manipulação da população estudada, obteve-se a aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA), sob o número 007/2015 (Anexo B).

Junto a aprovação da CEUA, foi requerido o termo para liberação de entrada e autorização para uso dos animais residentes no DPBEA-Campinas/SP, na qual foi aprovado e assinado pelo diretor e médico veterinário responsável, Prof. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe (Anexo C).

4.2 Delineamento e período de estudo

O estudo foi conduzido no período de Maio de 2015 á Maio de 2016, seguindo as etapas de:

- Aprovação do protocolo de estudo pela CEUA;
- Termo de liberação de entrada e autorização para o uso de animais do DPBEA - Campinas/SP;
- Preenchimento da ficha individual de cada animal;
- Preparo e coleta das amostras dos animais;
- Isolamento das leveduras;
- Provas de identificação presuntiva (CHROMAGAR *Candida*®);
- Provas de identificação bioquímica (Sistema API 20C AUX);
- Sensibilidade frente aos antifúngicos (método "Etest");
- Análise estatística.

As coletas das amostras dos animais foram realizadas na clínica veterinária do DPBEA e os experimentos microbiológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Leveduras Patogênicas "Professora Doutora Claudete Rodrigues Paula", em

Campinas-SP, sob a supervisão da Profa. Dra. Claudete R. Paula e do Prof. Dr. Paulo A. Nunes Felipe.

4.3 Preparação dos animais para o estudo

Visando o bem estar animal e a segurança do pesquisador, antes do procedimento de coleta das amostras, os animais foram submetidos ao procedimento de sedação e anestesia, com monitoração veterinária durante todo o período pré e pós anestésico, pelo médico veterinário Prof. Dr. Paulo A. Nunes Felipe (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Animal participante do estudo sob efeito de anestesia dissociativa



O agente farmacológico utilizado para a sedação dos animais foi a xilazina, um medicamento com propriedade tranqüilizante, relaxante muscular de ação central e analgésica, na dose de 0,3 – 1,0 mg/kg, aplicado por via intramuscular profunda. Decorridos 20 minutos da aplicação deste relaxante muscular (tempo preconizado para a redução do aumento da pressão arterial ocasionada por este fármaco), foi efetuada a aplicação do anestésico geral. Para o processo de anestesia, foi utilizado o fármaco com princípio ativo de cetamina, anestésico dissociativo de curta duração

na dose de 10 – 15 mg/kg aplicado pela via intramuscular profunda (Crivellenti; Crivellenti, 2013).

4.4 Coleta e isolamento das amostras

As amostras foram coletadas com o auxílio de um “swab” estéril alginatado (Cefar®), umidificado com solução de salina estéril, o qual foi introduzido na cavidade oral dos cães em movimentos circulares, passando pela região de mucosa oral (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Coleta das amostras da mucosa oral com o auxílio de um "swab" de cães sem raça definida da cidade de Campinas, São Paulo



Imediatamente após este procedimento, as amostras coletadas foram encaminhadas para o laboratório microbiológico, onde foram semeadas e cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD), acrescido de cloranfenicol (concentração de 0,05g/L), e incubadas a 25°C com observação diária por 20 dias.

4.5 Seleção dos isolados

Após a incubação das placas inoculadas com as amostras coletadas da mucosa oral dos cães, foram selecionadas as colônias de fungos leveduriformes. As colônias selecionadas foram repicadas em novos meio de ASD até completa purificação da levedura.

As amostras de leveduras obtidas de cada animal foram identificadas por códigos numéricos, para facilitar as futuras provas de identificação.

4.6 Manutenção e armazenamento das leveduras

4.6.1 Manutenção das amostras

As amostras isoladas foram repicadas em tubos com meio ASD, sendo os cultivos, posteriormente, mantidos sob refrigeração. O crescimento foi monitorado periodicamente, sendo feito repiques mensais até completa identificação.

4.6.2 Preservação das amostras - Processo de liofilização

As 45 cepas de leveduras que foram isoladas e identificadas neste estudo foram armazenadas sob processo de liofilização e congelamento a -20°C, para preservação das amostras em caso de futuros estudos.

4.7 Preparação das amostras para os testes

Para a realização das provas de identificação e de sensibilidade aos antifúngicos foram utilizadas culturas de leveduras com crescimento de 24h em tubos de ensaio contendo ASD e incubadas a 25°C.

4.8 Identificação das leveduras

As leveduras isoladas foram identificadas quanto aos seus aspectos macro e micromorfológicos, produção de tubos germinativos, pesquisa de clamidoconídios, (Meyer et al., 1984; Kurtzman; Fell, 1998), meio cromogênico CRHOMAGAR *Candida*® e aspectos bioquímicos, pelo método API 20C AUX (BioMerieux, Paris, França) e pela produção de enzima ureáse (Meyer et al., 1984; Kurtzman; Fell, 1998).

Para a realização dos ensaios de identificação das leveduras do gênero *Candida* foram utilizadas amostras padrões *American Type Culture Collection* (ATCC) como controle do teste, sob a identificação de ATCC64548 (*C. albicans*) e ATCC777 (*C. dubliniensis*).

4.8.1 Caracterização macromorfológica

Os aspectos macromorfológicos das colônias isoladas foram analisados com relação a sua coloração, formato das bordas e textura.

4.8.2 Caracterização micromorfológica

Para a caracterização micromorfológica, foram realizados os métodos de coloração de GRAM, teste de tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídio.

4.8.2.1 coloração de GRAM

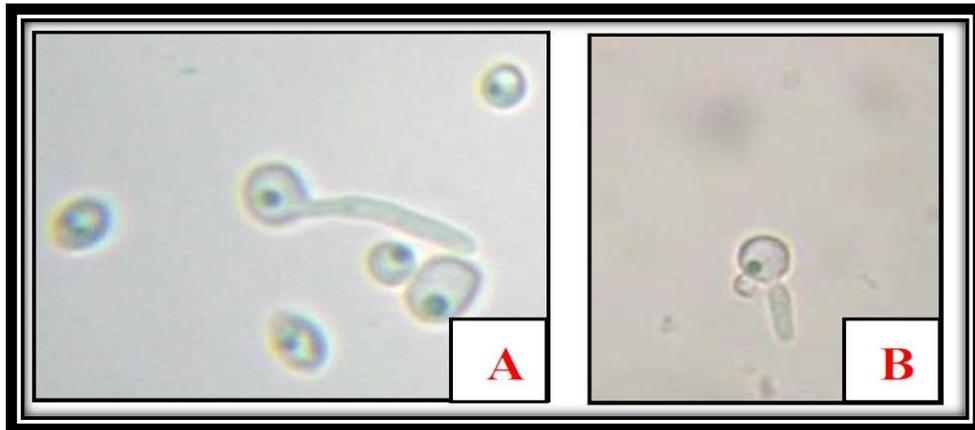
Os esfregaços das amostras coletadas foram submetidos a coloração pelo método de GRAM com visualização microscópica na objetiva de 100x em óleo de imersão. As características microscópicas pesquisadas foram quanto a verificação da presença de célula leveduriforme, tipo de brotamento e presença ou não de micélio.

4.8.2.2 prova do tubo germinativo

Este teste foi realizado com a finalidade de triar *C. albicans* e *C. dubliniensis* das demais leveduras. Para essa pesquisa, as amostras de leveduras foram cultivadas em ASD à 37°C por 48h. Uma alçada de cada amostra foi inoculada em tubos contendo 0,5 mL de soro fetal bovino (Cultilab®, Brasil), na escala 3 de Mc Farland. Esse é um procedimento rápido para a pesquisa de tubo germinativo.

A leitura foi realizada a partir de uma alçada do conteúdo líquido acima descrito, colocando em lâmina de microscopia, sendo coberto por lamínula. Após um período de 1 a 3 horas, em estufa bacteriológica a 35°C, a formação dos tubos germinativos, com visualização em microscópico óptico (40x), foi considerada prova positiva nos casos em que ocorreu a formação de filamento fino e cilíndrico originado do blastoconídeo da levedura, como uma extensão, sem constrição (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Extensão não septada, sem (A) e com (B) constricção a partir dos blastoconídios

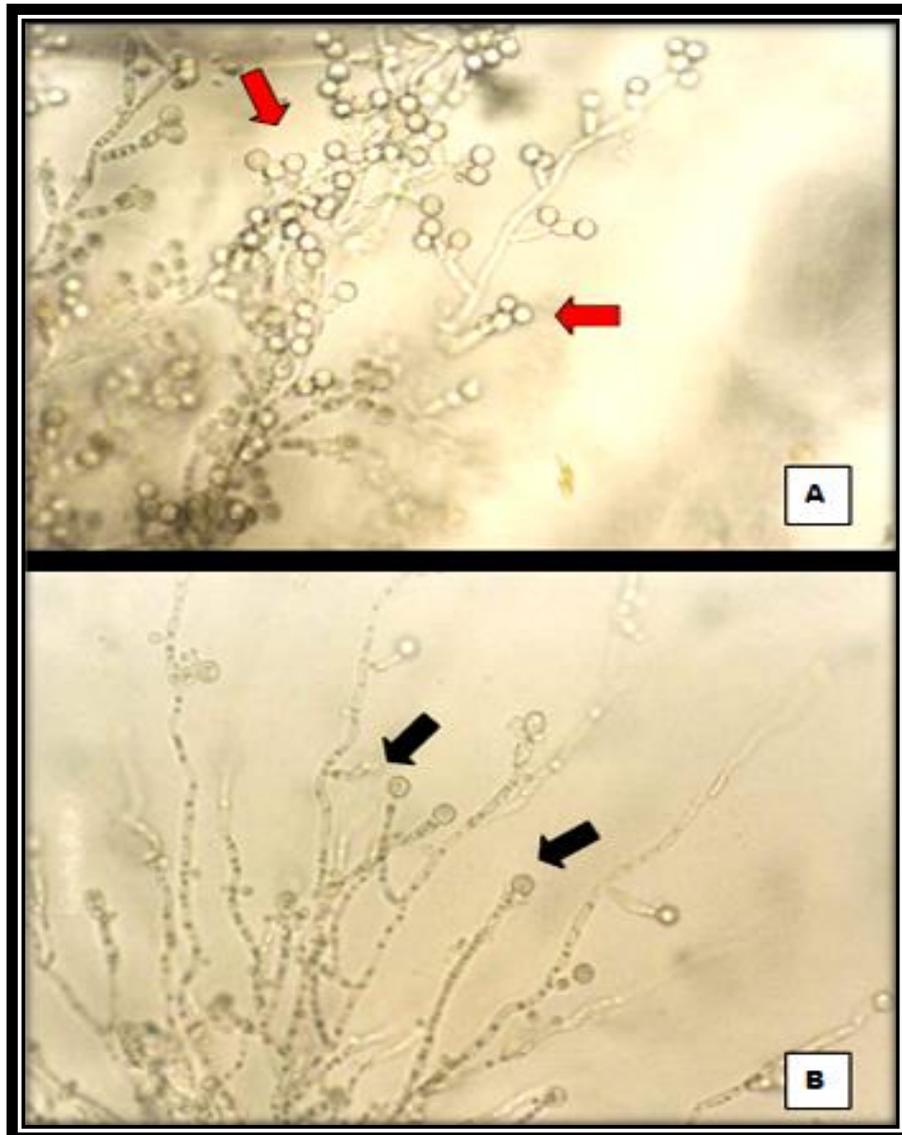


Fonte: Mattei (2010)

4.8.2.3 microcultivo em ágar fubá - pesquisa de clamidoconídios

Para a observação da formação dos clamidoconídios, as amostras isoladas foram repicadas em ASD e incubadas a 25°C por 24h. As colônias jovens foram subcultivadas em placas com meio de cultura ágar fubá acrescido com Tween 80, coberto por uma lamínula estéril, e incubado a 25°C, por até 96 horas. Foram pesquisadas em microscopia óptica, em objetivas de 10 e 40X, estruturas redondas de parede espessa, isoladas ou em cachos, na extremidade das pseudohifas. Os clamidoconídios terminais e intercalares são características de *C. albicans*. Os que estão dispostos em formato de cacho ou "triplets" são característicos de *C. dubliniensis* (Figura 4.5) (Mattei, 2010).

Figura 4.5 - Aspécto micromorfológico de *C. dubliniensis* (A), com clamidoconídios em "triplets" ou em formato de "cacho" (seta vermelha) e *C. albicans* (B), com clamidoconídiosterminais e intercalares (ágar fubá + Tween 80) (seta preta)



Fonte: Atique (2006)

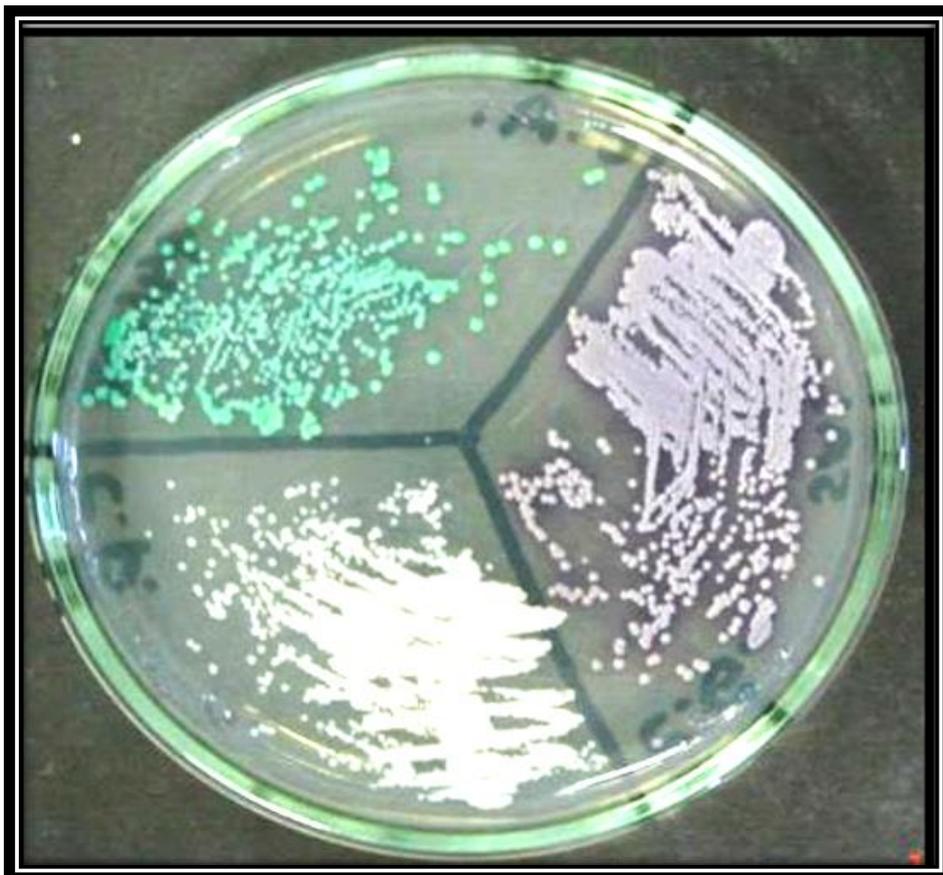
4.8.3 Semeadura em meio Cromogênico - Identificação Presuntiva

A técnica de semeadura em meio cromogênico é um método presuntivo de identificação de leveduras do gênero *Candida*. Para a realização deste teste, todas as amostras de leveduras isoladas foram ressuspensas em tubos com salina estéril e

ressemeadas, pela técnica de esgotamento, em meio “CHROMAGAR *Candida*®” e incubadas a 30°C por 48h.

A identificação presuntiva foi realizada de acordo com a pigmentação das leveduras, conforme a descrição do fabricante (CHROMAGAR *Candida*® Microbiology, BioMerieux, Paris, França), que indica que *Candida albicans* possui crescimento de coloração verde clara, *C. dubliniensis* verde escura, *C. tropicalis* azuis esverdeadas a azul metalizado com ou sem halos violetas, *C. krusei* cor-de-rosa claro a vermelho claro com um rebordo esbranquiçado e as demais espécies, adquirem coloração malva claro a escuro (rosa a violeta) ou, nos casos em que não é utilizado nenhum dos substratos cromogênicos, irão apresentar a sua cor natural das colônias (creme a branco) (Figura 4.6).

Figura 4.6 - Crescimento de *Candida spp* em meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®



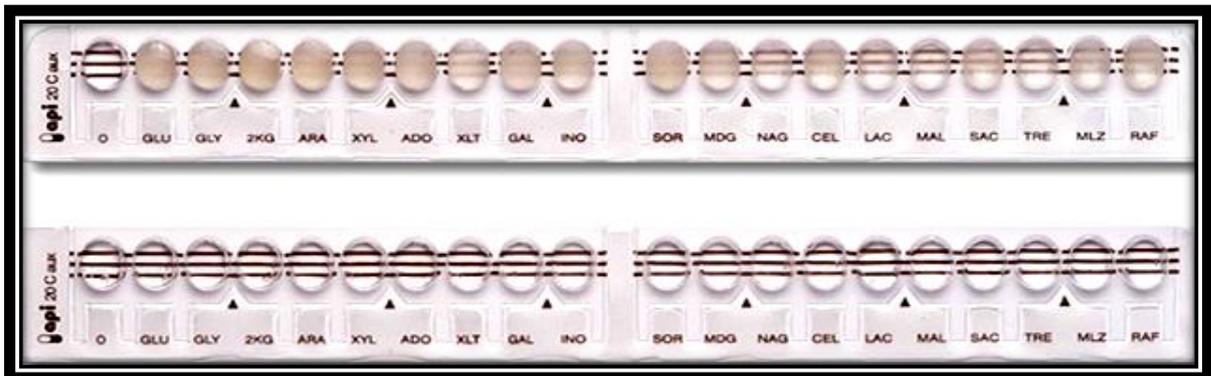
Fonte: Rodrigues (2013)

4.8.4 Identificação bioquímica

4.8.4.1 assimilação de fontes de carbono - sistema API 20C AUX

O sistema API 20C AUX (BioMérieux®, Paris, França) é um método de identificação de leveduras por meio do perfil de assimilação de carboidratos. Trata-se de um "kit" prático, rápido e eficaz de identificação após 72 horas de incubação (Spolidorio et al., 2009) (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Sistema API 20C AUX - Para identificação de leveduras



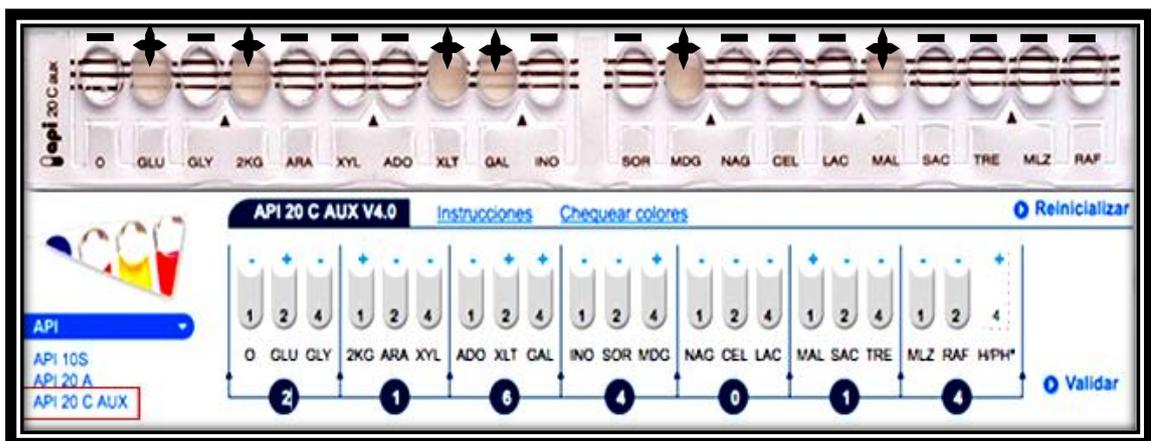
Fonte: Universidad de Salamanca (2016)

Para a realização deste teste, as amostras foram repicadas e cultivadas de 24 a 48 horas. O inóculo foi preparado pela adição da levedura em tubos contendo 1 mL de solução fisiológica estéril e ajustado a uma turbidez equivalente à escala 2 de McFarland. O volume de 0,5mL desta suspensão foi adicionada ao meio basal do API20C AUX, procedendo a homogeneização.

Posteriormente, cada poço do painel de identificação foi preenchido e incubado em câmara úmida, previamente preparada, a 30°C, por até 72 horas, com leituras de 24, 48 e 72 horas. Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou ausência de opacidade nos poços de cada carboidrato. De acordo com o fabricante (BioMérieux®), os substratos desidratados para o teste de assimilação utilizados foram: D-GLUcose, GLIcerol, cálcio 2-ceto-Gluconato, L-ARAbinose, D-XILOse, ADOnitol, XiLiTol, D-GALactose, INOsitol, D-

SORbitol, Metil-DD-Glucopiranosido, N-Acetil-Glucosamina, D-CElObiose, D-LACtose (origem bovina), D-MALtose, D-SACarose, D-TREalose, D-MeLeZitose e D-RAFinose. A interpretação foi realizada com o auxílio do catálogo analítico API 20C AUX (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Catálogo analítico digital API 20C AUX. Notam-se os resultados de positividade (+) e negatividade (-) para assimilação de determinado carboidrato devido a opacidade ou não do poço, respectivamente



Fonte: Universidad de Salamanca (2016)

4.8.4.2 hidrólise da uréia

O teste de urease ou hidrólise da uréia trata-se de uma prova bioquímica que se baseia na capacidade de determinados fungos produzirem urease, uma enzima que hidrolisa a uréia, liberando amônia. Leveduras classificadas como urease negativa, em ocasiões específicas de fase sexual, podem apresentar tendência a positividade. Devido este fato, e como método auxiliar ao "kit" API 20C AUX, as amostras desse estudo foram submetidas a essa prova.

Para a realização deste teste, as amostras de leveduras foram semeadas em meio sólido de Christensen (Bacto-urea Broth. Difco Laboratories, USA), e incubadas a 36°C por 48h.

Foram consideradas provas positivas as amostras na qual tiveram a coloração do seu meio vertido de amarelo para rosa.

4.9 Teste de sensibilidade aos antifúngicos - "Etest"

O teste escolhido como método de avaliação da sensibilidade das amostras isoladas frente aos antifúngicos foi a técnica do "Etest". Os antifúngicos utilizados foram: o Miconazol (MYC), Itraconazol (IT), Cetoconazol (CET), Fluconazol (FL), Voriconazol (VOR) e Caspofungina (CS), drogas comumente utilizadas na medicina veterinária e humana para o tratamento de micoses.

O "Etest" (AB Biodisk, Solna, Suécia) é um teste comercial que determina quantitativamente a sensibilidade "in vitro" aos antifúngicos, que estabelece a Concentração Inibitória Mínima (CIM), baseada em gradientes de concentração em fita plástica, através da técnica de difusão em ágar. Todo o procedimento foi realizado de acordo com o indicado pelo fabricante, utilizando-se como meio de cultura o RPMI com MOPS e 2% de glicose.

Amostras padrões foram utilizadas neste ensaio (ATCC22019 - *C. parapsilosis* e ATCC6258 - *C. krusei*).

4.9.1 Preparação do meio RPMI

O RPMI 1640 (Sigma®/USA) é um meio recomendado para o crescimento da maioria das leveduras. Inicialmente, o RPMI foi suspenso em 900 mL de água destilada, acrescido com 2% de glicose, MOPS (ácido morfopropileno) 1,65 M (Sigma®) e acrescido de L-glutamina (Probac®). O pH da solução foi ajustado para 7,0, com o auxílio de um phmetro, usando HCl ou NaOH.

Toda a solução foi colocada numa proveta calibrada e o seu volume foi complementado até 1 litro de água destilada. Em seguida, o meio foi esterilizado por filtração com uma membrana de porosidade de 0,22 µm e, posteriormente, armazenado em geladeira a temperatura de 5°C. Amostras deste meio foram distribuídas individualmente em tubos, sendo identificadas, datadas e incubadas por 48 horas a 37°C para controle de esterilidade.

4.9.2 Preparação do inóculo

Inicialmente, os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento de 24h, em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, e a 25°C. Essas colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,85%, homogeneizadas e a solução ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a um inóculo inicial de aproximadamente 5×10^6 CFU/mL (unidades formadoras de colônia por mL).

4.9.3 Método "Etest"

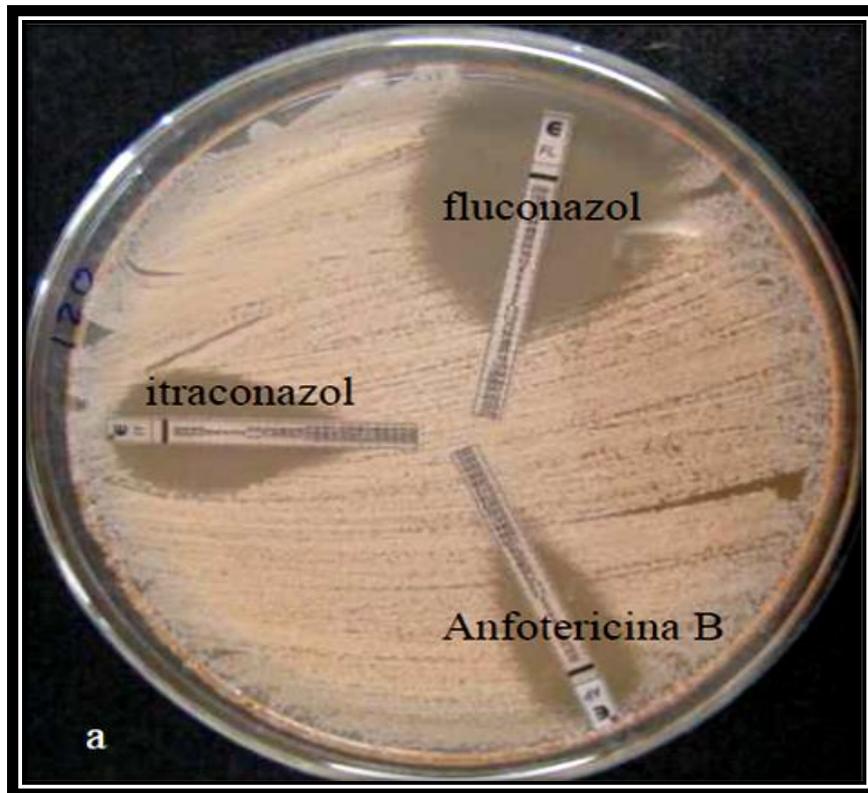
O meio básico utilizado para o "Etest" continha 18g de ágar bacteriológico (DIFCO®, Detroit, EUA) em 1000 mL de água deionizada. Após a dissolução, este meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos, resfriado a 50°C e acrescentada a solução de RPMI descrita anteriormente no item 4.9.1.

Após acrescentar o meio RPMI no meio básico, foi realizada a homogeneização, com posterior distribuição em placas de Petri e deposição das placas em fluxo laminar para sua solidificação.

O volume de 1 mL da suspensão do inóculo preparado de cada amostra, citado no item 4.9.2, foi semeado nas placas solidificadas. Após 15 minutos de repouso, foram adicionadas as fitas de "Etest" nas placas, sendo incubadas a 37°C por 24 e 48 horas.

A leitura da CIM foi feita pelo ponto de intersecção entre a fita de "Etest" e a zona na qual o crescimento da levedura foi inibido, ou seja, foi realizada pela concentração em que a zona elíptica de inibição interceptou a fita de "Etest" (Figura 4.9).

Figura 4.9 - Leitura de placa de Petri mostrando as fitas de "Etest" e seus halos de inibição de crescimento. Nota-se isolado sensível ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B



Fonte: Silva (2011)

4.9.4 Leitura dos resultados

A interpretação dos resultados foi embasada nos valores preconizados pelos documentos M27A2 (2002) e M27A3 (2008), descritos pelo CLSI (2002, 2008). Como a resistência ao miconazol não foi estabelecida pelo protocolo do CLSI, a interpretação foi baseada nos valores de sensibilidade, sensibilidade dose dependente e resistência utilizados no estudo de Dalazen et al. (2011).

Pelo fato do cetoconazol ser considerada uma droga fungistática, o critério pelo CLSI não estipula valores para este antifúngico, apenas indica que a maioria dos valores dos isolados clínicos encontrados são entre 0,03 e 16 μ g/mL (CLSI, 2002). Neste estudo valores acima de 16 μ g/mL foram considerados como resistentes (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Interpretação do comportamento de cepas de leveduras frente à concentração dos antifúngicos ($\mu\text{g/ml}$)

ANTIFÚNGICOS	S ($\mu\text{g/mL}$)	SDD ($\mu\text{g/mL}$)	R ($\mu\text{g/mL}$)
Miconazol*	< 8	8 - 16	≥ 16
Cetoconazol	< 16	-	≥ 16
Fluconazol	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Itraconazol	< 0,25	0.25 - 0.5	≥ 1
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4
Caspofungina	≤ 2	-	> 2

S: sensível; SDD: sensibilidade dose dependente; R: resistente; NS: não sensível.
 Fonte: Documentos CLSI (2002, 2008) e Dalazen et al. (2011)*.

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados através do pacote estatístico “BioEstat 5.0”, sendo utilizado teste qui-quadrado para verificar se a doença periodontal é independente da faixa de idade, sexo e do isolamento positivo para levedura. Em relação aos valores obtidos pelo teste de sensibilidade aos antifúngicos, foi utilizado o teste exato de Fisher, como teste de homogeneidade, para verificar se existe diferença significativa ao nível de 5% entre a susceptibilidade das leveduras isoladas.

Para descrever a intensidade da concordância entre os métodos API 20C AUX e o CHOROMAGAR *Candida*®, foi utilizado o coeficiente Kappa (Tabela 4.2) de concordância (Mchugh, 2012). Valores desse coeficiente próximos de 1 representam alta concordância enquanto valores próximos de 0 representam nenhuma concordância ou concordância devido ao acaso, considerando um nível de significância de 5%.

Tabela 4.2 - Categorias de classificação do coeficiente Kappa

VALUE OF KAPPA	LEVEL OF AGREEMENT
0,00 – 0,20	None
0,21– 0,39	Minimal
0,40– 0,59	Weak
0,60– 0,79	Moderate
0,80– 0,90	Strong
Above 0,90	Almost Perfect

Fonte: Mchugh (2012)

5 RESULTADOS

5.1 População estudada

Os animais que participaram deste estudo foram pré-selecionados de forma aleatória. A partir do preenchimento da ficha de identificação individual (Anexo 01), foram incluídos no estudo 50 animais saudáveis, sem raça definida, de idade, sexo e peso variados, com ou sem doença periodontal e que não receberam nenhum tratamento com antifúngico nos últimos sessenta dias (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Fotografia de alguns dos animais participantes desta pesquisa. Cães sem raça definida, Campinas, São Paulo



Apesar dos animais possuírem identificação nominal própria, para melhor visualização dos resultados, cada cão recebeu uma numeração de 1 (um) a 50 (cinquenta) e os dados gerais obtidos na anamnese foram colocados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Identificação e dados gerais dos cães sem raça definida (SRD) participantes do estudo (número, nome, sexo, peso, DP, idade), Campinas, SP

Identificação dos animais	Nome do animal	Sexo	Peso (Kg)	Com (S) ou sem (N) DP*	Idade (anos)
01	Lili	Fêmea	11,5	N	2
02	Preto	Macho	6,0	S	4
03	Panda	Fêmea	16,2	S	5
04	Nego	Macho	11,3	S	3
05	Frajola	Macho	10,1	S	4
06	Pepe	Macho	12,0	N	2
07	Max	Macho	18,4	N	3
08	Laika	Fêmea	10,2	S	4
09	Nega	Fêmea	19,3	N	6
10	Totó	Macho	12,2	N	3
11	Nega	Fêmea	14,2	S	6
12	Laila	Fêmea	5,1	N	3
13	Gordo	Macho	6,3	N	1
14	Mel	Fêmea	9,0	S	5
15	Tuli	Macho	7,1	S	7
16	Mimi	Fêmea	22,0	S	4
17	Sara	Fêmea	7,3	N	2
18	Kiara	Fêmea	27,0	S	5

continua

Continuação

Identificação dos animais	Nome do animal	Sexo	Peso (Kg)	Com (S) ou sem (N) DP*	Idade (anos)
19	Tarzan	Macho	29,6	S	6
20	Gals	Macho	10,7	S	4
21	Thor	Macho	15,4	N	2
22	Pitoco	Macho	16,1	S	8
23	Lepita	Fêmea	24,0	S	7
24	Lep	Macho	18,5	S	9
25	Totó	Macho	22,5	N	3
26	Raimundo	Macho	22,0	S	8
27	Kil	Macho	21,2	N	1
28	Bili	Macho	12,0	S	6
29	Magro	Macho	14,0	S	7
30	Diana	Fêmea	6,0	S	3
31	Max	Macho	10,2	S	9
32	Lessy	Fêmea	11,8	S	4
33	Pietra	Fêmea	8,6	S	4
34	Nilo	Macho	9,0	S	2
35	Raíssa	Fêmea	10,7	S	4
36	Laica	Fêmea	12,2	S	6
37	Maluco	Macho	13,4	S	3
38	Menina	Fêmea	7,8	S	3
39	Nono	Macho	9,5	S	4
40	Mel	Fêmea	8,1	S	7

Continua

Conclusão

Identificação dos animais	Nome do animal	Sexo	Peso (Kg)	Com (S) ou sem (N) DP*	Idade (anos)
41	Branca	Fêmea	10,0	N	2
42	Bel	Fêmea	14,2	N	1
43	Raí	Macho	12,9	S	6
44	Neymar	Macho	7,7	N	2
45	Dalila	Fêmea	15,7	S	6
46	Kica	Fêmea	14,1	N	3
47	Pretinha	Fêmea	9,9	S	4
48	Nina	Fêmea	6,8	S	2
49	Ianca	Fêmea	13,9	N	1
50	Xereta	Macho	16,8	S	3

DP* - Doença Periodontal

Com relação ao fator sexo (Macho versus Fêmea), a porcentagem obtida foi de uma casualidade de 50% machos e 50% fêmeas, com um peso médio do grupo de 13,21 kg, sendo o menor valor de 5,1 kg e o maior de 29,6 kg.

A análise de presença ou não de doença periodontal foi feita conforme o diagnóstico aparente de placas nos dentes, sinais de gengivite e/ou sangramento gengival nos cães. Foram diagnosticados 34 animais (68%) com doença periodontal, e os demais 16 (32%), classificados como sem doença periodontal aparente.

A variação de idade dos animais dentro do grupo foi grande, indo de 1 a 9 anos, com idade média de 4 anos.

Quando analisadas a relação de fêmeas e machos com ou sem doença periodontal, não ocorreu diferença significativa, pois 50% (17) dos animais que foram diagnosticados com DP eram do sexo feminino, o mesmo resultado obtido para o sexo masculino.

Com relação a idade versus presença de doença periodontal (DP), foi possível verificar que quando o animal possuía uma idade superior a 4 anos de idade, a tendência a ter DP foi grande. Dentre os animais com mais de 4 anos, 96,4%

possuíam algum tipo de afecção da cavidade oral, enquanto que os animais com idade inferior a 4 anos apresentaram 31,8% de positividade para essa enfermidade.

Por meio dos resultados estatísticos, utilizando-se o teste qui-quadrado, considerando-se um nível de significância de 5%, foi rejeitada a hipótese de independência entre a faixa de idade e a doença periodontal (Qui-Quadrado = 18,48, g.l. = 1 e P-Valor < 0,001) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Animais com idade igual ou acima de 4 anos e animais com menos de 4 anos com relação a presença ou não de DP*

Idade (anos)	Total de Cães	SEM DP* (%)	COM DP* (%)	P-Valor
≥ 4	28	3,6	96,4	
< 4	22	68,2	31,8	< 0,001 ^a
Total (%)	50	32	68	

DP* - Doença Periodontal

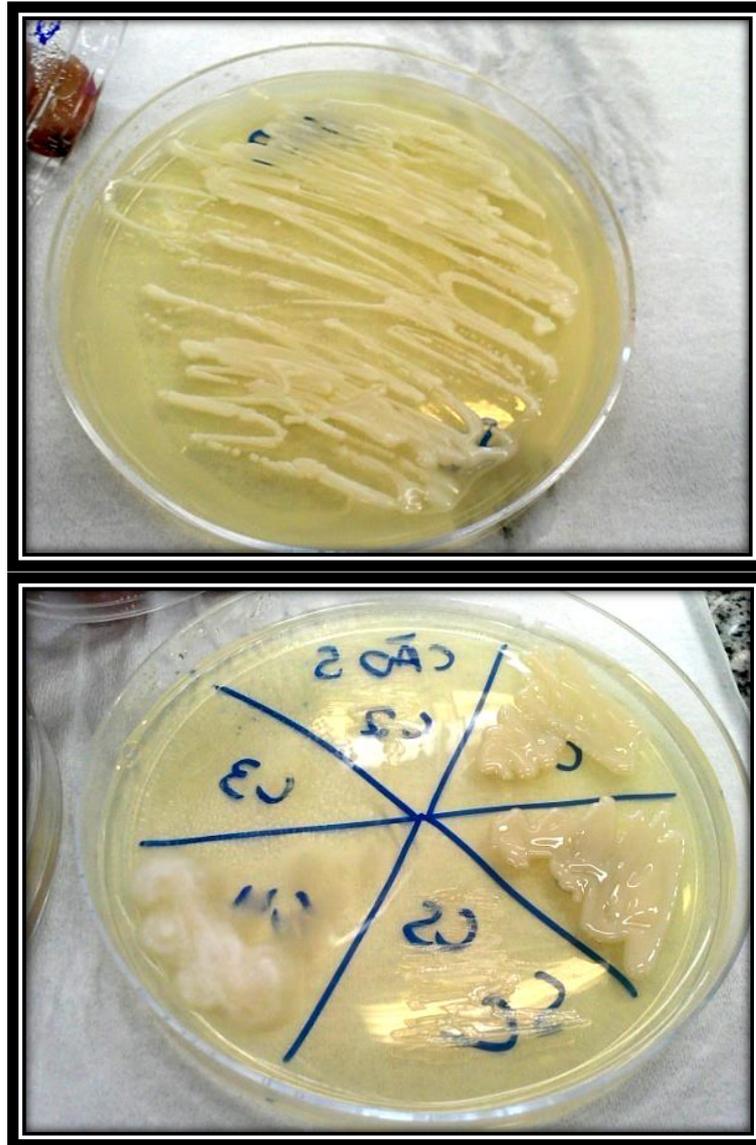
^a Qui-quadrado= 18,48 com 1 grau de liberdade

5.2 Crescimento das amostras

Das coletas das amostras da cavidade oral dos cães, observou-se crescimento de diferentes espécies de leveduras.

Dentre os 50 animais estudados, 34 animais (um total de 68%) apresentaram leveduras na mucosa oral, isolando-se 45 cepas de leveduras, que foram purificadas e encaminhadas para as provas de identificação fenotípica e bioquímica (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Colônias de leveduras isoladas da mucosa oral de cães SRD, Campinas, São Paulo



Analisando os dados obtidos, foi possível verificar que dos 34 animais que apresentaram positividade para o isolamento de leveduras, 17 (50%) eram do sexo masculino, sendo que 13 (76,5%) possuíam doença periodontal (DP). O total de fêmeas com isolamento positivo foi também de 50% e destas, 14 (82,4%) possuíam DP.

Quando verificada a relação de animais com leveduras versus animais com DP, foi verificado que 27 (79,4%), dos 34 animais que tiveram isolamento positivo, possuíam DP.

Para verificar se a doença periodontal é independente do isolamento de leveduras, utilizou-se o teste qui-quadrado (Tabela 5.3). Assim, considerando um nível

de significância de 5%, rejeitou-se a hipótese de independência entre o isolamento de leveduras e a doença periodontal (Qui-Quadrado = 4,82, g.l. = 1 e P-Valor = 0,028).

Tabela 5.3 - Total de animais do estudo com ou sem doença periodontal relacionados com o isolamento positivo ou negativo para leveduras

Isolamento de leveduras	Total de Cães		Animais SEM DP*		Animais COM DP*		P
	N	%	N	%	N	%	
Positivo	34	68,0	07	20,6	27	79,4	0,028
Negativo	16	32,0	09	56,2	07	43,8	

DP* - Doença Periodontal

Com relação ao sexo (Macho e Fêmea), este fator não foi uma variável significativa para a presença ou não de doença periodontal (Qui-Quadrado = 0,72, g.l. = 1 e P-Valor = 0,396) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Análise comparativa de animais machos e fêmeas com isolamento positivo para levedura e total em porcentagem desses animais com ou sem DP*

SEXO	ISOLAMENTO LEVEDURIFORME POSITIVO (TOTAL)	TOTAL COM DP* (%)	TOTAL SEM DP* (%)	P-Valor
MACHO	17	76,5	23,5	0,671 ^a
FÊMEA	17	82,4	17,6	
TOTAL	34	79,4	20,6	

DP* - Doença Periodontal

^a Qui-Quadrado= 0,72 com 1 grau de liberdade

5.3 Resultados dos testes de identificação das leveduras

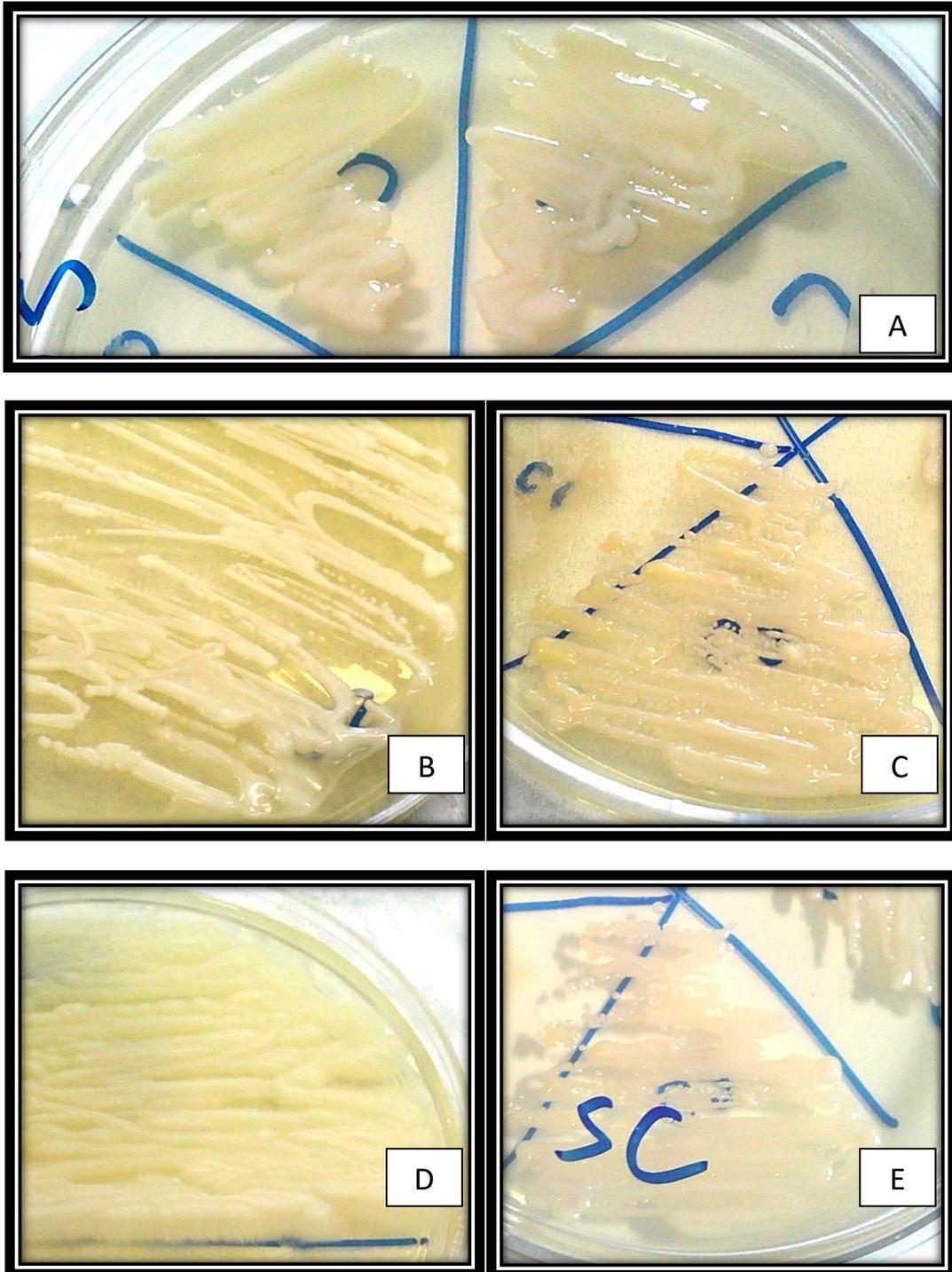
5.3.1 Caracterização macromorfológica

A caracterização macromorfológica das leveduras foi realizada a partir do repique das amostras purificadas em meio ASD, incubadas a 25°C e crescimento por 24 horas. Foram analisadas as características do crescimento quanto a sua coloração, textura e formato das bordas, e os resultados obtidos foram descritos na Tabela 5.5 (Figura 5.3).

Tabela 5.5 - Análise macromorfológicas das leveduras isoladas na cavidade oral de cães

TOTAL DE AMOSTRAS	COLORAÇÃO	TEXTURA	BORDAS
17	Branca	Creмоса	Regulares
09	Creme	Lisa	Regulares
11	Creme/ Rósea	Lisa	Regulares
2	Branca	Rugosa	Irregulares
4	Creme	Lisa	Irregulares
2	Branca/ Amarelada	Creмоса	Regulares

Figura 5.3 - Amostras de leveduras cultivadas em meio ASD para caracterização macromorfológica. (A) - Colônia de coloração creme, mucosa, lisa e de bordos irregulares; (B) - Colônia de coloração branca, cremosa, lisa e de bordos regulares; (C) - Colônia de coloração branco-amarelada, cremosa, lisa e de bordos regulares; (D) - Colônia de coloração branca, rugosa e de bordos irregulares; (E) - Colônia de coloração branco-rósea, lisa e de bordos regulares



5.3.2 Caracterização micromorfológica

5.3.2.1 coloração de GRAM

Por meio da fixação da levedura em lâmina com coloração pelo método de GRAM, permitiu-se a visualização das estruturas leveduriformes, os tipos de brotamento e a presença ou não de micélio.

Dentre as 45 amostras de leveduras isoladas, 17 (37,8%) apresentaram características de células ovais, com brotamento múltiplo e presença de hifas, 21 (46,7%) eram ovais, com brotamento único e presença de hifas, 5 (11,1%) possuíam brotamento único, com presença de hifas dotadas de estruturas condizentes a artroconídios. Apenas duas (4,4%) das amostras apresentaram formato redondo, com brotamento único, sendo sua base larga, e ausência de micélio e cápsula.

5.3.2.2 prova do tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídios

A formação de tubo germinativo, característica da espécie *C. albicans* e *C. dubliniensis*, é uma estrutura fúngica originada a partir de blastoconídios. Sua formação foi positiva em 17 (37,8%) das 45 cepas isoladas (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Formação de tubo germinativo pelas amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, Campinas, São Paulo (inoculação em soro fetal bovino) (seta)



Os resultados do microcultivo em ágar fubá para pesquisa de formação de clamidoconídios foram classificados da seguinte maneira: amostras com filimentação negativa, filimentação positiva, presença de filimentação com formação de clamidoconídios e presença de filimentação com formação de artroconídio. Dentre as 45 cepas estudadas, 71,1% (32) filamentaram, 13,3% (6) apresentaram filimentação com formação de clamidoconídios intercalares únicos (Figura 5.5), 11,11% (5) apresentaram filimentação com formação de artroconídios, e 4,44% (2) não filamentaram (Gráfico 5.1).

Figura 5.5 - Amostra de levedura isolada na cavidade oral de cão cultivada em ágar fubá, Campinas, São Paulo. Verifica-se a formação de clamidoconídios terminais intercalares únicos (seta) em objetiva 40x

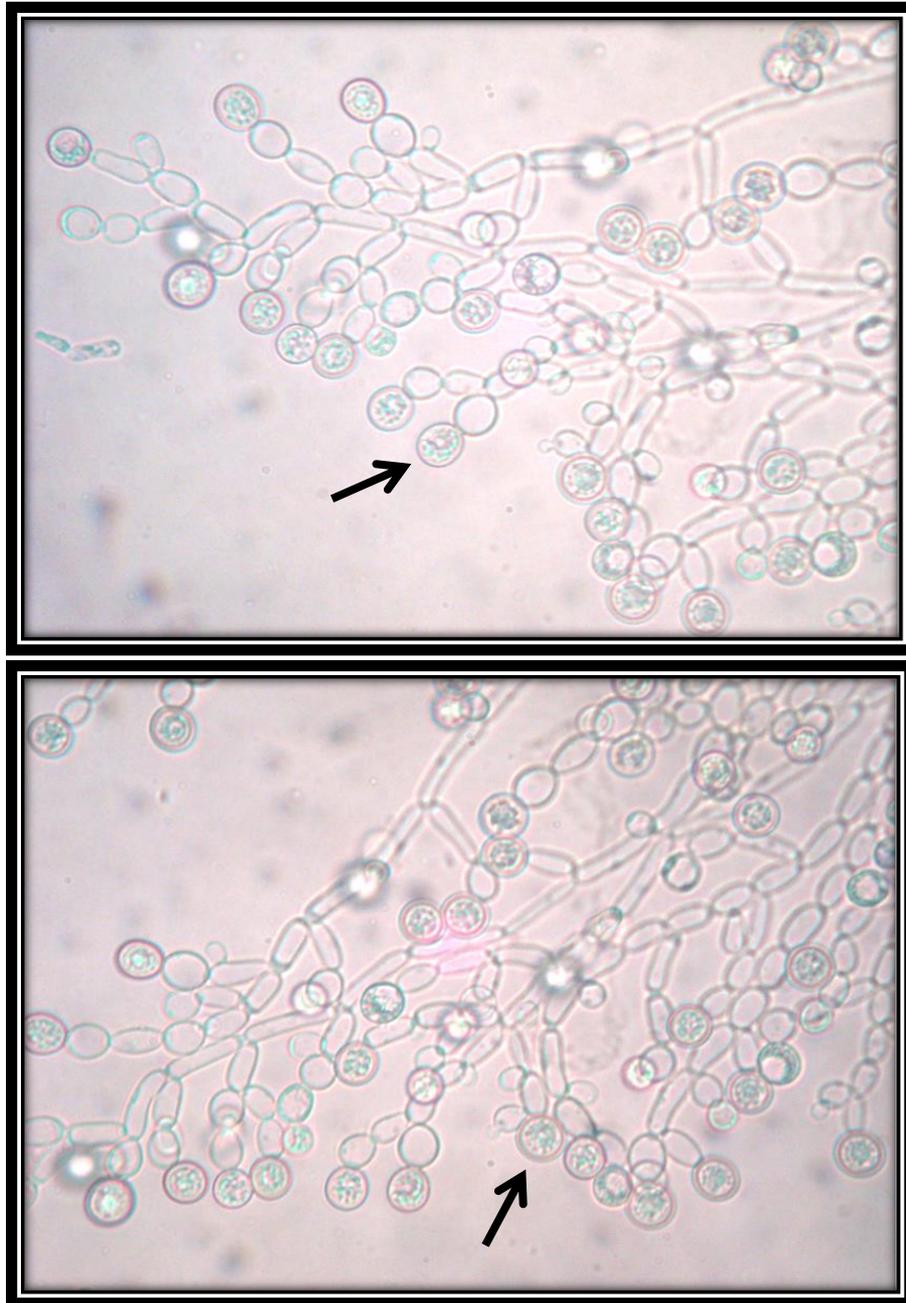
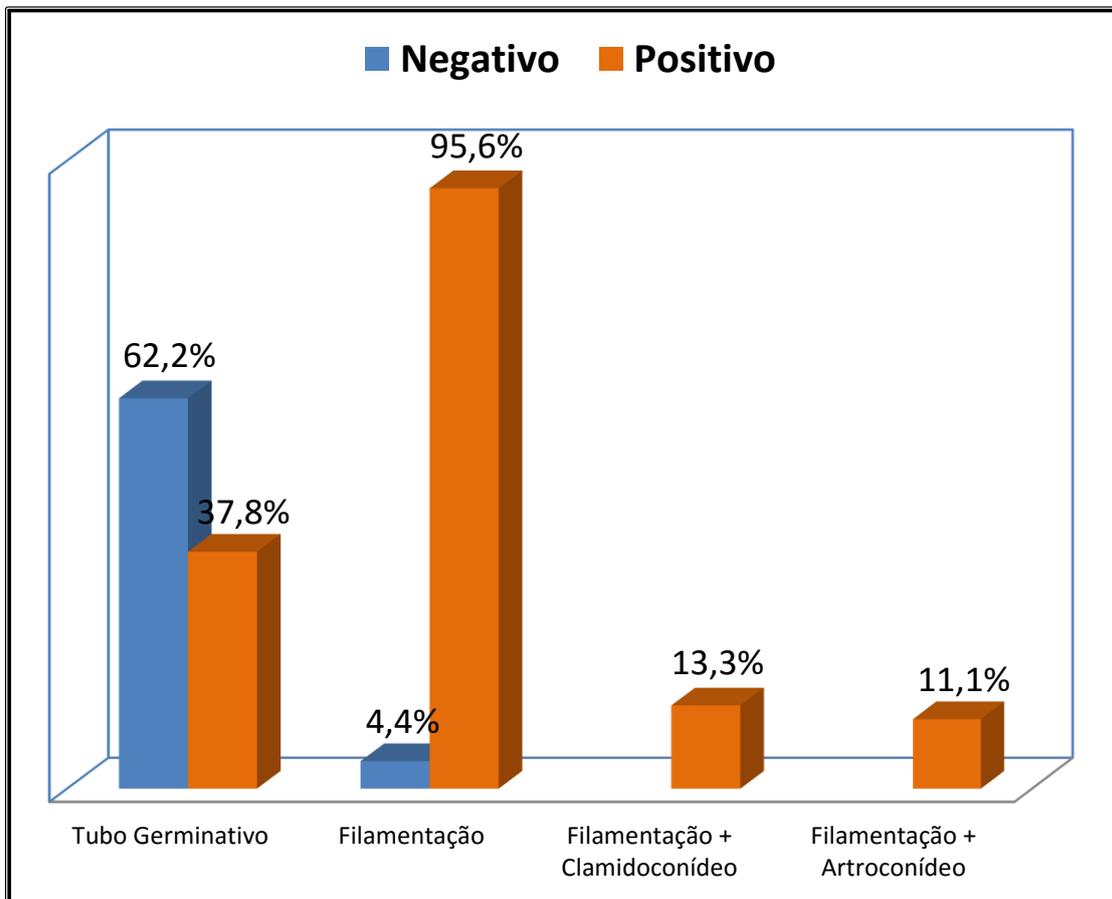


Gráfico 5.1 - Resultados em porcentagem da prova de tubo germinativo e do teste do microcultivo, indicando positividade ou negatividade para a formação do tubo germinativo, de clamodoconídios, de artroconídios e de filamentação das leveduras

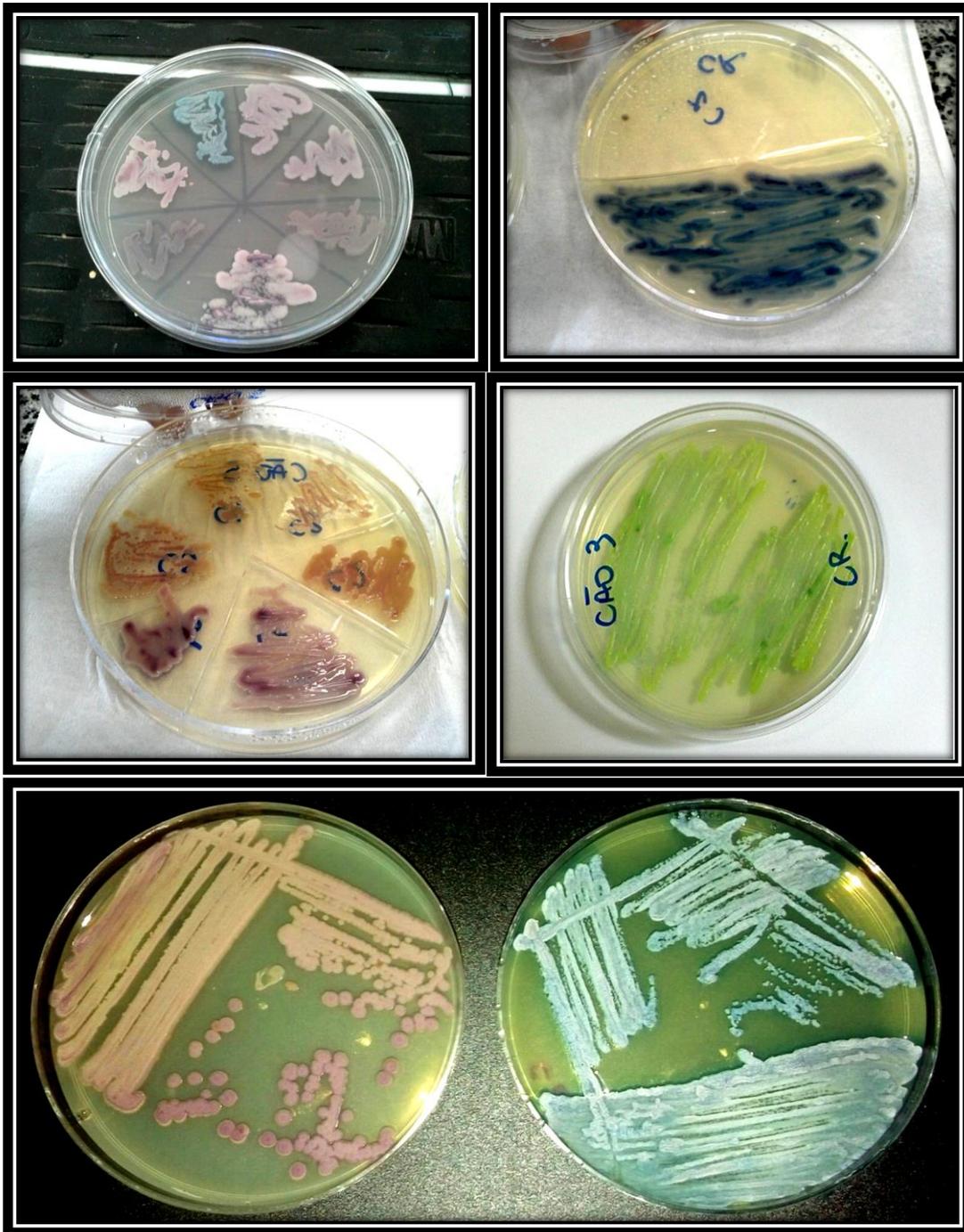


* Amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.

5.3.3 Semeadura em meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®

As amostras de leveduras foram enumeradas, semeadas em meio cromogênico "CHROMAGAR"® e incubadas por 48 horas a 37°C. A identificação presuntiva das espécies de *Candida* foi realizada a partir da verificação da coloração de crescimento das leveduras e comparação dos resultados com a identificação indicada pelo fabricante (CHROMAGAR *Candida*®, BioMerieux, Paris, França) (Figura 5.6).

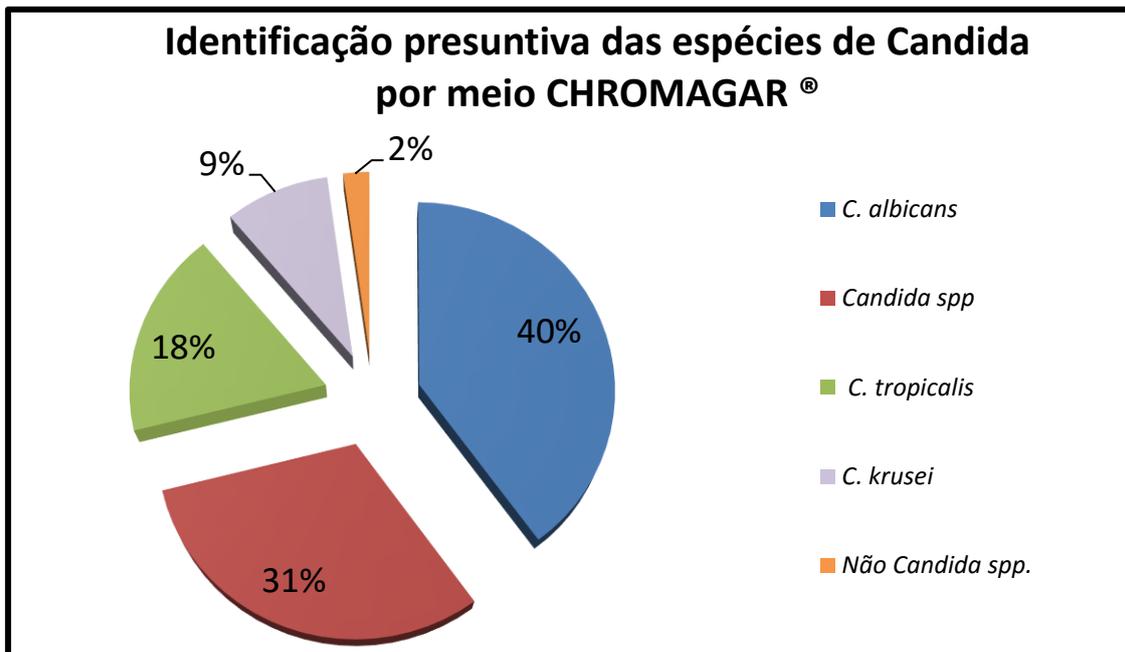
Figura 5.6 - Crescimento de algumas colônias de leveduras em meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®, isoladas da mucosa oral de cães SRD, Campinas, São Paulo



O resultado obtido a partir da análise do crescimento das amostras no meio cromogênico demonstrou que dentre as 45 cepas de leveduras isoladas, 18 eram *C. albicans* (40,0%), 14 *Candida spp* (31,1%), 8 *C. tropicalis* (17,8%), 4 *C. krusei* (8,9%) e 1 (2,2%) não *Candida*.

Para melhor visualização desses resultados, as informações foram dispostas no Gráfico 5.2.

Gráfico 5.2 - Resultado presuntivo das espécies de leveduras de acordo com o meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®

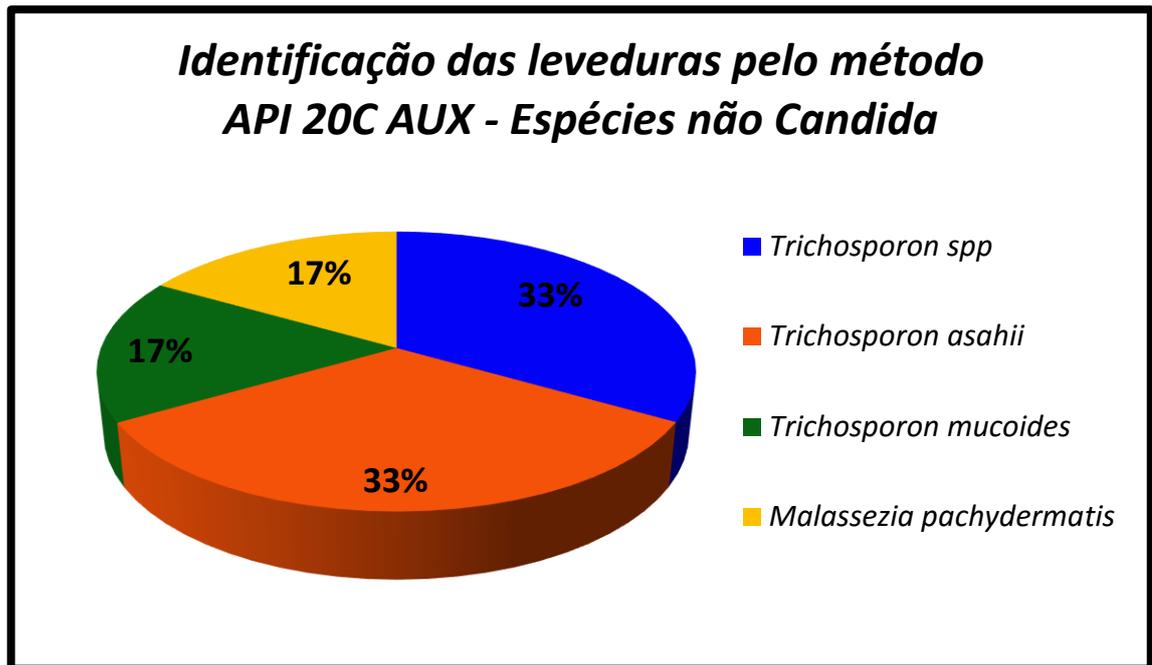
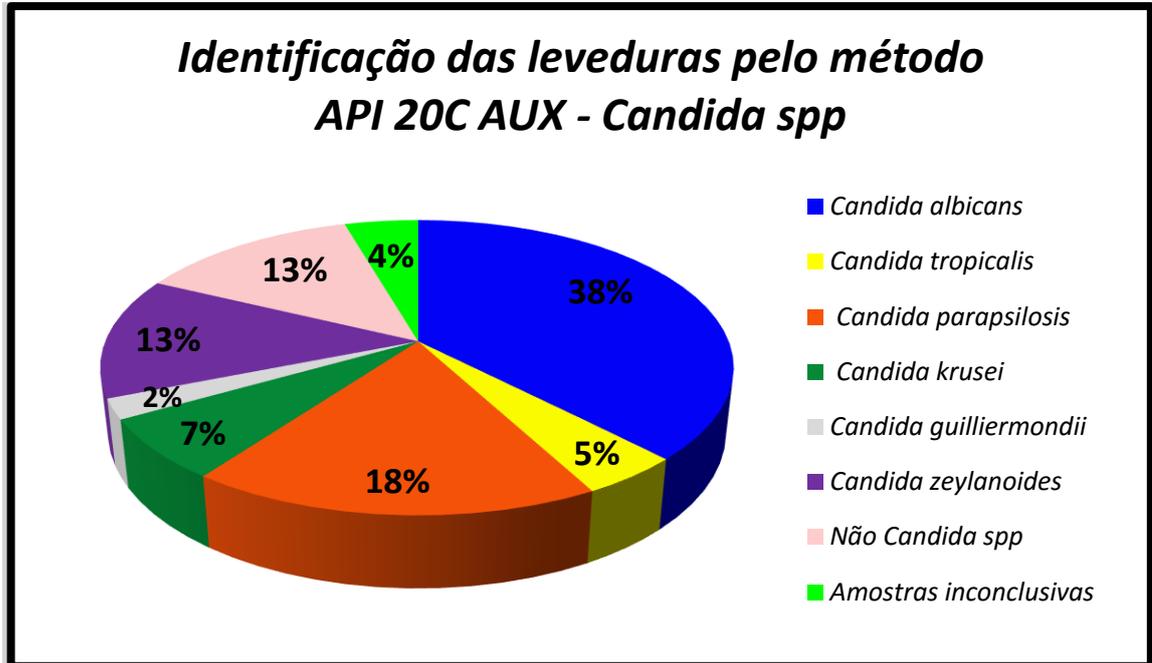


* Amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.

5.3.4 Sistema API 20C AUX (BioMérieux®)

Por meio do sistema API 20C AUX (bioMérieux®), foram identificadas as 45 amostras de leveduras sendo 17 (37,77%) *Candida albicans*, 8 (17,77%) *C. parapsilosis*, 6 (13,33%) *C. zeylanoides*, 3 (6,66%) *C. krusei*, 2 (4,44%) *C. tropicalis*, 1 (2,22%) *C. guilliermondii* e 6 (13,33%) não *Candida spp* (2 *Trichosporon spp*, 2 *Trichosporon asahii*, 1 *Trichosporon mucoides*, 1 *Malassezia pachydermatis*) e 2 (4,44%) como amostras inconclusivas (Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3 - Resultado da identificação das espécies de leveduras isoladas através do sistema API 20C AUX (bioMérieux)

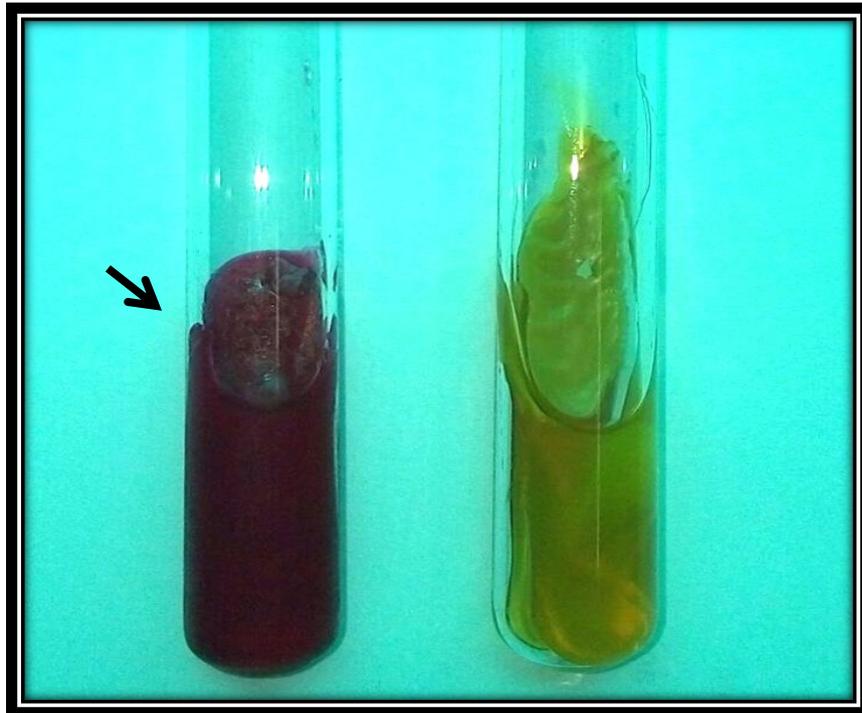


* Amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.

5.3.5 Prova bioquímica da urease

A prova bioquímica que demonstra a capacidade da levedura de produzir a enzima urease, foi positiva em 8 amostras das 45 isoladas, um total aproximado de 17,77%. A positividade foi determinada quando a reação de alcalinização do meio de cultura por conta do excesso de amônia formada pela hidrólise da uréia verteu a coloração amarelada do meio para róseo escuro, como demonstra a Figura 5.7.

Figura 5.7 - Teste de urease - Verifica-se positividade da amostra (seta) com a mudança de coloração do meio



5.4 Resultados comparativos - Identificação fenotípica e bioquímica

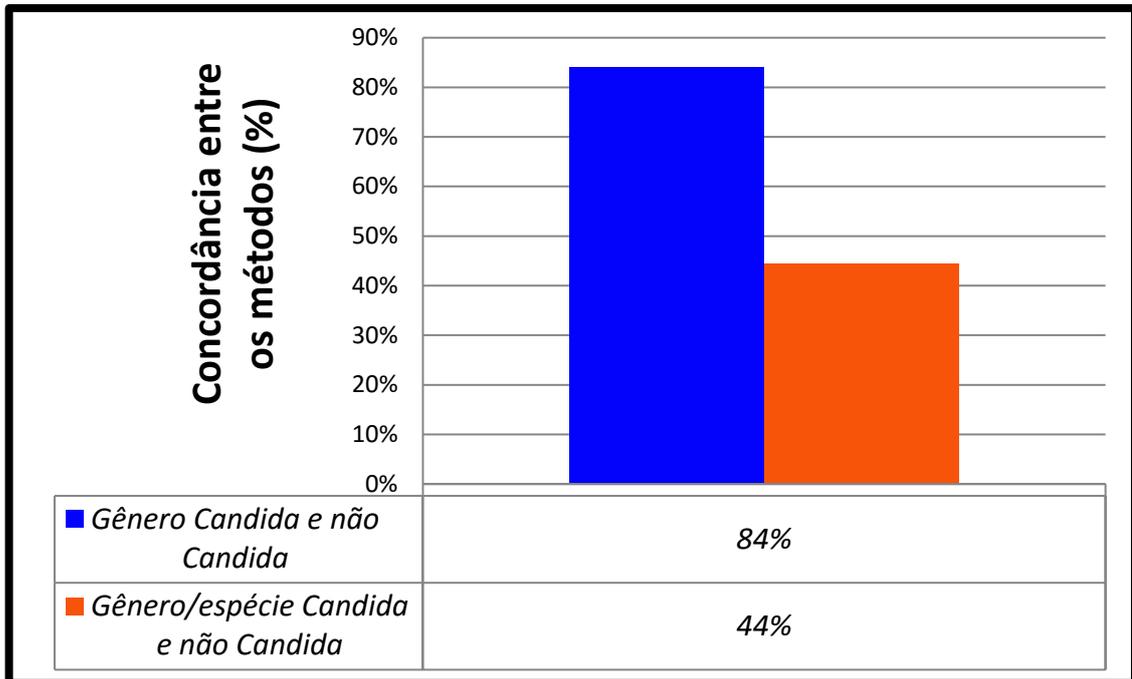
Para a identificação definitiva das amostras isoladas da cavidade oral dos cães, os resultados obtidos nos testes fenotípicos e bioquímicos foram analisados conjuntamente.

A partir da utilização do "kit" comercial API 20C AUX, foi possível identificar 95,5% das leveduras isoladas. As amostras consideradas inconclusivas tiveram suas características, macro e micromorfológicas, compatíveis com uma das espécies de *Trichosporon* e *Malassezia*.

Ao comparados os resultados obtidos pelo método comercial de identificação presuntiva CHROMAGAR *Candida*® e os resultados pelo teste bioquímico API 20C AUX, foi possível formular diferentes análises de concordância entre as técnicas.

Quando a concordância dos testes é analisada apenas em relação a identificação entre gênero *Candida* ou não *Candida*, os métodos obtiveram igualdade entre os resultados de 84,4% (38 amostras). Entretanto, quando para a análise de concordância for levada em consideração a identificação do gênero (*Candida spp* ou não *Candida spp*) e da espécie específica de *Candida spp*, os resultados foram iguais em apenas 44,4% das amostras (20 amostras) (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 – Comparação de igualdade dos resultados de identificação de leveduras pelos métodos comerciais CHROMAGAR *Candida*® e API 20C AUX



* Amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.

Como esperado, o método cromogênico não identificou outros gêneros de leveduras, portanto, a superioridade do sistema API 20C AUX ficou mais evidente neste requisito.

Buscando uma interpretação estatística de concordância entre os métodos CHROMAGAR e o API 20C Aux, foi realizada uma tabela de classificação (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Frequência para as categorias de classificação dos métodos CHROMAGAR *Candida*® e API 20C AUX

CHROMagar®	API 20C AUX			Total
	<i>Candida spp</i>	Inconclusivo	Não <i>Candida spp.</i>	
<i>Candida spp</i>	37 (82,2%)	2 (4,5%)	5 (11,1%)	42 (97,8%)
Inconclusivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Não <i>Candida.</i>	0 (0%)	0(0%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)
Total	37 (82,2%)	2 (4,5%)	6 (13,3%)	45 (100%)

*Note que apenas o método API 20C AUX gerou resultados inconclusivos

Para descrever a intensidade da concordância entre os dois métodos, foi utilizado o coeficiente Kappa de concordância (Mchugh, 2012). Considerando a classificação dos dois métodos citados anteriormente, observou-se um coeficiente Kappa de concordância de 0.194 (Tabela 5.7). No entanto, considerando um nível de significância de 5%, não há uma diferença estatisticamente significativa da concordância esperada devido ao acaso (P-Valor = 0,262).

Tabela 5.7 - Resultados do coeficiente de concordância para os métodos CHROMAGAR *Candida*® e API 20C AUX

Kappa	I.C.* 95%	P-Valor
0.194	-0,354 ; 0.743	0,262

* I.C. - intra-class coefficient

A presença da estrutura fúngica denominada de tubo germinativo e a formação de clamidoconídios são características da espécie *C. albicans*. Quando analisados os resultados de formação do tubo germinativo e de clamidocônídeos juntamente com a identificação pelo método API 20C AUX, 100% das espécies identificadas como *C. albicans* tiveram formação de tubo germinativo, porém apenas 35,3% destas formaram clamidoconídios. Apesar desse fato, 100% das cepas que tiveram formação

de clamidoconídios positiva foram identificadas como de fato da espécie *C. albicans* pelo sistema API 20C AUX (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Resultados pareados com relação as cepas identificadas como *C. albicans*, formação de tubo germinativo e pesquisa para clamidoconídio

Identificação numérica das cepas***	Pesquisa de tubo germinativo (+* ou -**)	Pesquisa de clamidoconídio (+* ou -**)
1	+	-
2	+	+
4	+	+
7	+	-
8	+	+
9	+	-
11	+	-
14	+	-
20	+	+
24	+	-
26	+	-
30	+	+
32	+	+
33	+	-
40	+	-
41	+	-
44	+	-

+* = Positivo; -** = Negativo

***Amostras de leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.

Ainda no teste de microcultivo, foi pesquisada a presença de filamentação das leveduras com formação de artroconídios, uma característica do gênero *Trichosporon*. Dentre as 45 cepas de levedura isoladas, 5 (11,1%) delas foram identificadas pelo

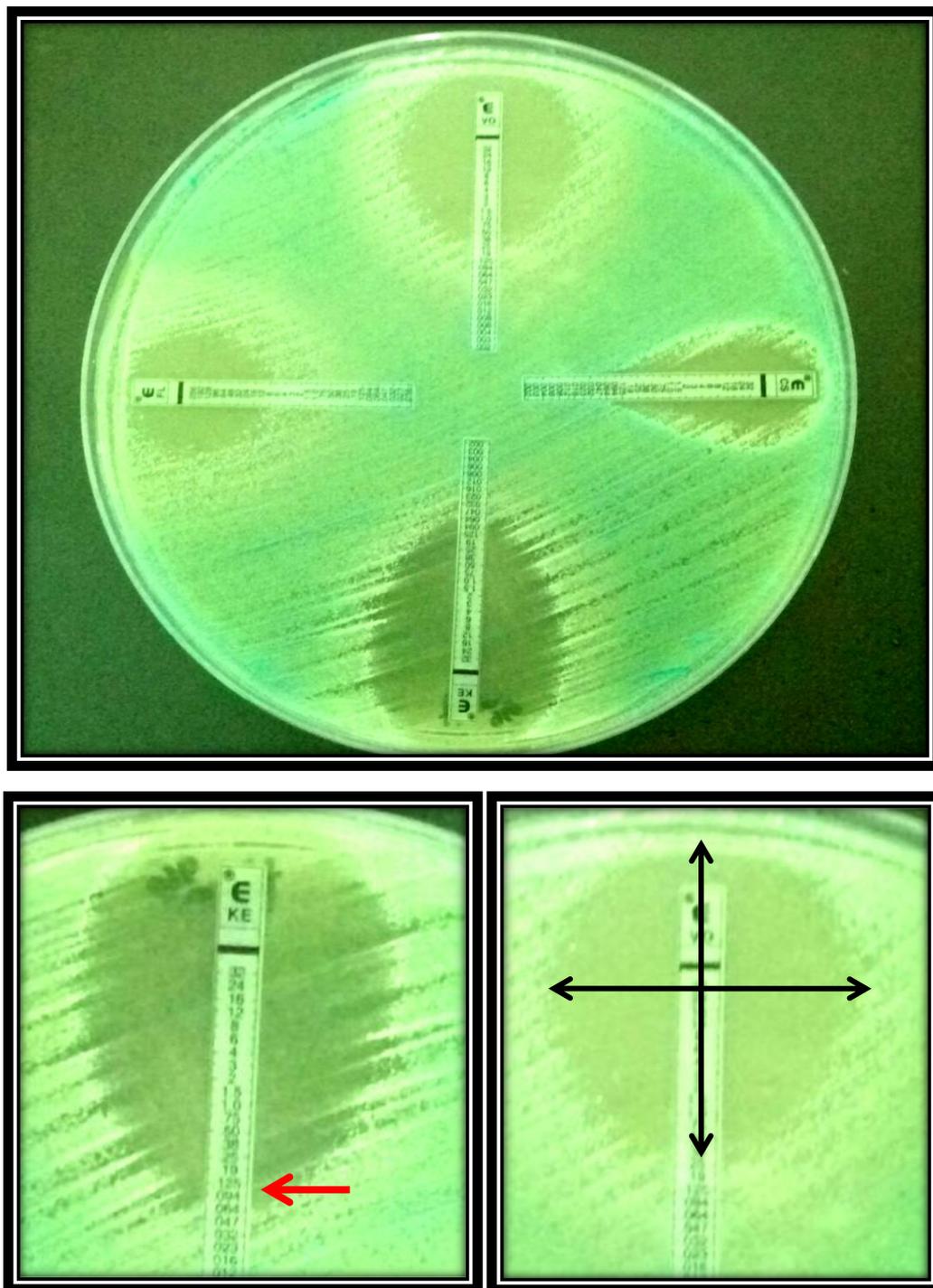
método bioquímico API 20C AUX como leveduras do gênero *Trichosporon*, e 100% destas apresentaram característica de filamentação com formação de artroconídios.

A reação de hidrólise da uréia, no teste de urease, foi positiva em 17,8% das amostras. Quando analisada juntamente à identificação pelo método API 20C AUX, 100% das leveduras identificadas como pertencentes do gênero *Trichosporon* e do gênero *Malassezia* tiveram positividade para a prova da urease, e 100% das espécies identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* foram negativas para este teste. Uma das duas amostras que tiveram resultado inconclusivo no teste API 20C AUX também foi positivas para o teste da urease.

5.5 Perfil de sensibilidade antifúngica - Método "Etest"

Por meio do teste comercial de difusão em ágar "Etest" (AB Biodisk, Solna, Suécia) as cepas isoladas tiveram o seu perfil de sensibilidade antifúngica testada frente aos principais antifúngicos utilizados na medicina veterinária e humana, que são o Miconazol (MYC), Itraconazol (IT), Cetoconazol (CET), Fluconazol (FL), Caspofungina (CS) e Voriconazol (VOR) (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Método "Etest" - Verifica-se crescimento da levedura e formação do halo de inibição, indicando a CIM (seta vermelha). Leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo



Os resultados da CIM ($\mu\text{g/mL}$) obtidos foram tabelados juntamente com a identificação das leveduras pela análise fenotípica e bioquímica (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Resultados da CIM ($\mu\text{g/mL}$) obtidos no teste de difusão em ágar pelo método "Etest"

Identificação API 20C AUX	MYC	IT	CET	FL	CS	VOR
<i>Candida albicans</i>	0,067	0,094	0,033	3	0,002	0,097
<i>C. albicans</i>	0,064	0,250	0,032	3	0,064	0,032
<i>C. tropicalis</i>	0,047	0,250	0,023	3	0,125	0,047
<i>C. albicans</i>	0,097	0,150	0,032	3	0,003	0,190
<i>C. parapsilosis</i>	0,770	0,129	0,094	2	1,000	0,125
<i>Trichosporon mucoides</i>	> 32	0,750	1,000	1	> 32	0,032
<i>C. albicans</i>	0,064	0,129	0,044	3	0,023	0,097
<i>C. albicans</i>	0,059	0,350	0,039	3	0,058	0,037
<i>C. albicans</i>	0,064	0,060	0,028	3	0,250	0,047
<i>C. krusei</i>	0,023	0,002	0,012	6	0,094	0,094
<i>C. albicans</i>	0,061	0,094	0,035	3	0,004	0,094
<i>Malassezia pachydermatis</i>	> 32	0,004	0,012	3	> 32	0,012
<i>C. parapsilosis</i>	0,850	0,129	0,063	4	3,000	0,125
<i>C. albicans</i>	0,064	0,064	0,023	2	0,250	0,047
<i>C. parapsilosis</i>	0,750	0,128	0,091	3	1,000	0,122
<i>Trichosporon asahii</i>	> 32	0,750	1,500	8	> 32	0,500
<i>C. parapsilosis</i>	0,750	0,125	0,094	3	1,000	0,125
Inconclusivo	0,190	1,000	0,750	96	0,125	0,500
<i>C. guilliermondii</i>	1,000	0,125	0,064	8	0,380	0,125

Continua

continuação

Identificação API 20C AUX	MYC	IT	CET	FL	CS	VOR
<i>C. albicans</i>	0,094	0,190	0,032	3	0,002	0,190
<i>C. zeylanoides</i>	0,094	0,125	0,190	> 256	0,380	0,380
<i>C. tropicalis</i>	0,094	0,094	0,032	3	0,032	0,125
<i>C. zeylanoides</i>	0,032	0,190	0,250	48	0,125	0,380
<i>C. albicans</i>	0,047	0,064	0,032	2	0,064	0,094
<i>C. zeylanoides</i>	0,012	0,094	0,094	>256	0,500	0,750
<i>C. albicans</i>	0,064	0,064	0,023	2	0,250	0,047
<i>Trichosporon</i> <i>spp</i>	> 32	> 32	4,000	8	> 32	0,250
<i>C. krusei</i>	0,047	0,064	0,125	> 256	0,500	0,500
<i>C. krusei</i>	0,032	0,125	0,094	> 256	0,500	0,500
<i>C. albicans</i>	0,074	0,250	0,039	3	0,068	0,032
Inconclusivo	0,250	0,250	0,380	2	0,380	0,047
<i>C. albicans</i>	0,094	0,195	0,032	3	0,002	0,196
<i>C. albicans</i>	0,064	0,094	0,032	3	0,002	0,094
<i>Trichosporon</i> <i>spp</i>	> 32	3,000	0,250	> 256	> 32	0,125
<i>C. zeylanoides</i>	0,047	0,054	0,131	96	0,190	0,590
<i>C. parapsilosis</i>	0,750	0,125	0,064	4	3,000	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	0,750	0,064	0,032	3	1,500	0,064
<i>C. parapsilosis</i>	0,690	0,150	0,098	4	1,000	0,131
<i>C. zeylanoides</i>	0,047	0,047	0,125	96	0,190	0,500

Continua

Conclusão

Identificação API 20C AUX	MYC	IT	CET	FL	CS	VOR
<i>C. albicans</i>	0,064	0,125	0,047	3	0,023	0,094
<i>C. albicans</i>	0,064	0,099	0,037	3	0,002	0,094
<i>Trichosporon asahii</i>	> 32	1,000	1,000	16	> 32	0,350
<i>C. parapsilosis</i>	0,650	0,064	0,039	3	1,550	0,065
<i>C. albicans</i>	0,064	0,064	0,023	2	0,250	0,053
<i>C. zeylanoides</i>	0,035	0,190	0,360	44	0,129	0,380

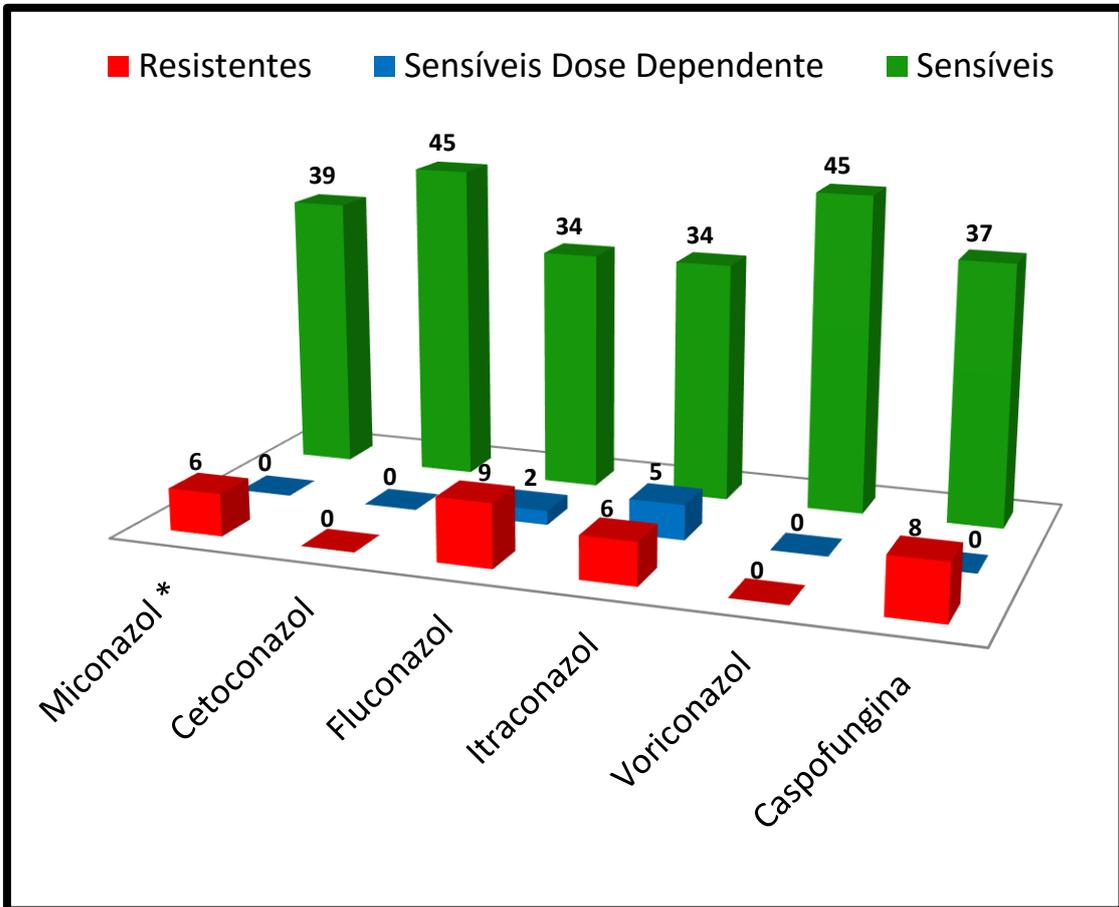
MYC - Miconazol; IT - Itraconazol; CET - Cetoconazol; FL - Fluconazol; CS - Caspofungina; VOR - Voriconazol. Nota: Resultados de Resistência (**cor vermelha**) e de Sensibilidade dose dependente (**cor azul**) em destaque.

* Leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.

Ao classificar as leveduras em sensíveis, sensíveis dose dependente e em resistentes, o resultado observado foi de que 35,6% (16) das amostras apresentaram resistência a algum dos antifúngicos testados, 13,3% (6) apresentaram sensibilidade dose dependente e o restante, 23 (51,1%), foram sensíveis.

Analisando individualmente o desempenho dos antifúngicos sob o crescimento das leveduras, foi estabelecido, seguindo os valores estipulados pelo CLSI (2002 e 2008), a porcentagem das amostras com relação a classificação de sensíveis (S), sensíveis dose dependente (SD) e resistentes (R), resultados dispostos nos Gráficos 5.5.

Gráfico 5.5 - Classificação leveduras isoladas da cavidade oral de cão em sensíveis (S), sensíveis dose dependente (SD) e resistentes aos antifúngicos MYC, IT, CET, FL, CS e VOR



** Leveduras isoladas da mucosa oral de cães, SRD, Campinas, São Paulo.
 Fonte: Documentos CLSI (2002, 2008) e Dalazen et al. (2011)*.

Além da porcentagem total de sensibilidade/resistência dos isolados, a relação do perfil de sensibilidade das espécies de levedura, frente aos antifúngicos, foi tabulada, separadamente, e disposta nas Tabelas 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15.

Tabela 5.10 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Miconazol

Leveduras identificadas	Miconazol						Total	
	Resistente		Sensibilidade dose/dependente		Sensível			
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	17	100	17	100
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	8	100	8	100
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	3	100	3	100
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	6	100	6	100
<i>Trichosporon spp.</i>	2	100	-	-	-	-	2	100
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	100	-	-	-	-	1	100
<i>Trichosporon asahii</i>	2	100	-	-	-	-	2	100
<i>Malassezia pachydermatis</i>	1	100	-	-	-	-	1	100
<i>Inconclusivel</i>	-	-	-	-	2	100	2	100

Obs.: A análise estatística não pode ser realizada, pois não foi encontrada variância entre os resultados

Tabela 5.11 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Cetoconazol

Leveduras identificadas	Cetoconazol						Total	
	Resistente		Sensibilidade dose/dependente		Sensível			
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	17	100	17	100
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	8	100	8	100
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	3	100	3	100
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	6	100	6	100
<i>Trichosporon spp.</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Trichosporon mucoides</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Malassezia pachydermatis</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Inconclusivel</i>	-	-	-	-	2	100	2	100

Obs.: A análise estatística não pode ser realizada, pois não foi encontrada variância entre os resultados

Tabela 5.12 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Fluconazol

Leveduras identificadas	Fluconazol						Total	P-Valor*	
	Resistente		Sensibilidade dose/dependente		Sensível				
	n	%	N	%	n	%			n
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	17	100	17	100	
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	2	100	2	100	
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	8	100	8	100	
<i>Candida krusei</i>	2	67	-	-	1	33	3	100	
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	100	1	100	
<i>Candida zeylanoides</i>	6	100	-	-	-	-	6	100	<0,0001
<i>Trichosporon spp.</i>	1	50	-	-	1	50	2	100	
<i>Trichosporon mucoides</i>	-	-	-	-	1	100	1	100	
<i>Trichosporon asahii</i>	1	50	1	50	-	-	2	100	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	-	-	-	-	1	100	1	100	
<i>Inconclusivel</i>	1	50	-	-	1	50	2	100	

* Teste qui-quadrado (significância de 5%).

Tabela 5.13 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Itraconazol

Leveduras identificadas	Itraconazol						Total		P-Valor*
	Resistente		Sensibilidade dose/dependente		Sensível				
	n	%	N	%	N	%	n	%	
<i>Candida albicans</i>	-	-	3	17,6	14	82,4	17	100	
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	1	50	1	50	2	100	
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	8	100	8	100	
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	3	100	3	100	
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	100	1	100	
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	6	100	6	100	<0,0001
<i>Trichosporon spp.</i>	2	100	-	-	-	-	2	100	
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	100	-	-	-	-	1	100	
<i>Trichosporon asahii</i>	2	100	-	-	-	-	2	100	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	-	-	-	-	1	100	1	100	
<i>Inconclusivel</i>	1	50	1	50	-	-	2	100	

* Teste qui-quadrado (significância de 5%).

Tabela 5.14 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente ao Voriconazol

Leveduras identificadas	Voriconazol						Total	
	Resistente		Sensibilidade dose/dependente		Sensível			
	n	%	N	%	n	%	n	%
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	17	100	17	100
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	8	100	8	100
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	3	100	3	100
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	6	100	6	100
<i>Trichosporon spp.</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Trichosporon mucoides</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Malassezia pachydermatis</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Inconclusivel</i>	-	-	-	-	2	100	2	100

Obs.: A análise estatística não pode ser realizada, pois não foi encontrada variância entre os resultados

Tabela 5.15 - Perfil de sensibilidade das leveduras isoladas da mucosa oral de cães frente a Caspofungina

Leveduras identificadas	Caspofungina						Total	
	Resistente		Sensibilidade dose/dependente		Sensível			
	n	%	N	%	n	%	n	%
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	17	100	17	100
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	2	100	2	100
<i>Candida parapsilosis</i>	2	25	-	-	6	75	8	100
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	3	100	3	100
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	-	1	100	1	100
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	6	100	6	100
<i>Trichosporon spp.</i>	2	100	-	-	-	-	2	100
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	100	-	-	-	-	1	100
<i>Trichosporon asahii</i>	2	100	-	-	-	-	2	100
<i>Malassezia pachydermatis</i>	1	100	-	-	-	-	1	100
<i>Inconclusivel</i>	-	-	-	-	2	100	2	100

Obs.: A análise estatística não pode ser realizada, pois não foi encontrada variância entre os resultados

Para melhor análise dos resultados, grande parte dos dados obtidos foi disposta em uma única tabela (Anexo D).

6 DISCUSSÃO

Assim como nos humanos, a cavidade oral dos animais é constituída por uma microbiota diversificada, composta por uma grande variedade de bactérias e leveduras potencialmente patogênicas (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002; Marinho et al., 2004; Santin, 2009).

O conhecimento desta microbiota é de fundamental importância para a medicina odontológica, pois grande parte das afecções deste órgão pode estar relacionada com a presença destes microrganismos (Santin, 2009).

Os distúrbios da cavidade oral nos cães podem afetar gravemente a saúde desses animais, pois geram incômodo e dor, fato que faz com que o cão pare de se alimentar, caindo assim sua imunidade, gerando complicação no seu quadro clínico (Kyllar; Witter, 2005).

Buscando melhorar a qualidade de vida dos animais de companhia, que hoje são considerados como membros importantes da família, a odontologia veterinária vem evoluindo cada vez mais (Duboc, 2009), sendo criada em 2002 a Associação Brasileira de Odontologia Veterinária (ABOV). Entretanto, visando seguir esta mesma evolução, se torna necessário maior enfoque nas pesquisas microbiológicas e na conscientização da higienização bucal desses animais (Roza, 2004).

Foram pesquisadas neste trabalho então, as leveduras presentes na cavidade oral de 50 cães, sem raça definida, da cidade de Campinas - SP, traçando, conjuntamente, o perfil de sensibilidade das espécies identificadas aos principais antifúngicos utilizados na medicina veterinária.

6.1 Avaliação e coleta das amostras da cavidade oral dos cães

Os cães são animais domésticos, geralmente dóceis, porém, em situações de desconforto e/ou medo, podem apresentar reações agressivas, comprometendo a segurança do veterinário e do próprio animal (Arhant et al., 2010). Devido a este fato, para o manuseio adequado e para a segurança dos animais deste estudo, os cães foram previamente submetidos a anestesia dissociativa.

A xilazila é um tranqüilizante muito utilizado na clínica veterinária. Trata-se de um agonista $\alpha 2$ -adenorreceptores centrais e periféricos com ação sedativa, miorrelaxante e analgésica (Spinosa et al., 1996). A associação da xilazina com o anestésico dissociativo cetamina é a combinação mais popular na clínica de pequenos animais. A característica da cetamina é a analgesia, catalepsia e amnésia profunda, sem perda dos reflexos oral, ocular e de deglutição (Morais et al., 2005).

Por se tratar de um procedimento pouco invasivo, foi utilizada neste estudo a menor dose de ambos os fármacos, xilazina e cetamina, preconizada por Crivellenti e Crivellenti (2013), que foi, respectivamente, 0,3mg e 10,0mg do fármaco por quilo do peso do animal.

Durante todo o período, anestésico e pós-anestésico, os animais ficaram sob monitoramento veterinário, sendo avaliados os parâmetros de frequência cardíaca, temperatura retal, pressão sangüínea arterial não-invasiva, mensurada na artéria radial, e frequência respiratória.

A população estudada foi constituída casualmente por 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino, de peso variado, sendo o peso mínimo de 5,1 kg e o máximo de 29,6 kg, somando uma média geral de 13,21 kg. Como se tratavam de animais errantes, a idade foi aproximada, com uma margem de erro mínima, pois todos os animais selecionados foram acolhidos ainda filhotes pelo Departamento de Proteção e Bem-Estar Animal (DPBEA), localizado no Parque Via Norte, Campinas, São Paulo. Assim como o peso, a idade também foi variável, com uma média de 4 anos, sendo que o animal mais novo possuía 1 ano de idade e o mais velho 9 anos.

A avaliação da cavidade oral individual dos animais e a coleta das amostras foram realizadas apenas no período anestésico do animal. A partir dessa avaliação, os animais foram classificados como aparentemente portadores ou não de doença periodontal.

A doença periodontal é a enfermidade mais comum que afeta os cães de todas as raças, responsável pela gengivite (inflamação da gengiva) e pela destruição do tecido que sustenta o dente, efeito denominado como periodontite. Devido a má higienização bucal dos cães e a falta de profilaxia, a doença periodontal é comum nesta espécie, geralmente causada pela formação das placas bacterianas. Essas placas são formadas por microrganismos proliferativos, células de defesa (leucócitos e macrófagos), células epiteliais, polissacarídeos bacterianos e glicoproteínas

salivares, que com o tempo se organizam, ocorrendo a mineralização com formação do cálculo dentário, vulgarmente conhecido como "tártaro" (Garcia et al., 2008).

O valor encontrado de animais sem raça definida com doença periodontal foi de 68%, resultado muito próximo ao de Kyllar e Witter (2005), no qual verificaram que de 348 cães, 61,3% apresentavam depósito de cálculo e 60% apresentaram periodontite (agentes etiológicos da doença periodontal).

Para verificar se a doença periodontal é independente do sexo, foi utilizado o teste estatístico qui-quadrado, considerando um nível de significância de 5%. Após a análise, foi verificada que a relação de macho e fêmea não foi significativa para a variável presença de doença periodontal. No estudo de Gouveia (2009), na qual avaliou a presença e o grau de doença periodontal em 196 cães de raça pura e de raça indeterminada, também obteve independência entre o sexo e a presença de doença periodontal.

Quando analisada a idade do animal com a presença de doença periodontal, o resultado obtido foi semelhante ao encontrado por Roza (2004), na qual foi verificado que animais com idade superior a 4 anos tem maior probabilidade a desenvolver esta doença, incluindo desde quadros de gengivite discreta à severa periodontite. Essa hipótese também já tinha sido aceita nos estudos de Gouveia (2009) e de Santin (2009), reforçando ainda mais a significância da idade sobre a presença de doença periodontal nos cães.

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de um "swab" estéril alginatado, umidificado com solução de salina estéril, que foi introduzido na cavidade oral de cada animal, em movimentos circulares, na região de mucosa oral. Esta técnica foi utilizada anteriormente por Santin (2009) e Prina et al. (2015), método indicado para isolamento e crescimento de microrganismos em meios de cultura.

Após a coleta dos animais, as amostras foram encaminhadas, imediatamente, para o laboratório de leveduras patogênicas "Professora Doutora Claudete Rodrigues Paula", localizado em Campinas, São Paulo, onde foram semeadas e cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD), acrescido de cloranfenicol, com observação diária por 20 dias.

A partir da semeadura das amostras colhidas da cavidade oral dos 50 cães, foram isoladas 45 amostras de fungos leveduriformes.

6.2 Isolamento das leveduras neste estudo

Pesquisas microbiológicas envolvendo animais de companhia começaram a ganhar atenção em meados do século XX, na qual quadros de otite em cães causados por leveduras do gênero *Malassezia spp.* foram discutidos em 1965 por Fraser (1965). A partir desse ano, foram surgindo variadas pesquisas micológicas, porém, todas envolvendo principalmente o conduto auditivo e o tegumento dos animais.

Apesar da sua notável importância para a saúde do animal, estudos envolvendo o isolamento e a identificação das leveduras da cavidade oral dos cães começaram a ser desenvolvidos somente a partir do século XXI, como o estudo de Braga et al. (2005), por exemplo, na qual pesquisou o isolamento e identificação da microbiota oral de 29 cães da raça Pastor Alemão. A partir desse ano, poucas pesquisas envolvendo este assunto foram realizadas e, dentre os resultados obtidos, a concordância foi variada.

Segundo a literatura, os principais fungos associados com a colonização de cavidades naturais de cães pertencem aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichophyton*, *Trichosporon*, *Malassezia*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Microsporum*, *Penicillium* e *Scopulariopsis* (Cleff et al., 2007; Bentubo et al., 2010).

As leveduras isoladas e identificadas neste estudo foram, em ordem de frequência de isolamento, pertencentes aos gêneros *Candida* (86,1%), *Trichosporon* (11,6%) e *Malassezia* (2,3%), leveduras consideradas como agentes etiológicos de micoses graves em humanos (Carrillo-Muñoz et al., 2006). Duas amostras de leveduras tiveram resultado de identificação duvidoso, sendo consideradas como amostras inconclusivas e, apesar de apresentarem características sugestivas dos gêneros *Malassezia* e *Trichosporon*, ensaios de identificação por técnicas moleculares serão de real interesse para confirmação definitiva dos gêneros e espécies.

Malassezia pachydermatis é considerada parte da microbiota de vários sítios anatômicos em cães e gatos, sendo comumente isolada nos casos de dermatites e otites fúngicas (Santin, 2009). Na pesquisa de Brito et al. (2008), que estudaram o isolamento de leveduras da mucosa oral de 203 cães, *Malassezia pachydermatis* foi prevalente sobre os demais gêneros identificados.

Nos estudos realizados por Braga et al. (2005), Nardoni et al. (2007), Canizzo et al. (2007), Santin (2009) e por Prina et al. (2015), esta levedura foi isolada da cavidade oral, mesmo que com poucas unidades formadoras de colônia, assim como na presente pesquisa, demonstrando o fato de ser uma levedura considerada comensal da mucosa oral dos cães.

O gênero *Trichosporon*, também identificado neste estudo, já foi descrito em outras pesquisas, como a de Santin (2009). Apesar que em nosso estudo sua frequência de isolamento ter sido superior ao do gênero *Malassezia*, sua identificação nas literaturas revisadas foi diminuta, tornando-se necessários mais estudos para podermos indicar esta espécie como parte da microbiota oral normal desses animais. Em humanos, esta levedura é de importância médica, considerada como emergente e sua incidência vem aumentando nos últimos tempos, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Guethi, 2009).

Trichosporon asahii é a espécie mais importante do gênero, relacionada com enfermidades de alto risco em humanos, como granulocitopenia e tumores malignos (Lacaz et al., 2002). Foram isoladas da cavidade oral dos cães deste estudo, duas amostras identificadas como *Trichosporon asahii*. Esta espécie também já foi descrita como um emergente patógeno oportunista, capaz de causar infecções disseminadas, especialmente, septicemia (Lacaz et al., 2002), o que atribui maior importância de isolamento, principalmente se a espécie for relacionada como agente natural da microbiota oral dos cães.

Neste estudo, o gênero *Candida* foi o grande destaque, sendo isolado em 97,8% dos animais, compondo 82,2% do total das amostras identificadas. A espécie *C. albicans*, também identificada nos estudos de Greene (2006), Jadhav e Pal (2006), Moretti et al. (2007) e o de Santin (2009), foi a espécie mais frequente, seguida por *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, também já identificadas em outros estudos, como o de Ribeiro et al. (2009) e no próprio trabalho de Santin (2009). No estudo de Brito et al. (2008), apesar das amostras terem sido colhidas também da cavidade oral de cães, a espécie *C. albicans* não foi identificada. Em felinos, no estudo de Ferreira et al. (2002), esta foi a única levedura isolada da mucosa oral desses animais.

Além das espécies já descritas, foi isolada na cavidade oral dos cães, uma espécie mais rara de *Candida*, identificada como *Candida zeylanoides*. Dentre as 37 amostras de *Candida spp*, 16,2% (seis) foram identificadas como *C. zeylanoides*.

Poucos isolamentos de *C. zeylanoides* foram descritos em espécimes clássicos, sugerindo que esta levedura pode atuar como um patógeno oportunista. Segundo Meyer et al. (1984) e Lachance et al. (2011), foram isoladas e identificadas cepas de *C. zeylanoides* a partir de escarros, na Noruega, de água do mar, na Flórida, em fezes humanas, na Finlândia e em pele de humanos na Alemanha.

A Identificação desta espécie, a partir da mucosa oral de cães, ainda não foi descrita na literatura. Portanto, este achado em nossa pesquisa compõe um relato inédito de isolamento desta levedura na cavidade oral desta espécie de animal.

Candida spp é considerada como parte da microbiota oral de animais (Santin, 2009) e de humanos, representando significativa importância clínica, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Akpan; Morgan, 2002; Lacaz et al., 2002). A candidíase oral em humanos está envolvida, na maioria dos casos, com as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, representando em torno de 80% dos isolados da infecção clínica (Akpan; Morgan, 2002), resultado muito próximo ao encontrado na microbiota oral natural dos cães em nosso estudo, com exceção da espécie *C. glabrata*, na qual o isolamento foi negativo.

Furletti (2006) concluiu que pacientes humanos com doença periodontal apresentaram níveis de colonização por *Candida spp* relevantes, resultado que condiz com o encontrado em cães nesta pesquisa.

6.3 Provas de Identificação Microbiológicas

Para a identificação dessas leveduras, foram realizadas algumas provas tradicionais, como caracterização macro e micromorfológicas, pesquisa de tubo germinativo e clamidoconídios, produção da enzima urease (Meyer et al., 1984; Kurtzman; Fell, 1998); e testes comerciais, como o meio cromogênico (CHROMAGAR *Candida*® Microbiology, BioMerieux, Paris, França) e o "kit" API 20C AUX (BioMerieux, Paris, França).

Devido ao fato da cavidade oral dos cães apresentar, naturalmente, uma microbiota bacteriana bastante diversificada, fato demonstrado na pesquisa de Braga et al. (2005) e Greene (2006), foi utilizado, para o isolamento primário das amostras, o meio ágar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol, um antibiótico de

amplo espectro, eficaz contra bactérias gram-negativas, gram-positivas. O ASD é o meio mais utilizado para pesquisas micológicas, pois, devido o seu pH ser baixo, auxilia na inibição de algumas bactérias e permite o crescimento de variadas espécies de leveduras (Lacaz et al., 2002).

6.3.1 Caracterização Macromorfológica

A partir do crescimento e seleção das amostras leveduriformes, foi realizada a análise macromorfológica da colônia.

Para as culturas de *Candida spp* geralmente é observado crescimento de colônias brilhantes ou opacas, de coloração variada, indo de branco a creme, ligeiramente acinzentada ou rósea, de bordos regulares ou irregulares e com aspecto cremoso, liso, rugoso e/ou sulcado (Lacaz et al. 2002; Navarini, 2007; Gompertz et al., 2008b; Brito et al., 2009; Lachance et al., 2011).

Todas as 37 amostras de *Candida spp* isoladas apresentaram características condizentes com o descrito na literatura. Dentre estas amostras, 46% delas apresentaram coloração branca, com textura cremosa e de bordas regulares, 24% apresentaram coloração creme, textura lisa e bordas regulares, e 30% apresentaram coloração creme a rósea, com textura lisa e de bordas regulares.

Colônias do gênero *Thichosporon* apresentam coloração branca a creme, podendo se tornar amarelo-acinzentadas, inicialmente lisas, tornando--se enrugadas com bordas irregulares (Fisher; Cook, 2001; Bentubo, 2008; Kurtzman et al., 2011). Seis das 45 amostras isoladas apresentavam característica sugestiva desse gênero, sendo que, a grande maioria delas teve resultados de crescimento semelhantes aos obtidos por Bentubo (2008), com colônias de coloração creme, textura lisa/enrugadas e bordas irregulares. Dentre essas 6 amostras, 5 foram confirmadas como sendo desse gênero, e uma delas, apesar de ter apresentado características condizentes, necessita de maiores ensaios para diagnóstico definitivo.

Na morfologia macróscópica, as colônias de *Malassezia spp* geralmente apresentam coloração de branco-amarelada, brilhantes e pastosas, de bordos regulares (Fisher; Cook, 2001; Framil, 2010; Kurtzman et al., 2011). Apesar de apenas uma das amostras ter sido identificada como do gênero *Malassezia*, duas, dentre as

demais, apresentaram características macromorfológicas semelhantes as colônias desse gênero, revelando coloração branca a amarela, textura cremosa e bordas regulares.

6.3.2 Caracterização Micromorfológica

As provas micromorfológicas escolhidas para auxiliar na identificação das leveduras foram às provas de exame direto, tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídios.

Espécies do gênero *Candida* possuem brotamento que podem variar em unipolar, bipolar e multilateral, onde, em alguns casos, as gêmulas acabam por formar cadeias de células alongadas que possuem no local dos septos constrictões, as chamadas pseudo-hifas (Meyer et al., 1984; Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002). No exame direto, 17 das nossas amostras apresentaram características de células ovais, com brotamento múltiplo e presença de hifas, e 21 eram ovais, com brotamento único, com presença de hifas, ambas as características sugestivas dessa espécie.

Trichosporon spp apresentam brotamento por fissão (Meyer et al., 1984; Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002) caracterizado pela formação de artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas (Bentubo et al., 2010; Kurtzman et al., 2011). Cinco das amostras possuíam brotamento único, com presença de hifas dotadas de estruturas de artroconídeos.

Dentre as nossas amostras, apenas duas apresentaram formato redondo, com brotamento único, sendo sua base larga, e ausência de micélio, características do gênero *Malassezia* (Koneman et al., 2001; Lacaz et al., 2002; Kurtzman et al., 2011).

A pesquisa de tubo germinativo é uma prova fenotípica que visa a identificação de *Candida albicans* e *C. dubliniensis*, assim como a formação de clamidoconídios terminais, intercalares ou em cachos (Lacaz et al., 2002; Brito et al., 2009).

As amostras nas quais ocorreram positividade para a formação de tubo germinativo foram um total de 17, contabilizando 37,8% da amostragem total. Todas essas amostras positivas foram identificadas posteriormente como sendo *Candida albicans*; mostrando a grande importância deste teste para a identificação desta

espécie, resultado distinto do obtido por Kwon-Chung e Benett (1992), no qual refere que cerca de 5% das leveduras *C. albicans* não formaram tubo germinativo.

Apesar da literatura indicar a produção de clamidoconídio como sendo também uma característica dessa espécie (Lacaz et al., 2002), em nosso estudo apenas 35,3% (6) dentre as espécies identificadas como *C. albicans* foram positivas para este teste, demonstrando que a não produção de clamidoconídio não significa que a amostra de levedura não pertence a espécie *C. albicans* nos cães. Entretanto, a positividade para este teste indicou ser sugestiva desta espécie, uma vez que 100% das amostras que tiveram formação de clamidoconídios, realmente pertenciam à espécie *C. albicans*.

Segundo Lacaz et al. (2002), Quinn et al. (2005), Lachance et al. (2011), entre outras literaturas renomadas, uma das características para identificação presuntiva da espécie *C. albicans* é a formação de clamidoconídios em meio específico de crescimento. A formação desta estrutura por esta espécie de *Candida* foi identificada em diversos estudos, como o de Neufeld (2009), que verificou uma sensibilidade deste teste de 89,4% para identificação morfológica de *C. albicans*. Cleff et al. (2007) constatou a formação de clamidoconídio a partir de uma única amostra de *C. albicans* isolada do tegumento de um cão. Entretanto, estudos que avaliam a formação de clamidoconídios por *C. albicans* isoladas, especialmente, da cavidade oral dos cães, são raros.

Visto que neste estudo, contrariando o descrito pela literatura, a formação de clamidoconídio não foi alta para esta espécie, estudos com uma grande amostragem de *C. albicans* isoladas da mucosa oral de cães seriam fundamentais para caracterizar o perfil dessa levedura quanto ao micro cultivo em meios específicos.

A produção de micélio e de artroconídios é uma característica do gênero *Trichosporon* (Lacaz et al., 2002), estruturas que foram visualizadas em 100% (5) das amostras identificadas como pertencentes a este gênero, resultado também visto em outros estudos, como o de Bentubo (2008).

6.3.3 Identificação Presuntiva em meio cromogênico CHROMAGAR *Candida*®

O método comercial de identificação cromogênico CHROMAGAR *Candida*® é um teste já muito utilizado para identificação presuntiva de espécies de *Candida* e até

mesmo de espécies não *Candida*. De acordo com Ribeiro et al. (2009) e Menezes et al. (2011), este método mostrou ter concordância com os resultados de métodos clássicos. Além de facilitar a identificação presuntiva, o uso de meios cromógenos na rotina laboratorial auxilia na escolha correta da terapêutica e acelera a liberação dos resultados dos exames (Alfonso et al., 2010).

Segundo a indicação do próprio fabricante, e confirmada por estudos como o de Melo (2002), Araujo et al. (2005), Navarini (2007) e Viana e Carvalho (2012), a cor das colônias de *Candida albicans* é lisa e verde claro, as de *C. tropicalis* são escuras e azuladas, as de *C. krusei* aparecem com centro róseo e bordos brancos. *C. dubliniensis* apresenta crescimento da colônia em tonalidade verde escuro (Paula; Ruiz, 2010; Viana; Carvalho, 2012); as colônias de *C. glabrata* apresentam crescimento de coloração rosa a violeta e as demais espécies variam entre coloração branca e rosa (Melo, 2002; Ribeiro et al., 2009; Viana; Carvalho, 2012).

Em nosso estudo, todas as amostras isoladas foram repicadas neste meio cromogênico e sua coloração de crescimento anotada. Seguindo o padrão de identificação pela coloração citada anteriormente, os resultados obtidos classificaram as amostras em *Candida spp* ou não *Candida*. Por este método, seriam classificadas em *Candida spp* 44 das 45 amostras de leveduras, sendo elas 18 (40,0%) *C albicans*, 14(31,1%) *Candida spp*, 8 (17,8%) *C. tropicalis* e 4 (8,9%) *C. krusei*.

Quando comparado com o resultado final, este método presuntivo demonstrou boa concordância na identificação da espécie *C. albicans*, e concordância razoável para *C. krusei*, resultado também obtido por Menezes et al. (2011). Além disso, quando comparada a identificação em *Candida spp* e não *Candida*, o acerto foi de 84,4%, podendo ser considerada uma técnica de confiança para diferenciação do gênero *Candida* de outros gêneros.

O gênero *Trichosporon* apresentou coloração neste meio verde azulado, podendo gerar falso positivo para a espécie *C. tropicalis*. Porém, convém salientar que as colônias de *C. tropicalis* são lisas, e as de *Trichosporon spp* são, geralmente, enrugadas neste meio.

Bentubo et al. (2013) utilizaram esse meio como método de identificação de leveduras do gênero *Trichosporon*, entretanto o resultado não foi satisfatório, pois as leveduras apresentaram comportamento cromogênico variado, não permitindo assim sua identificação, crescendo, inicialmente, de coloração esverdeada e, posteriormente, tornando-se azul ou lilás.

Alem do gênero *Trichosporon*, Bentubo et al. (2013) estudaram o comportamento de *Saccharomyces cerevisiae* neste meio e verificaram coloração púrpura.

Uma das amostras de nosso estudo apresentou crescimento de coloração púrpura no meio CHROMAGAR *Candida*®, sendo posteriormente identificada como *Malassezia pachydermatis*. Salientamos então que a coloração púrpura desenvolvida neste meio não é específica para *Malassezia pachydermatise* para *Saccharomyces cerevisiae*.

6.3.4 Identificação Bioquímica - API 20C AUX e Urease

Os testes bioquímicos de identificação de leveduras utilizados neste estudo foram a pesquisa de positividade para hidrólise de uréia e o teste comercial de assimilação de fontes de carbono, o "kit" API 20C AUX.

O teste bioquímico, no qual se verifica a capacidade da levedura em hidrolisar a uréia, obteve resultados condizentes com as respostas esperadas das espécies identificadas. Todas as leveduras do gênero *Candida* apresentaram resultados negativos para a produção de urease, como descrito na literatura de Lachance et al. (2011).

As fases perfeitas dos gêneros *Trichosporon* e *Malassezia* pertencem a Divisão Basidiomicota. Uma característica dessa classificação taxonômica é a produção de urease, fato encontrado em nossos estudos. Já a fase perfeita das leveduras do gênero *Candida* isoladas, pertencem a Divisão Deuteromicota, cuja característica é a ausência da enzima urease, resultado também condizente com a nossa pesquisa (Meyer et al., 1984; Kurtzman; Fell, 1998).

O sistema API 20C AUX (BioMerieux, Paris, França) é um método rápido e eficaz de identificação de leveduras por meio do perfil de assimilação de substratos de fontes de carbono (Brito et al., 2009; Spolidorio et al., 2009). Segundo o trabalho de Silva e Candido (2005), o API20C AUX ofereceu vantagens de armazenamento, reprodutibilidade, estabilidade e facilidade de uso, quando comparado com as leveduras previamente identificadas pela metodologia clássica.

No nosso estudo, quando as leveduras foram identificadas pelo sistema API 20C AUX, somente duas amostras tiveram resultados inconclusivos, dentre as 45 amostras isoladas. Dessa maneira, a identificação das leveduras por este método foi de 95,5%. As leveduras isoladas foram: 37,8% *Candida albicans*, 17,8% *C. parapsilosis*, 13,3% *C. zeylanoides*, 6,7% *C. krusei*, 4,4% *C. tropicalis*, 2,2% *C. guilliermondii*, 4,4% *Trichosporon spp*, 4,4% *Trichosporon asahii*, 2,2% *Trichosporon mucoides* e 2,2% *Malassezia pachydermatis*.

6.3.5 Sistema API 20C AUX versus CHROMAGAR *Candida*®

Quando comparados os dois métodos de identificação comercial CHROMAGAR *Candida*® e o sistema API 20C AUX, ambos tiveram bons resultados dependendo da finalidade a ser utilizados.

Com relação a identificação da espécie específica do gênero *Candida*, com exceção das espécies *C. albicans* e *C. krusei*, o método cromogênico pode gerar dúvidas, necessitando assim de provas complementares, fato que não foi demonstrado pelo sistema API 20C AUX.

Além do sistema API 20 C AUX ter mostrado melhor desempenho na diferenciação das espécies de *Candida*, este método permite a identificação de outros gêneros de levedura, fato que ainda não pode ser verificado pelo meio CHROMAGAR *Candida*®. Apesar das leveduras do gênero *Trichosporon* apresentar coloração no meio cromogênico, faltam ainda estudos para sua diferenciação.

Buscando avaliar a concordância entre estes métodos, foi utilizado o coeficiente Kappa (Mchugh, 2012), considerado um nível de significância de 5%. Apesar dos resultados entre os métodos apresentarem certa igualdade, a concordância entre eles não foi estatisticamente significativa.

No Quadro 6.1 é possível verificar os resultados de identificação das leveduras isoladas da cavidade oral dos animais deste estudo pelo método cromogênico e pelo sistema API 20C AUX.

ANIMAL	LEVEDURA	CHROMAGAR®	API 20C AUX
2	1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
3	2	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
	3	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
5	4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
7	5	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
8	6	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>
	7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
9	8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
14	10	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
15	12	Não <i>Candida spp.</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
	13	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
16	11	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
18	14	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
19	15	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
20	16	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporonasahii</i>
	17	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
	18	<i>C. krusei</i>	Inconclusivo
21	19	<i>Candida spp</i>	<i>C. guilliermondii</i>
22	20	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
23	21	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i>
24	22	<i>Candida spp</i>	<i>C. tropicalis</i>
25	23	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i>
26	24	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
27	25	<i>Candida spp</i>	<i>C. zeylanoides</i>

continua

conclusão

ANIMAL	LEVEDURA	CHROMAGAR®	API 20C AUX
	26	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
28	27	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon spp</i>
	28	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
	29	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
29	30	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
31	31	<i>Candida spp</i>	Inconclusivo
32	32	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
33	33	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
35	34	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon spp</i>
	35	<i>Candida spp</i>	<i>C. zeylanoides</i>
36	36	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
40	37	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
41	38	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
43	39	<i>Candida spp</i>	<i>C. zeylanoides</i>
45	40	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46	41	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
	43	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
	42	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
50	44	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
	45	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i>

6.4 Perfil de Sensibilidade aos Antifúngicos

A partir da identificação das leveduras obtidas pelos testes fenotípicos e bioquímicos descritos anteriormente, foram traçados os perfis de sensibilidade aos antifúngicos. Além de serem poucos os estudos que envolvem a identificação das leveduras presentes na microbiota oral de cães, pesquisas do perfil de sensibilidade desses fungos são raros, ou até mesmo inexistentes.

Na medicina veterinária, a lista de substâncias antifúngicas é bastante extensa, porém muito restrita quando comparada com o número de drogas antibacterianas. Decorrente da grande semelhança entre a célula fúngica e a célula do hospedeiro, a ação dos agentes antifúngicos apresenta toxicidade relativamente alta, necessitando assim de adequada aplicação na clínica, buscando minimizar os efeitos colaterais (Nobre et al., 2002). Além disso, segundo Navarini (2007), o crescente aumento da resistência dos fungos contra os antifúngicos vem se tornando fato preocupante.

A escolha adequada do agente antifúngico é, portanto, determinante na resposta terapêutica do animal (Nobre et al., 2002). Para isso, pesquisas que visão determinar o perfil antifúngico das principais leveduras isoladas dos cães torna-se de grande valia (Roza, 2004; Braga et al., 2005; Santin, 2009).

No estudo de Santin (2009), que identificou leveduras da cavidade oral de cães, foi também realizado um perfil de sensibilidade, porém apenas frente aos antisépticos usados na medicina veterinária.

Segundo Maia (2011), o monitoramento da sensibilidade antifúngica "in vitro" em espécies de *Candida* de origem veterinária é uma prática recente, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados. A resistência das leveduras aos tratamentos tem se tornado mais freqüente, necessitando também de maiores pesquisas voltadas para a compreensão deste fenômeno e para a busca por alternativas terapêuticas (Maia, 2011).

Existem hoje dois conceitos de resistência das leveduras; a resistência clínica e microbiológica. Quando se tem a persistência ou progressão de uma infecção fúngica, mesmo com a administração do antifúngico, esta é denominada resistência clínica e, neste caso, podem ser realizados testes que determinam a sensibilidade do fungo "in vitro" a determinados antifúngicos (Perea; Patterson, 2002; Neufeld, 2009; Cury, 2010; Lins, 2013). A resistência microbiológica está relacionada com a capacidade, intrínseca ou primária, do agente etiológico em se desenvolver na presença dos antifúngicos "in vitro" (Mellado et al., 2002; Melhem, 2004; Melhem; Szeszs, 2010).

Em nossa pesquisa, os antifúngicos utilizados foram escolhidos levando em consideração a utilização no tratamento de animais nos casos de micoses superficiais, profundas e sistêmicas. Foram utilizados então, cinco antifúngicos da classe dos azóis, o miconazol, cetoconazol, fluconazol e o itraconazol, e um da classe dos equinocandinas, a caspofungina.

Com relação a utilização desses fármacos na clínica médica veterinária, o miconazol é comumente indicado para tratamento de dermatofitose, malassezioses e candidíases. O cetoconazol, fluconazol e o itraconazol estão freqüentemente relacionados com o tratamento de micoses superficiais, subcutâneas e sistêmicas. O voriconazol também é utilizado para o tratamento de micoses sistêmicas, principalmente na candidíases, aspergilose e criptococose em pacientes debilitados, imunossuprimidos ou em casos de resistência para outro antifúngico (Nobre et al.,

2002). Apesar da caspofungina não ser ainda um antifúngico utilizado na medicina veterinária, seu emprego pode futuramente ser de grande interesse, portanto, também foi utilizada no teste de sensibilidade do nosso estudo.

Assim como em diversos estudos micológicos, a técnica utilizada para a avaliação da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos foi o método "Etest". O "Etest" é um método comercial rápido e prático, que proporciona resultados qualitativos e quantitativos, pela visualização de halos de inibição e pela intersecção deste halo com a concentração do antifúngico impregnado na fita sobre o meio de cultura sólido (Espinel-Ingroff et al., 1992).

A interpretação da concentração inibitória mínima das leveduras foi realizada seguindo as indicações estipuladas pelos documentos M27A2 (2002) e M27A3 (2008), descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Esta interpretação discrimina os valores por antifúngicos. Além desses documentos, para o miconazol, especificamente, foi utilizado o estudo de Dalazen et al. (2011) como referência para a interpretação dos resultados.

Dependendo do resultado obtido, as leveduras foram classificadas em sensível, sensível dose dependente ou resistente. Dentre as amostras isoladas, 35,6% (16) apresentaram característica de resistência a algum dos antifúngicos testados, 13,3% (6) apresentaram sensibilidade dose dependente e o restante, 51,1% (23), foram sensíveis. Esta análise geral dos resultados obtidos pelo teste de sensibilidade mostrou preocupante porcentagem de resistência das amostras isoladas aos antifúngicos utilizados.

O aparecimento de cepas resistentes ao grupo dos azóis vem sendo relatada há tempos, resistência atribuída ao uso excessivo desses fármacos e também pela desvantagem da resistência cruzada que existe nesta classe (Bergold; Georgiadis, 2004).

Dentre o grupo dos azóis testados, o perfil de sensibilidade foi variado. Entre os imidazóis, o cetoconazol foi o antifúngico que apresentou melhor ação sobre as leveduras isoladas, demonstrando sensibilidade em 100% das amostras.

O primeiro antifúngico da família dos azóis usado por via oral no tratamento de micoses foi cetoconazol. Devido a este fato, este fármaco era muito utilizado na medicina veterinária (Appelt; Cavalcante, 2008). De acordo com Nobre et al. (2002), o cetoconazol é um antifúngico de boa atividade "in vitro" contra a levedura *M. pachydermatis*, apresentando baixo índice de resistência.

Segundo Appelt e Cavalcante (2008), tanto o cetoconazol como o miconazol têm mostrado bons resultados nas infecções auriculares causada pela levedura *Malassezia pachydermatis*, e nos casos de malassezíases cutânea, o cetoconazol é a droga de eleição.

Nascente et al. (2009) realizou um estudo de comparação de técnicas de sensibilidade "in vitro" ao cetoconazol. Neste estudo, foram isoladas 17 amostras de *M. pachydermatis* provenientes de otite externa em cães, e como resultado, foi verificado resistência de 11,8% das amostras ao cetoconazol, 41,1% de sensibilidade dose dependente e 47,1% de sensibilidade. Esses valores obtidos contradizem com o relatado por Nobre et al. (2002) e por Appelt e Cavalcante (2008), além de não se assemelhar com os achados de nosso estudo.

Nakano et al. (2005) realizaram um estudo em cães com e sem otite externa, na qual foram isolados a levedura *Malassezia pachydermatis* em ambos os grupos. No teste de sensibilidade frente aos antifúngicos nistatina, cetoconazol e terbinafina, nenhuma das amostras foi resistente.

No estudo de Moreira (2012), na qual buscou isolar *Candida spp.* de 258 mulheres com e sem sintomas de candidíase vulvovaginal, atendidas no Centro de Saúde Geraldo Paula Souza, a porcentagem obtida de amostras sensíveis ao cetoconazol foi muito próxima ao identificado nos cães, obtendo um resultado de sensibilidade a este antifúngico de 96,3%.

Devido o alto grau de toxicidade do cetoconazol, foram introduzidos, recentemente, outros fármacos no tratamento de infecções fúngicas em animais (Appelt; Cavalcante, 2008).

Para o miconazol, dentre as 45 cepas avaliadas, foram encontradas seis amostras resistentes (13,3%), sendo elas cinco leveduras pertencentes ao gênero *Trichosporon* e uma *Malassezia pachydermatis*. Esse dado mostra que 100% das espécies desses dois gêneros foram resistentes a este antifúngico, resultado obtido que contradiz com a indicação de Nobre et al. (2002), na qual descreve o miconazol como sendo um antifúngico de escolha para o tratamento das malassezíases, e o de Fagundes Júnior et al. (2008), que recomenda os azóis para tratamento ou combinação de tratamento da trichosporonose nos cães.

Segundo Farias e Giuffrida (2002), os antifúngicos cetoconazol, miconazol e clotrimazol têm excelentes resultados nas infecções auriculares causadas pela *Malassezia pachydermatis*, discordando parcialmente com os achados neste estudo.

O miconazol também tem sido indicado como tratamento de dermatite seborréica canina por *Malassezia pachydermatis* (Quinn et al., 2005).

Apesar de ter observado resistência de *Malassezia pachydermatis* ao miconazol, como visto, variados autores atribuem ainda a este fármaco como uma possível escolha de antifúngico para o tratamento das malassezioses. Nesta pesquisa, sabendo que os animais não receberam medicação antifúngica por pelo menos um ano, fazem-se então necessários mais estudos para o esclarecimento de um possível início de resistência intrínseca desta levedura contra este agente antimicótico.

Leveduras do gênero *Candida* mostraram ser sensíveis ao miconazol, resultado semelhante ao obtido por Dalazen et al. (2011), na qual comparou o perfil de sensibilidade entre isolados clínicos de *Candida spp.* orais e vulvovaginais no Sul do Brasil, tendo como resultado o miconazol como o antifúngico que demonstrou melhor eficácia sobre as cepas testadas. Müller et al. (2013) também descrevem o miconazol como sendo um antifúngico eficaz contra várias espécies de *Candida*, se destacando, principalmente, pela via tópica, estudo realizado em humanos.

Em contrapartida, Ruiz et al. (2005), verificaram resistência de espécies de *Candida*, isoladas de casos de candidemia em hospital público, ao cetoconazol e ao miconazol, discordando totalmente dos achados da mucosa oral de cães.

A malassezioses é considerada uma infecção importante em cães e, devido ao seu tratamento prolongado e aos altos índices de recorrência, o sucesso terapêutico é preocupante. Os triazóis são antifúngicos com grande eficiência e baixa toxicidade, indicados para o tratamento de malassezioses em cães, entretanto, apesar de sua resistência não ser comum, pode ser observada em casos de uso prolongado. Desse modo, o diagnóstico associado a um teste de sensibilidade é ponto chave para o tratamento dessa enfermidade (Appelt; Cavalcante, 2008).

Dentre os triazóis utilizados neste estudo, apenas o voriconazol apresentou 100% de sensibilidade entre as amostras isoladas. O voriconazol é derivado do fluconazol, que apresenta um espectro de ação maior, com boa atividade "in vitro" sobre leveduras do gênero *Candida*, e custo mais elevado (Moreira, 2012).

Atualmente, o tratamento da fungemia por *Trichosporon spp.* é considerado difícil e de mortalidade alta. Ainda não há um tratamento de escolha e poucos dados estão disponíveis em relação à sensibilidade aos antifúngicos. Este fungo é conhecido por apresentar variável resistência à anfotericina B, relatada também tanto

sensibilidade como resistência à flucitocina. Segundo Fagundes Júnior et al. (2008), os triazólicos (miconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol) são considerados como os antifúngicos de maior atividade "in vitro", tornando-se fármacos de escolha, principalmente o voriconazol. Na literatura consultada, ainda não foram descritos estudos com voriconazol para cães no tratamento de leveduroses da cavidade oral.

Todos os isolados e cepas padrão de *C. albicans* de origem humana, isoladas por Araujo (2015), foram sensíveis ao voriconazol, demonstrando grande eficácia deste antifúngico também para o tratamento das candidíases em humanos.

Segundo Kauffman et al. (2015), a atividade de voriconazol contra espécies de *Candida* é superior à do fluconazol, no entanto, a resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol pode ser freqüentemente observada, principalmente por *C. glabrata*. Fato que pode ser confirmado no estudo de Moreira (2012), onde praticamente todos os isolados da mucosa vaginal de mulheres com candidíases na qual apresentaram resistência ao fluconazol foram resistentes ao voriconazol.

No estudo médico de Cuenca-Estrella et al. (2011), foi relatado que a resistência ao voriconazol não foi comum entre os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, entretanto, foram freqüentes entre isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*.

Apesar da literatura descrever resistência por *Candida spp* a derivados azóis, principalmente em pacientes humanos imunocomprometidos (Marr et al., 1999; Matsumoto et al., 2002), nos cães do nosso estudo, grande parte desta classe de antifúngicos revelou sensibilidade por esta levedura, com exceção do fluconazol.

Para o fluconazol, foram identificadas 24,5% (11) de amostras resistentes, 2,2% (1) sensível dose dependente e 73,3% (33) sensíveis. As amostras resistentes ao fluconazol foram identificadas como sendo as espécies *Candida krusei* (67%), *Candida zeylanoides* (100%), *Trichosporon spp* (40%) e uma amostra sugestiva do gênero *Trichosporon*.

Segundo Zonios e Bennett (2008), o tratamento das candidíases em humanos inclui três classes de terapia antifúngica: os azóis, os poliemos e as equinocandinas, sendo que dentro dos azóis, o fluconazol tem sido amplamente utilizado na terapêutica. Provavelmente, em consequência desse uso, resistência de *C. albicans* ao fluconazol foram relatados em vários centros médicos. Apesar desse fato, em cães foram identificadas como resistentes para o fluconazol apenas amostras não *C. albicans*.

No estudo de Ferreira (2011), na qual analisou o perfil de sensibilidade antifúngica entre amostras de *Candida spp* em casos de colonização de ambiente hospitalar e infecção hospitalar, foi verificado que 98,57% das amostras isoladas foram sensíveis para o fluconazol, diferente da porcentagem de 73,3% obtida por em nosso estudo.

Quando analisada apenas a espécie *C albicans*, Araujo (2015) obteve resultado que corrobora com o obtido neste estudo, na qual verificou 100% de sensibilidade desta espécie ao fluconazol.

As leveduras identificadas como *Candida zeylanoides* foram um total de seis, e 100% destas foram resistentes ao fluconazol. Este dado indica uma forte tendência de resistência por esta espécie a este antifúngico, resultado preocupante, visto que o seu uso é amplo para o tratamento das candidíases em cães. Perfil de resistência por esta espécie de *Candida*, a este antifúngico, também já foi verificada por Pereira et al. (2010) em um estudo retrospectivo observacional de dados clínicos de infecções fúngicas em um hospital de medicina humana.

Duas amostras, dentre as três de *Candida krusei* identificadas, foram resistentes ao fluconazol, ou seja, 67% dessa espécie foi resistente a este antifúngico. Corroborando com os achados de resistência por esta espécie de *Candida*, foi citado por Pfaller et al. (1998), Ferrazza et al. (2005), Navarini (2007), Pereira et al. (2010), e Purisco (2010), uma resistência natural da *C. krusei* ao fluconazol. Apesar desses estudos indicarem que a espécie *C. krusei* é resistente ao fluconazol, no estudo de Moreira (2012), todos os isolados identificados como sendo desta espécie foram sensíveis a este antifúngico.

Em 1990, já tinham sido encontradas, por Revankar et al. (1996), cepas de *Candida spp* resistentes ao fluconazol, o que demonstra não ser uma novidade a preocupação na utilização deste fármaco como tratamento de candidíases.

Ainda em humanos, Furletti (2006), pesquisou o perfil de sensibilidade de espécies de *Candida spp* isoladas da cavidade oral de pacientes com doença periodontal. Dentre as espécies identificadas como *C. albicans*, 88% apresentaram sensibilidade dose dependente e 3,6% resistência à pelo menos um antifúngico azólico, sendo que, neste estudo, não houve ocorrência de resistência para o fluconazol e apenas 3,6% de *C. albicans* e 40% de não *C. albicans* foram sensível dose dependente para este antifúngico (Furletti, 2006).

Silva (2002) ao avaliar a colonização por espécies de *Candida* em pacientes hematológicos, submetidos ou não a transplante de medula óssea, observou que 94% das cepas de *C. krusei* e 46,8% das de *C. glabrata* puderam ser consideradas resistentes ao fluconazol.

Dentre as espécies do gênero *Trichosporon* identificadas, apenas uma amostra de *Trichosporon mucoides* e uma de *Trichosporon spp.* foram sensíveis ao fluconazol, uma espécie foi sensível dose dependente, e o restante (40%) foram resistentes. Além dessas, uma amostra que foi tida como inconclusiva, mas sugestiva do gênero *Trichosporon*, também apresentou resistência a este antifúngico. Para este gênero, portanto, o fluconazol apresentou importante ineficácia de ação, demonstrando relativa resistência pelas nossas amostras isoladas.

A resistência por parte das leveduras a este fármaco pode estar relacionada, em humanos, com o seu uso prolongado em terapias profiláticas, como sugerem Shahid e Sobel (2009), entretanto, nos casos dos animais deste estudo, na qual eram cães errantes que, provavelmente, nunca receberam qualquer tratamento antifúngico, esta resistência poderia estar envolvida com transmissão epidemiológica, ou até mesmo, realmente, um início de resistência natural de certas espécies de leveduras.

Com relação ao itraconazol, 100% das leveduras do gênero *Trichosporon* e uma das amostras inconclusivas, porém sugestiva desse gênero, foram resistentes a este fármaco. Esse perfil de sensibilidade traçado por esta levedura indica uma provável resistência natural adquirida à este antifúngico, fato importante a ser considerado em um tratamento de trichosporonose canina.

Em humanos, Pereira et al. (2010), isolaram *Trichosporon spp.* e realizaram teste de sensibilidade frente ao itraconazol. O resultado obtido foi de sensibilidade de todas as amostras para este antifúngico, implicando uma divergência dos resultados em cães.

A grande maioria das amostras de *Candida albicans* (82,4%) foi sensível ao itraconazol, entretanto, 17,6% apresentaram resultado de sensibilidade dose dependente, fato que não deve ser ignorado, principalmente na escolha de tratamento de um paciente imunocomprometido, devido o fato dessas leveduras poderem adquirir rapidamente resistência. Além desta espécie, a única amostra de *C. tropicalis* isolada também foi sensível dose dependente ao itraconazol.

Nenhuma amostra de *Candida spp* foi resistente ao itraconazol, diferente das amostras isoladas da mucosa vaginal de mulheres, conduzido por Moreira (2012), na qual foi verificado 12,7% de amostras de *Candida spp.* resistentes a esse fármaco.

O itraconazol foi testado também "in vitro" e "in vivo", por Papich et al. (2003), contra uma variedade de fungos, sendo considerado eficaz contra todos os fungos clinicamente importantes, como: *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Malassezia*, *Microsporum*, *Pythium*, *Sporotrix* e *Trichophyton*.

Frente a este antifúngico, 72,3% das cepas de *C. glabrata* e 29,4% das de *C. krusei*, isoladas de humanos e identificadas por Silva (2002), foram consideradas resistentes, e 50% das cepas de *C. lusitaniae* e 47% de *C. krusei* foram sensíveis dose dependente.

Segundo Pfaller et al. (1998), 84% e 75% de espécies não *C. albicans*, isoladas de pacientes hospitalizados, foram sensíveis ao fluconazol e itraconazol, respectivamente.

No estudo de Alves (2004), foi pesquisado o perfil de sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas a partir de culturas de sangue, cateter e urina de pacientes humanos. Dentre as amostras analisadas, 32,6% foram resistentes para o itraconazol.

Maia (2011) avaliou a sensibilidade a antifúngicos de 126 amostras de *Candida spp*, isoladas de diferentes espécies de animais e de variados sítios anatômicos, obtendo o resultado de 33 (26,2%) foram resistentes aos azólicos, sendo 7 (5,6%) resistentes somente a fluconazol, 1 (0,8%) resistente somente ao itraconazol e 24 (19%) resistentes a ambas as drogas. Neste estudo, não foram incluídas amostras isoladas da mucosa oral dos animais.

Os achados de resistência e de sensibilidade dose dependentes pela levedura *Candida spp* ao itraconazol na medicina humana não mostraram, como visto, concordância entre os resultados encontrados nos cães do nosso estudo.

A caspofungina é um antifúngico de ação inibidora da parede celular do grupo das equinocandinas, importante na medicina humana como alternativa para tratamento de isolados resistentes ao fluconazol (Nagappan et al., 2010).

Em nosso trabalho, com relação ao perfil de sensibilidade das amostras isoladas, 100% das leveduras do gênero *Trichosporon* e do gênero *Malassezia* foram resistentes a caspofungina, assim como em 25% das cepas de *Candida parapsilosis*.

Apesar de *C. guilliermondii* isolada em nosso estudo ter apresentado sensibilidade para todos os antifúngicos testados, a revisão de literatura feita por Purisco (2010) mostra que esta espécie pode apresentar resistência para a caspofungina, fato ainda mais preocupante quando se leva em consideração uma possível resistência de *C. guilliermondii* ao grupo dos azóis.

No estudo de Moreira (2012), dentre as espécies de *Candida* isoladas da mucosa vaginal de humanos, apenas 8,2% não foram sensíveis a caspofungina.

Na pesquisa de De Pádua Oliveira et al. (2013), foi analisado o perfil de sensibilidade de 51 amostras clínicas de *Malassezia spp.* frente aos antifúngicos caspofungina, cetoconazol, Isoconazol, itraconazol, clotrimazol e ao miconazol. Entre estes antifúngicos, apenas a caspofungina e o isoconazol mostraram tendência de resistência natural do gênero *Malassezia*.

Contrariando o pressuposto por Moreira (2012), as leveduras do gênero *Candida* não foram prevalentes em questão de resistência antifúngica, pelo contrário, foi o gênero o qual apresentou menor resistência e maior sensibilidade aos antifúngicos testados na presente pesquisa.

Apesar do número de isolados terem sido inferior, *Malassezia spp.* e, principalmente, *Trichosporon spp.*, foram os que apresentaram os valores de resistência mais significantes e preocupantes.

Analisando o perfil de sensibilidade demonstrado pelas leveduras isoladas, os antifúngicos de melhor atividade foram o cetoconazol e o voriconazol. O cetoconazol ainda é muito utilizado na clínica veterinária, principalmente, pela via tópica, entretanto, devido a sua toxicidade, a tendência é o desuso. O voriconazol, como visto, seria a melhor alternativa para substituição do cetoconazol, entretanto o seu custo é elevado.

Os antifúngicos fluconazol, itraconazol e miconazol são também aplicados rotineiramente na clínica veterinária, utilizados indiscriminadamente no tratamento de micoses sugestivamente diagnosticadas. O perfil de resistência demonstrado pelas leveduras isoladas, em nosso estudo, foi significativo. Desse modo, o uso desses fármacos não deveria ser empregado antes de realizados testes prévios.

A caspofungina, apesar de ser um antifúngico mais recente e de custo elevado, não demonstrou ser uma escolha terapêutica interessante para os cães.

Ressaltando novamente que os cães participantes desse estudo eram errantes de origem, outra possível explicação das cepas resistentes encontradas é o contacto

desses animais com o solo e com o meio ambiente. Sabemos que os micoherbicidas colocados em plantações, hortas, e no próprio solo, apresentam constituição química similar aos antifúngicos de uso humano (Boyetchko; Peng, 2004). Desta forma, os animais poderiam ter entrado em contacto com este tipo de antifúngico selecionando, assim, cepas resistentes. Esta hipótese já foi assinalada anteriormente por Takahashi (2016), que caracterizou o perfil de sensibilidade de *Cryptococcus spp.* e outras leveduras de ambiente contaminado com fungicidas azólicos.

Com base nestes dados, a escolha terapêutica ideal, assim como é para os humanos, deve ser baseada a partir da identificação prévia do agente e, se possível, da utilização de técnicas para a determinação do perfil de sensibilidade do agente etiológico.

Segundo Colombo e Guimarães (2003), o agente etiológico de uma patologia invasiva em imunocomprometidos é, geralmente, o mesmo que coloniza o corpo do paciente.

Desse modo, partindo da premissa que uma levedurose pode ocorrer pelo mesmo agente que coloniza o hospedeiro, o pré-conhecimento das leveduras existentes na cavidade oral dos cães, juntamente com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos, mostra ser de vital importância para o tratamento dessa enfermidade, principalmente, em animais imunossuprimidos.

Destaca-se ainda, na presente pesquisa, a determinação do perfil de resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas da cavidade oral de cães, fato inédito na literatura, podendo ainda ser proposto um protocolo de comunicação e terapêutica adequada para o tratamento desses animais.

7 CONCLUSÕES

❖ A espécie canina alberga na mucosa oral leveduras que tem potencial patogênico, principalmente, cães com idade mais avançada portadores de doenças periodontais, como gengivites, placas nos dentes e/ou sangramento gengival;

❖ Dos 50 cães sem raça definida, pertencentes a cidade de Campinas, São Paulo, foram isoladas 45 cepas de leveduras, 43 (95,5%) identificadas pelo sistema API 20C AUX como sendo 39,5% *Candida albicans*, 4,7% *C. tropicalis*, 18,6% *C. parapsilosis*, 7% *C. krusei*, 2,3% *C. guilliermondii*, 13,9% *C. zeylanoides*, 4,7% *Trichosporon spp*, 4,7% *T. asahii*, 2,3% *T. mucoides* e 2,3% *Malassezia pachydermatis*;

❖ O gênero *Candida* foi o mais freqüente entre os isolados. A identificação deste gênero em 97,8% dos animais participantes foi um parâmetro importante para a conclusão de que este gênero pertence a microbiota oral dos cães;

❖ Quando se trata de *Candida albicans*, a pesquisa de tubo germinativo mostrou de fato grande confiabilidade, ao contrário da produção de clamidoconídio;

❖ A identificação presuntiva do gênero *Candida* pelo meio CHROMAGAR *Candida*® foi satisfatória para as espécies *Candida albicans* e *C. krusei*;

❖ O sistema comercial bioquímico API 20C AUX mostrou capacidade de 95,5% de identificação dos gêneros e espécies de leveduras;

❖ A concordância entre o meio presuntivo de identificação CHROMAGAR *Candida*® e o sistema comercial API 20C AUX não foi estatisticamente significativa, e para a identificação de gênero e espécie, o sistema API 20C AUX demonstrou ser superior;

❖ Os resultados obtidos no teste de sensibilidade aos antifúngicos pelo método "Etest" chamaram a atenção devido a alta freqüência de cepas resistentes;

❖ Dentre os antifúngicos avaliados, o cetoconazol e o voriconazol foram os que demonstraram efetividade para 100% das amostras isoladas;

- ❖ Para os antifúngicos Miconazol e a Caspofungina, foi verificada uma resistência de 100% das amostras de *Trichosporon spp* e de *Malassezia pachydermatis*;
- ❖ Para o itraconazol, *Trichosporon spp* também demonstrou resistência a este antifúngico. Além disso, cepas de *C. albicans* e *C.tropicalis* demonstraram sensibilidade dose dependente, revelando certa preocupação no uso desses fármacos para o tratamento das candidíases e triconosporoses em cães;
- ❖ *C.zeylanoides*, uma espécie rara de *Candida* que, até então, não tinha sido isolada na mucosa oral de cães, foi 100% resistente para o fluconazol;
- ❖ Os gêneros que demonstraram maior frequência de resistência foram *Trichosporon spp* e *Malassezia pachydermatis*;
- ❖ Devido ao crescente apego e, conseqüentemente, contato dos cães com os humanos, estudos que visam ampliar o conhecimento sobre a microbiota oral desses animais deveriam ter maior destaque, porém, ao contrário disso, são escassos;
- ❖ Além das leveduras isoladas serem de interesse clínico médico veterinário, elas ainda apresentam um risco potencial para o homem. Desse modo, estudos desse caráter devem prosseguir, podendo ser acrescidos de informações como análise molecular e epidemiológica.

REFERÊNCIAS¹

Acikgoz ZC, Sancak B, Gamberzade S, Misirlioglu M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses* [Internet]. 2004 [citado 07 fev 2016];47(9-10). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504122>.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgradu Med J*. [Internet]. 2002 [citado 10 jan 2016];78. Disponível em: <http://pmj.bmj.com/content/78/922/455.long>.

Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone MC, Guelfand L, Bianchi M. Identificación presuntiva de *Candida spp.* y de otras levaduras de importância clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2010 [citado 07 fev 2016];27. Disponível em: <http://www.reviberoammicol.com/2010-27/090093.pdf>.

Alves PC. Avaliação comparativa de testes de suscetibilidade a antifúngicos pelos métodos NCCLS e EUCAST de leveduras do gênero *Candida* [dissertação] [Internet]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Biomédicas; 2004 [citado 10 jan 2016]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000350211>.

Appelt CE, Cavalcante LFH. *Malassezia pachydermatis* em cães e sua suscetibilidade aos antifúngicos azóis: revisão de literatura. *Vet Foco* [Internet]. 2008 [citado 07 de jan 2016];6(1). Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/vetfoco/article/viewFile/27958/29347>.

Araújo AL. Avaliação "in vitro" da atividade de óleos essenciais sobre *Candida albicans* e seus fatores de virulência [dissertação] [Internet]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2015 [citado 07 jan 2016]. Disponível em: <https://www.pesquisa.bvsalud.org/ses/resource/pt/ses-32328>.

Araujo CR, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Lemos JA, Khrais CHA, Costa CRC, Silva MRR, Fernandes OFL. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMAGAR *Candida*. *Rev de Patolo Trop* [Internet]. 2005 [citado 10 nov 2015];34(1). Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/157/1/IDENTIFICACAO%20DAS%20LEVEDURAS%20DO%20GENERO.pdf>.

1 De acordo com estilo Vancouver

Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Moller N. Comparison of "Etest" and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2001 [citado 27 jul 2015];47(5). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328761>.

Arhant C, Bubna-Littitz H, Bartels A, Futschik A, Troxler J. Behaviour of smaller and larger dogs: Effects of training methods, inconsistency of owner behaviour and level of engagement in activities with the dog. *Appli Anim Behaviour Sci* [Internet]. 2010 [citado 10 dez 2015];123(3-4). Disponível em: [http://www.appliedanimalbehaviour.com/article/S0168-1591\(10\)00026-2/abstract](http://www.appliedanimalbehaviour.com/article/S0168-1591(10)00026-2/abstract).

Arraes ACP. Detecção da diversidade molecular de *Candida spp.* Isoladas de UTI neonatal [dissertação] [Internet]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde; 2012 [citado 21 jun 2015]. Disponível em: http://www.repositorio.ufba.br:8080/ri/bitstream/ri/11817/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_ICS_%20Ana%20Carolina%20Arraes.pdf.

Atique TSC. Pesquisa das espécies e sensibilidade antifúngica de *Candida spp.* em indivíduos soropositivos para o HIV [dissertação] [Internet]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2006 [citado 10 set 2015]. Disponível em: http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/Biologia/Dissertacao/candida.pdf.

Bentubo HDL, Gambale W, Fischman O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. *Rev Bras Pesq Saúde* [Internet]. 2013 [citado 21 set 2015];5(1). Disponível em: <http://periodicos.ufes.br/RBPS/article/view/5581>.

Bentubo HDL, Gambale W, Fischman O. Leveduras isoladas do pelame de cães saudáveis que vivem em regime domiciliar. *Arq Bras Med Vet Zootec* [Internet], 2010 [citado 10 jan 2015];62(4). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v62n4/39.pdf>.

Bentubo HDL. Leveduras do gênero *Trichosporon*: Aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados a virulência e suscetibilidade a antifúngicos [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008 [citado 10 dez 2015]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-24112008-132327/pt-br.php>.

Bergold AM, Georgiadis S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. Visão Acad [Internet]. 2004 [citado 10 jan 2016];5(2). Disponível em: [http://www.unifal-mg.edu.br/fcf/files/Agentes%20antif%C3%BAngico s.pdf](http://www.unifal-mg.edu.br/fcf/files/Agentes%20antif%C3%BAngico%20s.pdf).

Bond R, Lamport AI, Lloyd DH. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and the follicle of healthy beagle dogs. Res Vet Sci [Internet]. 2000 [citado 21 dez 2015];68. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528800903771>.

Bonifácio e Sousa EM, Paula CR, Purchio A, Gambale W, Correa B, Cury AE. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. Rev Microbiol. 1990; (3):247-53.

Boyetchko SM, Peng G. Challenges and strategies for development of mycoherbicidas. In: Arora DK. Fungal Biotechnology in agricultural, food, and environmental applications. New York. Editora Marcel Dekker, INC; 2004. Vol. 21; 111-21

Braga CAB, Resende CMF, Pestana ACNR, Carmo LS, Costa JE, Silva LAF, Assis LN, Lima LA, Farias LM, Carvalho MAR. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. Ciênc Rural [Internet]. 2005 [citado 21 dez 2015];35(2). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n2/a22v35n2.pdf>.

Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. Vet J [Internet]. 2008 [citado 10 jul 2015];182(2). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109040>.

Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Rocha MFG. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. Ciênc Rural [Internet]. 2009 [citado 21 dez 2015];39(9). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000900046.

Campos DF, Dabus DMM, Lima GS, Trentin TC, Léo VF. Hepatotxicidade dos antifúngicos. Rev Cient Eletr Med Vet [Internet]. 2009 [citado 10 mai 2015];7(12). Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5nUKnRTwcBpM7fi_2013-6-21-11-25-19.pdf.

Canizzo FT, Eraso E, Ezkurra PA, Villar-Vidal M, Bollo E, Castellá G, Cabañes FJ, Vidotto V, Quindós G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia*

pachydermatis. Med Mycol [Internet]. 2007 [citado 02 jun 2015];45:357-61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510859>.

Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. Rev Esp Quimioter [Internet]. 2006 [citado 10 jan 2016];19(2). Disponível em: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/19/2/130.pdf>.

Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, Ruiz LS, Franco MC. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop [Internet]. 2006 [citado 10 jun 2015];48(1). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0036-46652006000100005&lng=pt&nrm=iso&tlng=en.

Cleff MB, Silva GM, Meinerzl ARM, Madrid IM, Martins AA, Fonseca AO, Nascentel PS, Meireles MCA, Mello JRB. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. Vet Zootec [Internet]. 2007 [citado 21 mar 2015];14(2). Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rvz/article/viewFile/23085/23937>.

Cleff MB, Soares MP, Madrid IM, Meinerzl ARM, Xavier MO, Albano APNH, Fonseca AO, Silveira E, Meireles MCA. Candidíase cutânea em *cebus apella* (macaco-prego). Ciênc Anim Bras [Internet]. 2008 [citado 10 nov 2015];9(3). Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/3139>.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2 [Internet]. Wayne, PA: CLSI; 2002 [citado 10 nov 2015]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=55b324fe5e9d97d2638b45b8&assetKey=AS%3A273819233652736%401442295000257>.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3 [Internet]. Wayne, PA: CLSI; 2008 [citado 21 dez 2015]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=54fea425d767a667118b45fc&assetKey=AS%3A273561749524486%401442233611239>.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2003 [citado 10 fev 2016];36(5). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000500010.

Corrêa HL, Venturini M, Gioso MA. Registro do exame clínico odontológico – odontograma. Clín Vet [Internet]. 1998 [citado 21 jan 2015];1(13). Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000169&pid=S0100-736X200900080001100003&lng=pt.

Coutinho SD, Paula CR. Biochemical characterization of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine skin and otic secretion. Rev Bras de Med Vet [Internet]. 2000 [citado 10 dez 2015];22(5). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013000320>.

Coutinho SD, Paula CR. Suscetibility to antifungal agents of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. Polish J Vet Sei. 2001;4(3):77-81.

Coutinho SD, Souza T, Paula CR. Protein profiles of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs. Mycopathologia [Internet]. 1997 [citado 21 nov 2015];139. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608717>.

Crivellenti LZ, Crivellenti SB. Bulário médico-veterinário cães e gatos. São Paulo: Editora Medvet; 2013.

Cubas ZS, Godoy SN. Algumas doenças de aves ornamentais. Foz do Iguaçu: Departamento de Meio Ambiente. Published online [Internet]. 2010 [citado 27 abr 2015]. Disponível em: <http://wonderfullglosters.110mb.com/PDF/Dossierdedoenças.pdf>.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Cuesta I, Zaragoza O, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Frequency of voriconazole resistance "in vitro" among Spanish clinical isolates of *Candida spp.* according to breakpoints established by the antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antimicrob. Agents Chemother [Internet]. 2011 [citado 10 fev 2016];55(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282420>.

Cury AE. Resistência a antifúngicos utilizados em micologia médica. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AA, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de micologia médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 392-405

Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, Silva NL, Fuentefria AM. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida spp.* orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. J Bras Patol Med Lab [Internet]. 2011 [citado 27 jan 2016];47(1). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v47n1/04.pdf>.

De Pádua Oliveira DC, Cruz RC, Cisalpina PS. Determinação da concentração inibitória mínima de antifúngicos em isolados clínicos de *Malassezia spp.* [Internet] XXVII Congresso Brasileiro Microbiologia CBM 201327; 2013; Natal [citado 10 jan

2016]. Disponível em: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/cd27cbm/resumos/R2179-2.html>.

Deem SL. Fungal diseases of birds of prey. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* [Internet]. 2003 [citado 27 dez 2015];6(2). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827728>.

Duboc MV. Percepção de proprietários de cães e gatos sobre a higiene oral de seu animal [dissertação] [Internet]. Rio de Janeiro: Seropédica, Ciências Clínicas; 2009 [citado 21 de abr 2015]. Disponível em: <http://www.ufrj.br/posgrad/cpmv/teses/marcela.pdf>.

Espinel-Ingroff A, Jr. Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1992 [citado 27 jan 2016];30(12). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270602/>.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility. Definitive Document E Def 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2008 [citado 10 jul 2015];14(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18190574>.

Fagundes Júnior AAPF, Carvalho RT, Focaccia R, Fernandez JG, Araújo HBN, Strabelli TMV, Kopel L, Lage SG. Emergência de infecção por *Trichosporon asahii* em pacientes portadores de insuficiência cardíaca em unidade de terapia intensiva cardiológica. Relato de caso e revisão da literatura. *Rev Bras Terap Intens* [Internet]. 2008 [citado 27 dez 2015];20(1). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbti/v20n1/a18v20n1.pdf>.

Farias MR, Giuffrida R. Antifúngicos. In: Andrade SF. Manual de terapêutica veterinária. São Paulo: Rocca; 2002. Capítulo 4. 59-72 p.

Ferrazza MSHS, Malufi MLF, Consolaro MEL, Shinobu CS, Svidzinsk TIE, Batista MR. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* [Internet]. 2005 [citado 10 jan 2016];27(2). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032005000200003.

Ferreira AV. Comparação do perfil associado à virulência e da sensibilidade antifúngica entre amostras de *Candida spp.* em casos de colonização de ambiente hospitalar e infecção hospitalar [dissertação] [Internet]. Alfenas: Universidade

Federal de Alfenas; 2011 [citado 27 dez 2015]. Disponível em: https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/bitstream/tede/265/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Alessandro_V_Ferreira.pdf.

Ferreiro L, Moreira Jr. JPR, Appelt CE, Berg V, Oliveira IA, Muschner AC, 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 Scie Vet [Internet]. 2002 [citado 27 abr 2015];30(3). Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/19757>.

Fisher F, Cook NB. Micologia - fundamentos e diagnóstico. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.

Framil VMS. Micoses causadas por leveduras do gênero *Trichosporon*. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AA, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de micologia médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 259-70.

Fraser G. A etiology of otitis externa in the dog. J Small Anim Pract [Internet]. 1965 [citado 21 mar 2015];6. Disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1965.tb04362.x/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=www.google.com.br&purchase_site_license=LICENSE_DENIED.

Furletti VF. Suscetibilidade de isolados orais de *Candida spp* provenientes de pacientes com doença periodontal aos antifungicos azolicos e a Anfotericina B [dissertação] [Internet]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2006 [citado 10 jan 2016]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000381047>.

Gambale W, Correa B, Paula CR, Purchio A, Larsson CE. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. Rev Fac Med Vet Zootec [Internet]. 1987 [citado 21 jan 2015];24(2). Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rfmvzusp/article/view/61572>.

Gandra RF, Simão RCG, Matsumoto FE, Silva BCM, Ruiz LS, Silva EG, Gambale W, Paula CR. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. Mycopathologia [Internet]. 2006 [citado 21 abr 2015];162. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17039273>.

Gandra RF, Gambale W, Simão RCG, Ruiz LS, Durigon EL, Camargo LMA, Giudice MC, Sanfilippo LF, Araújo J, Paula CR. *Malassezia spp.* in Acoustic Meatus of Bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. *Mycopathologia* [Internet]. 2008 [citado 27 abr 2015];165. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046623>.

Garcia CZ, Júnior JMF, Almeida MF, Simas RC, Gimenez TF, Bermejo VJ, Dias LGGG. Doença periodontal em cães. *Rev Cient Eletr Med Vet* [Internet]. 2008 [citado 10 mar 2015];6(11). Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/TMeJRktdtZbzHC_2013-6-14-10-11-31.pdf.

Garcia ME, Lanzarot P, Rodas VL, Costas E, Blanco JL. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. *Original Paper Vet Med* [Internet]. 2007 [citado 10 mar 2015];52(10). Disponível em: <http://vri.cz/docs/vetmed/52-10-464.pdf>.

Gasparetto A, Negri MFN, Paula CR, Svidzinski TIE. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. *Acta Sci Health Sci* [Internet]. 2005 [citado 27 abr 2015];27(1). Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/1437>.

Gioso MA, Carvalho VGG. Métodos preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. *Clín Vet* [Internet]. 2004 [citado 10 jan 2015];1(52). Disponível em: http://www.smile4pets.com.br/arquivos/artigos/smile_artigos_12.pdf.

Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Corrêa B, Rivera ING. Características gerais das micoses. In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4. ed., São Paulo: Atheneu; 2008a. Capítulo 66. p. 493-504.

Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Corrêa B. Micose oportunistas e outras micose. In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4. ed., São Paulo: Atheneu; 2008b. Capítulo 70. p. 525-30.

Gouveia AIEA. Doença periodontal no cão [dissertação] [Internet]. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa; 2009 [citado 27 nov 2015]. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1677/1/Doen%C3%A7a%20periodontal%20no%20c%C3%A3o.pdf>.

Greene CE. Gastrointestinal and Intraabdominal Infection. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dogs and cats*. 3.ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2006. Capítulo 89. p. 883-912.

Guethi GGM. Caracterização de leveduras do gênero *Trichosporon* isoladas de três regiões costeiras do Estado de São Paulo [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009 [citado 21 nov 2015].

Disponível em:

https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi007OO8cHOAhUGWpAKHeFQAFgQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.teses.usp.br%2Fteses%2Fdisponiveis%2F42%2F42132%2Fde-19052010-160451%2Fpublico%2FGislaineGomesMartins_Doutorado.pdf&usg=AFQjCNGFgKzb39c_o5agz6ej562GNxndhA.

Jadhav VJ, Pal M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2006 [citado 21 mar 2015];23(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388648>.

Jin Y, Lin D. Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study. Journal of the American Animal Hospital Association [Internet]. 2005 [citado 10 jan 2015];41(6). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267061>.

Kauffman CA, Mar KA, Thoner AR. Treatment of candidemia and invasive candidiasis in adults. Updated [Internet]. 2015 [citado 10 fev 2016]. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults>.

Kyllar M, Witter K. Prevalence of dental disorders in pet dogs. Vet Med Czech [Internet]. 2005 [citado 10 abr 2015];50(11). Disponível em: <http://vri.cz/docs/vetmed/50-11-496.pdf>.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica; 2001.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts - a taxonomic study. 5th ed. : Elsevier Science B. V.; 2011. Vol. 2.

Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts - a taxonomic study. 4th ed. : Elsevier Science B. V.; 1998.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Philadelphia: Lea and Febiger; 1992 [E-book] [citado 27 jun 2015]. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036->

46651992000600018&script=sci_arttext&tlng=en%C3%83%C6%92%C3%82%C2%AF%C3%83%E2%80%9A%C3%82%C2%BF%C3%83%E2%80%9A%C3%82%C2%BD%C3%83%C6%92%C3%86%E2%80%99%C3%83%E2%80%A6%C3%A2%E2%82%AC%C5%93.

La Candidiasis [internet]. Disponível em:
<https://sites.google.com/site/candidiasisivanrod/proyecto/plan-general-del-software>.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Mello NT. Tratado de micologia médica Lacaz. São Paulo: Savier; 2002.

Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP. *Candida* Berkhout. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts - a taxonomic study. 4th ed. : Elsevier Science B. V; 2011. Vol 2. p. 987-1278.

Linares MJ, Charriel G, Solis F, Casal M. Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida spp.* to voriconazole. J Clin Microbiol [Internet]. 2004 [citado 10 nov 2015];42(2). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766884>.

Lins FV. Perfil de resistência de espécies de *Candida* frente aos principais antifúngicos [Trabalho de Conclusão de Curso] [Internet]. Brasília: Universidade Católica de Brasília; 2013 [citado 10 set 2015]. Disponível em
<http://repositorio.ucb.br/jspui/bitstream/10869/2752/1/Fernanda%20Vitelli%20Lins>.

Machado MLS, Appelt CE, Ferreiro L. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. Acta Scientiae Veterinariae [Internet]. 2004 [citado 27 fev 2015];32(3). Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/19939>.

Maia DCBSC. Resistência a azólicos em *Candida spp.* de origem veterinária: um fenômeno mediado por bombas de efluxo [tese] [Internet]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina; 2011 [citado 10 abr 2015]. Disponível em:
<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/5124>.

Mangueira DF, Mangueira LFB, Diniz MFFM. Candidose oral. Rev Bras Ciênc Saúde [Internet]. 2010 [citado 10 mar 2015];14(2). Disponível em:
<http://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/rbcs/article/view/9044/5312>.

Marinho M, Meireles MV, Souza AVG. Determinação da microflora do trato gastrointestinal de avestruzes (*Struthio Camelus*) criados na Região Noroeste do Estado de São Paulo, submetidas à necrópsia. Arq Inst Biol [Internet]. 2004 [citado

21 nov 2015];71(3). Disponível em:
http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V71_3/marinho.PDF.

Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1999 [citado 10 mar 2016];43(6). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89283/>.

Matsumoto FE, Dias ALT, Melhem MSC, Szeszs MW, Auler ME, Ruiz LS, Da Silva EG, Gandra RF, Paula CR. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the "Etest®" and the AFST–EUCAST microdilution method. *Can J Microbiol* [Internet]. 2007 [citado 10 mai 2015];53(12). Disponível em:
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/W07-095?journalCode=cjm#.V6Jw6fkrLIU>.

Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, Auler ME, Marques SA, Pires MF, Gambale W, Paula CR. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 2002;154(2):63-9.

Mattei AS. Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar [dissertação] [Internet]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2010 [citado 27 jun 2015]. Disponível em: <http://repositorio.ufpel.edu.br/handle/123456789/2555>.

Mchugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med* [Internet]. 2012 [citado 27 mar 2016];22(3). Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092060>.

Melhem MSC, Giannini MJSM, Almeida AMF. Aplicações de métodos de biologia molecular em micologia médica. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AA, Ruiz LRB, Framil VMS. *Compêndio de micologia médica*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 50-74.

Melhem MSC. Resistência de *Candida* e outras leveduras a anfotericina B e fluconazol. In: Levy CE. *Manual de controle das infecções hospitalares*, coordenador. São Paulo: APECIH; 2004. p. 97-129.

Melhem MSC, Szeszs MW. Testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AA, Ruiz LRB, Framil VMS. *Compêndio de micologia médica*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 406-422.

Mellado E, Cuenca-Estrella M, Tudela LR. Importância clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enf Infect Microbiol Clin* [Internet]. 2002 [citado 21 out 2015];20(10). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X02728565>.

Melo NR. Caracterização de *Candida spp.* e susceptibilidade a agentes antifúngicos em isolados orais de pacientes HIV+ [tese] [Internet]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2002 [citado 10 ago 2015]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000250720>.

Menezes EA, Cunha MCSO, Cunha FA. Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *Candida spp.* em meio cromógeno: resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no ceará. *Rev Patol Trop* [Internet]. 2011 [citado 10 set 2015];40(4). Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/viewFile/16761/10207>.

Menezes EA, Cunha MCSO, Ferreira EB, Capelo LG, Braz BHL, Cunha FA. Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. *Rev Patol Trop* [Internet]. 2013 [citado 27 set 2015];42(1). Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/23598>.

Meyer SA, Altern DG, Yanow D. Genus 4 - *Candida Berkhout*. In: Kreger-Van Rij NJW. *The yeast a taxonomic study*. 3th ed. New York: Elsevier Science B. V; 1984. p. 585-843.

Miyasaka NRS, Unterkircher CS, Shimizu MT. Catalase activity of different *Candida* species after exposition to specific antiserum. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2008 [citado 21 out 2015];39. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000100009.

Morais MCB, Paula VV, Alves Junior RB. Avaliação das associações anestésicas: atropina/cetamina/xilazina e acepromazina/cetamina/midazolam em felinos domésticos (*Felis domestica*). *Braz J Vet Res Anim Sci* [Internet]. 2005 [citado 10 out 2015];42(2). Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26439>.

Moreira D. Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012 [citado 10 jan 2016]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-19092012-083308/pt-br.php>.

Moretti A, Fukushima K, Takizawa K, Suzuki M, Vidotto V, Cannizzo FT, Boncio L, Bollo E. First report of oral colonization by *Debaryomyces nepalensis* in a dog. *Mycopathologia* [Internet]. 2007 [citado 27 mar 2015];164. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687632>.

Moretti A, Posteraro B, Boncio L, Mechelli L, De Gasperis E, Agnetti F, Raspa M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2004 [citado 10 out 2015];21. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709788>.

Müller GG, Kara-José N, Castro RS. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. *Rev Bras Oftalmol* [Internet]. 2013 [citado 10 dez 2015];72(2). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72802013000200014.

Murray PR, Drew MDWL, Kobayashi GS, Thompson Jr JH. *Microbiologia médica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.

Nagappan V, Boikov D, Vazquez JA. Assessment of the "in vitro" kinetic activity of caspofungin against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 [citado 27 jan 2016];54 (1). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841143>.

Nakano Y, Wada M, Tani H, Sasai K, Baba E. Effects of beta-thujaplicin on anti-*Malassezia pachydermatis* remedy for canine otitis externa. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2005 [citado 27 nov 2015];67(12). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397383>.

Nascente PS, Cleff MB, Meinerz ARM, Xavier MO, Schuch LFD, Meireles MCA, Mello JRB. Comparison of the broth microdilution technique and "Etest" to ketoconazole front *Malassezia pachydermatis*. *Braz J Vet Res Anim Sci* [Internet]. 2009 [citado 21 mar 2016];46(3). Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26770>.

Nascimento DC. Ocorrência de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* em cloaca e ingluvío de papagaios do gênero *Amazona aestiva* [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013 [citado 10 mar 2015]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-07102013-103027/pt-br.php>.

Nardoni S, Dini M, Taccini F, Mancianti F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet Microbiol* [Internet]. 2007 [citado 10 abr 2015];122. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257784>.

Navarini A. Avaliação de testes de identificação e sensibilidade que podem ser utilizados em laboratórios clínicos em cepas de *Candida spp* [dissertação] [Internet]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2007 [citado 21 out 2015]. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp099929.pdf>.

Neufeld PM. Caracterização taxonômica e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de infecção hospitalar [tese] [Internet] Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2009 [citado 27 mar 2015]. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/8249>.

Nobre MO, Nascente PS, Meireles MC, Ferreiro L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciênc Rural* [Internet]. 2002 [citado 27 set 2015];32(1). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000100029.

Nonaka CFW, Nascimento GJF, Goulart Filho JAV, Lima KC, Milan EP. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. *Rev Odontol UNESP* [Internet]. 2008 [citado 10 ago 2015];37(2). Disponível em: <http://www.revodontolunesp.com.br/files/v37n2/v37n2a05.pdf>.

Nunes EB, Monteiro JCMS, Nunes NB, Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [Internet]. 2011 [citado 10 dez 2015];2(4). Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000400004.

Papich MG, Heit MC, Riviere JE. Fármacos Antifúngicos e Antivirais. In: Adams HR. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. Capítulo 46. p. 767-90.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE. A prospective observational study of candidemia: epidemiology therapy, and influences on mortality in hospitalized adults and pediatric patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2003 [citado 18 set 2015];37(5). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12942393>.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr. DK, Calandra TF, Edwards Jr JE, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis [Internet]. 2009 [citado 18 set 2015];48(5). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191635>.

Paula CR, Hahn RC, Orsi RB, Felipe PAN, Rivera ING, Campos JFF, Navarro BS, Cardoso PHM, Soares MCP, Nascimento DC. Study about the incidence of yeasts of the genus *Cryptococcus* isolated from the cloacae of parrots of the genus *Amazona aestiva*. Mycoses. 2013 out;56(1):86.

Paula CR, Nascimento DC, Orsi RB, Navarro BS, Aguiar BV, Cardoso PHM, Stevanato W, Silva EG. Study of *Cryptococcus neoformans* in the cloaca and crop of parrots on the genus *Amazona aestiva* in a private bird breeding. Mycoses. 2011 out;54(1):110-111.

Paula CR, Ruiz LS. Técnicas para diagnóstico precoce das infecções por leveduras do gênero *Candida*. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AA, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de micologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 16–24.

Pelletier R, Loranger L, Marcotte H, De Carolis E. Voriconazole and fluconazole susceptibility of *Candida* isolates. J Med Microbiol [Internet]. 2002 [citado 27 ago 2015];51(6). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12018654>.

Perea S, Patterson T. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect [Internet]. 2002 [citado 21 dez 2015];35 (9). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384841>.

Pereira GH, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. Med Mycol [Internet]. 2010 [citado 21 set 2015];48(6). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163281>.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM. Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8,5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species90 and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol [Internet]. 2007 [citado 18 dez 2015];45(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849609/>.

Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 1998 [citado 18 fev 2016]; 30(2). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554180>.

Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Barry AL, Rex JH. Strain variation and antifungal susceptibility among bloodstream isolates of *Candida* species from 21 different medical. Clin Infect Dis [Internet]. 1995 [citado 21 out 2015];21(6). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8749647>.

Pires MFC, Birman EG, Costa CR, Gambale W, Paula CR. *Candida albicans* biotipos isolated from the oral cavity of HIV-positive patients. Rev Microbiol [Internet]. 1996 [citado 18 ago 2015];27(1). Disponível em: <http://pesquisa.bvs.br/brasil/resource/es/lil-180013>.

Prina RM, Frias DFR, Kozusny-Andreani DI. Identificação da microbiota gengival de cães aparentemente hígidos. II Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva (II SIMPREV - 2015), [Internet]; 2015; Jaboticabal [citado 27 out 2015]. Disponível em: <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/958/984>.

Purisco SU. Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* pouco freqüentes como agentes de candidemia [dissertação] [Internet] São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2010 [citado 13 out 2015]. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjcs-fvwabOAhWMgpAKHct6AvkQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fses.sp.bvs.br%2Fiiadb%2Fdocsonline%2Fget.php%3Fid%3D1881&usq=AFQjCNHBQx7ZZT16B2Oy-sttPrE5EJ3vIw>.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. São Paulo: Artmed; 2005.

Raposo JB, Nobre MO, Fernandes CG, Porto M. Cutaneous candidiasis in a dog. Rev FZVA [Internet]. 1996 [citado 27 abr 2015];2/3(1). Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/1946>.

Reich WJ, Nechtow MJ. Canine genital moniliasis as a source of reinfection in the human female. J Am Vet Med Assoc [Internet]. 1949 [citado 13 mai 2015];141(14). Disponível em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=286452>.

Reis ECC, Borges APB, Del Carlo RJ. Regeneração periodontal em cães. Ciênc Rural [Internet]. 2011 [citado 13 out 2015];41(12). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011001200015.

Revankar SG, Kirkpatrick WR, Mcatee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. J Infect Dis [Internet]. 1996 [citado 27 fev 2016];174(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843222>.

Ribeiro PM, Koga Ito CY, Junqueira JC, Jorge AOC. Isolamento de *Candida spp.* com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMAGAR *Candida*. Braz Dent Sci [Internet]. 2009 [citado 13 fev 2016];12(4). Disponível em: <https://www.google.com.br/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=eficiencia+candida+chromagar>.

Rocha KCP, Baptista CCHM, Luz LNM, Silva ACA, Khouri S, Canettieri ACV. Análise microbiológica em estomatites por prótese. XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação [Internet]; 2011 [citado 13 mar 2015]. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2010/anais/arquivos/RE_032_5_0516_01.pdf.

Rodrigues TJS. Cepas do complexo *Candida parapsilosis* de origem animal: Classificação taxonômica, sensibilidade antifúngica e atributos de virulência "in vitro" [dissertação] [Internet] Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2013 [citado 27 set 2015]. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/7574>.

Roza MR. Introdução. In: Roza, M. R. Odontologia em pequenos animais. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária; 2004.

Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Da Silva BCM, Silva EH, Gandra RF, Gonçalves Da Silva E, Auler ME, Paula CR. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. J Med Mycol [Internet]. 2005 [citado 21 dez 2015];15(1). Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S115652330500003X?via=sd>.

Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. Enferm Infec Microbiol Clín [Internet]. 2002 [citado 13 ago 2015];20(9). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425880>.

Santin R. Isolamento, identificação e suscetibilidade "in vitro" de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas [dissertação] [Internet]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2009 [citado 13 nov 2015]. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/123456789/2532>.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Doenças do ouvido externo. Muller & Kirk Dermatologia de pequenos animais. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996.

Serracarbassa PD, Dotto P. *Candida albicans* endophthalmitis. Arq Bras Oftalmol [Internet]. 2003 [citado 21 nov 2015];66(5). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492003000500027.

Shahid Z, Sobel JD. Reduced fluconazol susceptibility of *Candida albicans* isolates in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: effects of long-term fluconazole therapy. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2009 [citado 27 jan 2016];64(3). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501794>.

Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004.

Silva JO, Candido RC. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2005 [citado 13 dez 2015];38 (3). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822005000300012.

Silva HM. Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea [dissertação] [Internet]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina Tropical e Saúde Pública; 2011 [citado 27 out 2015]. Disponível em: <https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/HildeneMeneses2011.pdf?1338299330>.

Silva M. Estudo de prevalência e avaliação da suscetibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* isoladas a partir de espécimes clínicos de pacientes portadores de malignidades hematológicas [dissertação] [Internet]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2002 [citado 21 jan 2016]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000243557>.

Silva MRR, Costa MR, Miranda ATB, Fernandes OFL, Costa CR, Paula CR. Evaluation of "Etest" and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida sp* strains isolated from oral cavities of AIDS patients. Rev Inst Med Trop [Internet]. 2002 [citado 21 mar 2015];44(3). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163903>.

Soubhia CB, Saito AS, Nakasato FH, Garcia MM, Pereira REP. Candidíase: revisão de literatura. Rev Cient Eletr Med Vet [Internet]. 2008 [citado 13 ago 2015];6(11). Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/UiNptHccCaH7Sm0_2013-6-14-14-42-26.pdf.

Spinosa HS, Gorniak SL, Brenardi MM. Tranqüilizantes e relaxantes musculares de ação central. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Brenardi MM. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. Capítulo14; 1996. p. 131-139.

Spolidorio DMP, Boriollo MFG, Estrela C, Spolidorio LC. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*. Robrac 2009 [citado 04 ago 2015];18(45). Disponível em: <http://www.robrac.org.br/seer/index.php/ROBRAC/article/viewFile/31/21>.

St-Germain G, Laverdiè`Re M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* Isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. J Clin Microbiol [Internet]. 2001 [citado 13 out 2015];39(3). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230409>.

Takahashi JP. Caracterização molecular e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* e outras leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos [tese] [Internet]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças; 2016 [citado 23 fev 2015]. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/143271/caracterizacao-molecular-e-perfil-de-suscetibilidade-de-cryptococcus-e-outras-leveduras-melanizadas/>.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia: 10. ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.

Tsa SS, Park JH, Hira K, Itakura C. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. Avian Pathol [Internet]. 1992 [citado 07 jun 2015];21(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18670989>.

Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Génética. Aislamiento e Identificación de levaduras [Internet] [citado 21 mar 2016]. Disponível em: http://coli.usal.es/web/abydl/praticas_lev/index.html.

Venturini MAFA. Estudo restropectivo de 3055 animais atendidos no ODONTOVET (Centro Odontológico Veterinário) durante 44 meses [dissertação] [Internet] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2006 [citado 07 jul 2015]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-14052007-081635/pt-br.php>.

Venturini M, Ferro DG, Correa HL, Gioso MA. Doenças da cavidade oral atendidas no Centro Odontológico Veterinário durante 44 meses – estudo retrospectivo. Nosso Clín [Internet]. 2007 [citado 27 mai 2015];1(59). Disponível em: <https://sites.google.com/site/saudecanina/artigos-cientificos-e-tecnicos/odontologia>.

Viana LO, Carvalho MFFP. Identificação de leveduras do gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMAGAR *Candida* e levantamento de fatores de risco. Rev Biol Farm [Internet]. 2012 [citado 27 abr 2015];8(1). Disponível em: <http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v8n1-2012/IDENTIFICA%C3%87%C3%83O%20DE%20LEVEDURAS%20DO%20G%C3%8ANERO%20CANDIDA.pdf>.

Vieira RG, Coutinho SDA. Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). Pesq Vet Bras [Internet]. 2009 [citado 07 set 2015];29(6). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000600002.

Wendisch L, Neuschranck APA, Mattei AS, Xavier MO, Madrid IM, MinelloLF, Behling GM, Vargas GD'a, Cleff MB, Meireles MCA. Isolamento e identificação de *Candida* em aves silvestres do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (Nurfs). [Internet]. Mostra Científica XVIII - Congresso de Iniciação Científica, XI ENPOSI; 2010 [citado 07 out 2015]. Disponível em: <http://www.escavador.com/sobre/686647/iara-wendisch>.

Zaitz C, Campbell I, Marques AA, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de micologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. Semin Respir Crit Care Med [Internet]. 2008 [citado 07 jan 2016];29. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366001>.

ANEXO A - Ficha de Identificação individual do animal e histórico clínico.

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL E HISTÓRICO CLÍNICO	
Nome do animal:	Idade:
Peso:	Sexo:
Alimentação:	
Estado Geral:	
Presença ou Não de Doença Periodontal (DP):	
Histórico Clínico:	

ANEXO B - Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA)

 <p>Fundada em 1900 <i>"Em virtude hávia de excelência"</i></p>	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA Comissão de Ética no Uso de Animais Tel. (11) 3091 7842 ceuafo@usp.br</p>
<p>Certificado</p>	
<p>Certificamos que o protocolo registrado sob nº 007/2015 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, Coordenadora da Linha de Pesquisa "Isolamento, identificação e sensibilidade a antifúngicos de leveduras patogênicas, em especial do gênero <i>Candida</i> SP. Em cavidade oral de cães da cidade de Campinas - SP" do qual participam os pesquisadores Carina Domaneschi e Bianca Silva Navarro, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 23/03/2015, com validade de 03 (três) anos.</p>	
<p>São Paulo, 25 de março de 2015.</p>	
 <p>Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez Coordenador do CEUA-FOUSP</p>	
<hr/> <p>Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – São Paulo, SP – Cep 05508-000 www.fo.usp.br</p>	

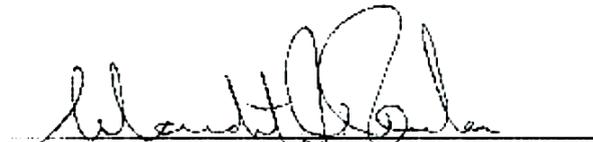
ANEXO C - Termo para liberação de entrada e autorização para uso dos animais residentes no DPBEA-Campinas/SP

**TERMO PARA LIBERAÇÃO DE ENTRADA E AUTORIZAÇÃO PARA USO
DOS ANIMAIS RESIDENTES NO DPBEA- CAMPINAS/SP**

Solicito ao "DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO E BEM ESTAR ANIMAL (DPBEA)" autorização para coleta de material biológico proveniente da cavidade oral dos animais ali residentes para desenvolvimento de trabalho científico de Mestrado.

Os dados serão utilizados no projeto "ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS. EM ESPECIAL DO GÊNERO *CANDIDA* SP. EM CAVIDADE ORAL DE CÃES DE VARIADAS RAÇAS DA CIDADE DE CAMPINAS, SÃO PAULO" da pesquisadora "CLAUDETE RODRIGUES PAULA" para composição da iniciação científica da aluna "BIANCA SILVA NAVARRO".

Campinas, 29 de Janeiro 2015.


ASSINATURA DO SOLICITANTE
 (Responsável pela pesquisa)

O DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO E BEM ESTAR ANIMAL autoriza a utilização dos animais e de suas dependências para coleta de dados do projeto de pesquisa supracitado.

Assinatura e carimbo:


M.V. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe (Diretor)

ANEXO D - Resultados pareados dos exames de identificação das leveduras isoladas dos cães, Campinas - SP

Animal	Levedura	DP	Idade (anos)	Micromorfologia		Identificação Presuntiva	Identificação Bioquímica		Perfil de Sensibilidade aos Antifúngicos*					
				Microcultivo	TG		CHROMAGAR®	Sistema API 20C AUX	Urease	MYC	IT	CET	FL	CS
1	-	N	2	Isolamento Negativo										
2	1	S	4	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,067	0,094	0,033	3	0,002	0,097
3	2	S	5	Filamentação + Clamidoconídio	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,25	0,032	3	0,064	0,032
	3			Filamentação	-	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	0,047	0,25	0,023	3	0,125	0,047
4	-	S	3	Isolamento Negativo										
5	4	S	4	Filamentação + Clamidoconídio	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,097	0,15	0,032	3	0,003	0,19
6	-	N	2	Isolamento Negativo										
7	5	N	3	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,77	0,129	0,094	2	1	0,125
8	6	S	4	Filamentação + Artroconídio	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>	+	>32	0,75	1	1	>32	0,032
	7			Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,129	0,044	3	0,023	0,097
9	8	N	6	Filamentação + Clamidoconídio	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,059	0,35	0,039	3	0,058	0,037
10	-	N	3	Isolamento Negativo										
11	9	S	6	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,06	0,028	3	0,25	0,047

continua

DP - Doença Periodontal; TG - Tubo germinativo; MYC - Miconazol; IT - Itraconazol; CET - Cetoconazol; FL - Fluconazol; CS - Caspofungina; VOR - Voriconazol; (-) Negativo; (+) Positivo.

*Nota-se: Resultados de resistência antifúngica em **vermelho**, sensibilidade dose dependente em **azul** e de sensibilidade em **preto**.

continuação

ANEXO D - Resultados pareados dos exames de identificação das leveduras isoladas dos cães, Campinas - SP

Animal	Levedura	DP	Idade (anos)	Micromorfologia		Identificação Presuntiva	Identificação Bioquímica		Perfil de Sensibilidade aos Antifúngicos*					
				Microcultivo	TG		CHROMAGAR®	Sistema API 20C AUX	Urease	MYC	IT	CET	FL	CS
12	-	N	3	Isolamento Negativo										
13	-	N	1	Isolamento Negativo										
14	10	S	5	Filamentação	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	-	0,023	0,002	0,012	6	0,094	0,094
15	12	S	7	Ausência de filamentação	-	Não <i>Candida spp.</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>	+	>32	0,004	0,012	3	>32	0,012
	13			Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,85	0,129	0,063	4	3	0,125
16	11	S	4	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,061	0,094	0,035	3	0,004	0,094
17	-	N	2	Isolamento Negativo										
18	14	S	5	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,064	0,023	2	0,25	0,047
19	15	S	6	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,75	0,128	0,091	3	1	0,122
20	16	S	4	Filamentação + Artroconídio	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon Asahii</i>	+	>32	0,75	1,5	8	>32	0,5
	17			Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,75	0,125	0,094	3	1	0,125
	18			Filamentação	-	<i>C. krusei</i>	Inconclusivo	+	0,19	1	0,75	96	0,125	0,5

continua

DP - Doença Periodontal; TG - Tubo germinativo; MYC - Miconazol; IT - Itraconazol; CET - Cetoconazol; FL - Fluconazol; CS - Caspofungina; VOR - Voriconazol; (-) Negativo; (+) Positivo.

*Nota-se: Resultados de resistência antifúngica em **vermelho**, sensibilidade dose dependente em **azul** e de sensibilidade em **preto**.

continuação

ANEXO D - Resultados pareados dos exames de identificação das leveduras isoladas dos cães, Campinas - SP

Animal	Levedura	DP	Idade (anos)	Micromorfologia		Identificação Presuntiva	Identificação Bioquímica		Perfil de Sensibilidade aos Antifúngicos*					
				Microcultivo	TG	CHROMAGAR®	Sistema API 20C AUX	Urease	MYC	IT	CET	FL	CS	VOR
21	19	N	2	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	1	0,125	0,064	8	0,38	0,125
22	20	S	8	Filamentação + Clamidoconídio	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,094	0,19	0,032	3	0,002	0,19
23	21	S	7	Filamentação	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	0,094	0,125	0,19	>256	0,38	0,38
24	22	S	9	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	0,094	0,094	0,032	3	0,032	0,125
25	23	N	3	Filamentação	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	0,032	0,19	0,25	48	0,125	0,38
26	24	S	8	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,047	0,064	0,032	2	0,064	0,094
27	25	N	1	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	0,012	0,094	0,094	>256	0,5	0,75
28	26	S	6	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,064	0,023	2	0,25	0,047
	27			Filamentação + Artroconídio	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon spp</i>	+	>32	>32	4	8	>32	0,25
	28			Filamentação	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	-	0,047	0,064	0,125	>256	0,5	0,5
	29			Filamentação	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	-	0,032	0,125	0,094	>256	0,5	0,5
29	30	S	7	Filamentação + Clamidoconídio	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,074	0,25	0,039	3	0,068	0,032

continua

DP - Doença Periodontal; TG - Tubo germinativo; MYC - Miconazol; IT - Itraconazol; CET - Cetoconazol; FL - Fluconazol; CS - Caspofungina; VOR - Voriconazol; (-) Negativo; (+) Positivo.

*Nota-se: Resultados de resistência antifúngica em **vermelho**, sensibilidade dose dependente em **azul** e de sensibilidade em **preto**.

continuação

ANEXO D - Resultados pareados dos exames de identificação das leveduras isoladas dos cães, Campinas - SP

Animal	Levedura	DP	Idade (anos)	Micromorfologia		Identificação Presuntiva	Identificação Bioquímica		Perfil de Sensibilidade aos Antifúngicos*					
				Microcultivo	TG		CHROMAGAR®	Sistema API 20C AUX	Urease	MYC	IT	CET	FL	CS
30	-	S	3	Isolamento Negativo										
31	31	S	9	Ausência de filamentação	-	<i>Candida spp</i>	Inconclusivo	+	0,25	0,25	0,38	2	0,38	0,047
32	32	S	4	Filamentação + Clamidoconídio	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,094	0,195	0,032	3	0,002	0,196
33	33	S	4	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,094	0,032	3	0,002	0,094
34	-	S	2	Isolamento Negativo										
35	34	S	4	Filamentação + Artroconídio	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon spp</i>	+	>32	3	0,25	>256	>32	0,125
	35			Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	0,047	0,054	0,131	96	0,19	0,59
36	36	S	6	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,75	0,125	0,064	4	3	0,125
37	-	S	3	Isolamento Negativo										
38	-	S	3	Isolamento Negativo										
39	-	S	4	Isolamento Negativo										
40	37	S	7	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,75	0,064	0,032	3	1,5	0,064

continua

DP - Doença Periodontal; TG - Tubo germinativo; MYC - Miconazol; IT - Itraconazol; CET - CEtoconazol; FL - Fluconazol; CS - Caspofungina; VOR - Voriconazol; (-) Negativo; (+) Positivo.

*Nota-se: Resultados de resistência antifúngica em **vermelho**, sensibilidade dose dependente em **azul** e de sensibilidade em **preto**.

conclusão

ANEXO D - Resultados pareados dos exames de identificação das leveduras isoladas dos cães, Campinas - SP

Animal	Levedura	DP	Idade (anos)	Micromorfologia		Identificação Presuntiva	Identificação Bioquímica		Perfil de Sensibilidade aos Antifúngicos*					
				Microcultivo	TG		CHROMAGAR®	Sistema API 20C AUX	Urease	MYC	IT	CET	FL	CS
41	38	N	2	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,69	0,15	0,098	4	1	0,131
42	-	N	1	Isolamento Negativo										
43	39	S	6	Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	0,047	0,047	0,125	96	0,19	0,5
44	-	N	2	Isolamento Negativo										
45	40	S	6	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,125	0,047	3	0,023	0,094
46	41	N	3	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,099	0,037	3	0,002	0,094
47	-	S	4	Isolamento Negativo										
48	43	S	2	Filamentação + Artroconídio	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>Trichosporon asahii</i>	+	> 32	1	1	16	> 32	0,35
	42			Filamentação	-	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	0,65	0,064	0,039	3	1,55	0,065
49	-	N	1	Isolamento Negativo										
50	44	S	3	Filamentação	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	0,064	0,064	0,023	2	0,25	0,053
	45			Filamentação	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i>	-	0,035	0,19	0,36	44	0,129	0,38

DP - Doença Periodontal; TG - Tubo germinativo; MYC - Miconazol; IT - Itraconazol; CET - CEtoconazol; FL - Fluconazol; CS - Caspofungina; VOR - Voriconazol; (-) Negativo; (+) Positivo.

*Nota-se: Resultados de resistência antifúngica em **vermelho**, sensibilidade dose dependente em **azul** e de sensibilidade em **preto**.