

MÁRIO MENDES BONCI

**Identificação fenotípica e proteômica da microbiota oral de cães –
sensibilidade a antifúngicos e virulência**

São Paulo

2022

MÁRIO MENDES BONCI

**Identificação fenotípica e proteômica da microbiota oral de cães –
sensibilidade a antifúngicos e virulência**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

Coorientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Bonci, Mário Mendes.

Identificação fenotípica e proteômica da microbiota oral de cães – sensibilidade a antifúngicos e virulência / Mário Mendes Bonci; orientadora Claudete Rodrigues Paula; coorientador Francisco de Assis Baroni. -- São Paulo, 2022.

105 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Azóis. 2. Estomatite. 3. Micoses. 4. Poliênicos. 5. Resistência. I. Paula, Claudete Rodrigues. II. Baroni, Francisco de Assis. III. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Bonci MM. Identificação fenotípica e proteômica da microbiota oral de cães – sensibilidade a antifúngicos e virulência. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 05/10/2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Carina Domaneschi

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: APROVADO

Profa. Dra. Debora Moreira

Instituição: Universidade São Judas Tadeu

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Rennan Luiz Oliveira dos Santos

Instituição: Universidade Anhanguera

Julgamento: APROVADO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Sebastião Luís Bonci e Márcia Aparecida Mendes Ribeiro Bonci, aos meus irmãos João Luís Mendes Bonci e Camila Mendes Bonci, meus avós Darcisio Bonci (*in memoriam*), Ana Vieira Bonci (*in memoriam*), João Mendes Ribeiro Júnior, Ruth Mendes Ribeiro (*in memoriam*) e a todos de minha família. Foram e são fundamentais em minha caminhada.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram em todos os momentos, e fizeram a jornada até aqui ser muito prazerosa. Estaremos sempre juntos.

À Universidade de São Paulo e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que me acolheram e me formaram o profissional que sou hoje.

A todos os animais, que me cativaram desde a infância e despertaram o sonho de ser Médico Veterinário.

A Prof^a. Dr^a. Claudete Rodrigues Paula, minha orientadora em pesquisa, profissão e vida. Foi um prazer imenso poder ter uma grande referência da ciência como minha mentora e amiga neste momento do doutorado. Uma grande pessoa e referência para o mundo da micologia. Serei eternamente grato pelo modo como me recebeu e me guiou até aqui.

Ao Prof. Francisco de Assis Baroni, meu coorientador neste projeto, sempre à disposição para ensinar e tornar nosso trabalho mais agradável. Muito obrigado por todos os ensinamentos e momentos. Foi, e é um exemplo para todos os alunos e também grande amigo.

Ao Prof. Sergio Gaspar de Campos e a Prof^a. Ângela Oliveira, que me despertaram a paixão pela microbiologia. É admirável o modo como encaram o trabalho e a dedicação que possuem para transmitir o conhecimento. Agradeço também, a todos os outros Professores e Funcionários da Faculdade de Odontologia da USP, em especial, as funcionárias Nina e Cidinha, cada um teve sua participação especial durante minha formação, e hoje vejo vocês como uma grande família da qual tenho orgulho de fazer parte.

A Dr^a. Maria José Silveira e a Controlbio – Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda. – São Paulo/SP, que foram essenciais para execução de nossa pesquisa. Extremamente grato pelo grande apoio.

Ao Prof. Celso Guimarães Barbosa, que muito solícito, auxiliou e ajudou nas análises estatísticas deste projeto.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Obrigado a todos!

"Não há diferença fundamental entre o Homem e os animais nas suas faculdades mentais(...) Os animais, como o Homem, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento".

Charles Darwin

RESUMO

Bonci MM. Identificação fenotípica e proteômica da microbiota oral de cães – sensibilidade a antifúngicos e virulência [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

A microbiota oral dos animais de companhia, especialmente de cães, é tema relativamente pouco estudado e que tem ganhado espaço em discussões e pesquisas nos anos recentes. Supõe-se, que dentre as principais áreas anatômicas atuantes como fontes de compartilhamento de fungos entre cães e pessoas, esteja a cavidade oral, o que possivelmente, eleva o número de enfermidades relacionadas a esses fungos tanto nas pessoas, quanto nos animais, principalmente neste sítio anatômico. Dentre as leveduras mais isoladas da cavidade oral de cães estão *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp. Para melhor compreensão das interações entre os microrganismos, das leveduras ao sítio hospedeiro e a capacidade delas em gerar enfermidades, o entendimento de técnicas de identificação das leveduras (fenotípicas e proteômica) e dos fatores de virulência pode elucidar novas metodologias de controle das infecções fúngicas. A investigação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos da microbiota oral dos cães serve como ferramenta na prevenção de fungemias graves, fornecendo aos clínicos ferramentas eficientes para o controle rápido e menos invasivo das infecções nos pacientes. A comparação de metodologias como disco-difusão em agar e microdiluição, pode evidenciar pontos críticos a serem melhorados em alguns protocolos da rotina laboratorial, bem como indicar qual a melhor técnica de avaliação da sensibilidade para a rotina clínica em leveduras. Este trabalho comparou técnicas fenotípicas e proteômica de identificação das leveduras da cavidade oral de cães, bem como avaliou a produção de protease, fosfolipase, DNase e hemolisinas. Também foram realizados testes de sensibilidade aos azóis e poliênicos, por disco-difusão e microdiluição. A técnica fenotípica de identificação mostrou-se melhor aliada na identificação das leveduras quando comparada à proteômica, principalmente para as leveduras do gênero *Candida*. Os isolados demonstraram variados potenciais de produzir fatores de virulência, não sendo observado um padrão para esta produção “in vitro”. A técnica da microdiluição,

padrão para análises das leveduras, mostrou resultados superiores e mais confiáveis pra escolha do antifúngico para tratamento clínico. Assim, os resultados demonstram que mais dados devem ser colhidos e estudados para melhor caracterizar a produção “in vitro” dos fatores de virulência das leveduras, bem como adaptações ainda são necessárias para que se possa dar alta confiabilidade à disco-difusão em agar e a técnica de identificação proteômica.

Palavras-chave: Azóis. Estomatite. Micoses. Poliênicos. Resistência.

ABSTRACT

Bonci MM. Phenotypic and proteomic identification of the oral mycobiota of dogs – antifungal sensitivity and virulence [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

The oral biota of company animals, especially dogs, is a relatively little studied topic and has gained space in discussions and research in recent years. It is assumed that, among the main anatomical areas acting as sources of sharing fungi between dogs and people, is the oral cavity, which possibly increases the number of diseases related to these fungi both in people and in animals, especially in this anatomical site. Among the most isolated yeasts from the oral cavity of dogs are *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. and *Trichosporon* spp. For a better understanding of interactions between microorganisms, from yeasts to the host site and their ability to generate diseases, the understanding of yeast identification techniques (phenotypic and proteomics) and virulence factors can elucidate new methodologies for controlling fungal infections. The investigation of the antifungal susceptibility profile of the oral mycobiota of dogs serves as a tool in the prevention of severe fungemia, providing clinicians with efficient tools for rapid and less invasive control of infections in patients. The comparison of methodologies such as disk diffusion in agar and microdilution can highlight critical points to be improved in some routine laboratory protocols, as well as indicate the best technique for evaluating sensitivity for the clinical routine in yeast. This work compared phenotypic and proteomic techniques to identify yeasts in the oral cavity of dogs, as well as evaluated the production of protease, phospholipase, DNase and hemolysins. Sensitivity tests to azoles and polyenes were also performed, by disk diffusion and microdilution. The phenotypic identification technique proved to be a better ally in the identification of yeasts when compared to proteomics, especially for yeasts of the *Candida* genus. The isolates showed varied potential to produce virulence factors, with no pattern being observed for this production “in vitro”. The microdilution technique, standard for yeast analysis, showed superior and more reliable results for the choice of antifungal for clinical treatment. Thus, the results demonstrate that more data should be collected and studied to better characterize the “in vitro”

production of yeast virulence factors, as well as adaptations are still necessary in order to give high reliability to the disk diffusion in agar and the proteomic identification technique.

Keywords: Azoles. Stomatitis. Mycoses. Polyenes. Resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Cão selecionado para a pesquisa já contido para o procedimento de coleta38
- Figura 4.2 - Placa de Petri de agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol pós semeadura das diluições das amostras da cavidade oral dos cães – colônias de leveduras41
- Figura 4.3 - Placas de Petri com meio de Christensen - pH ácido em amarelo; pH alcalino, em róseo43
- Figura 4.4 - Microscopia de *Candida* spp. após cultivo em agar arroz – produção de clamidoconídios – 400x44
- Figura 4.5 - Placas de Petri com CHROMagar®*Candida* – cores diferentes indicando diferentes espécies do gênero *Candida*.....46
- Figura 4.6 - Placas de Petri em teste de auxanograma – crescimento da levedura evidenciado por zonas opacas nas bordas da placa47
- Figura 4.7 - Bateria de zimograma - evidência de processos fermentativos leva a produção de gás apreendida no interior dos tubos de Durham - a produção de ácidos é verificada pela mudança da coloração do indicador de pH, de verde para o amarelo.....48
- Figura 4.8 - Placa de Petri contendo agar para produção de protease – halo de degradação ao redor da colônia de *Candida* spp.50

Figura 4.9 - Placa de Petri contendo agar para produção de fosfolipase – halo de degradação ao redor da colônia de <i>Rhodotorula</i> spp. (1)	51
Figura 4.10-Placa de Petri contendo agar para produção de fosfolipase – halo de degradação ao redor da colônia de <i>Rhodotorula</i> spp. (2)	52
Figura 4.11-Placa de Petri contendo agar para produção de DNase – halo de degradação ao redor da colônia de <i>Candida</i> spp.....	53
Figura 4.12-Placa de Petri de agar Sabouraud contendo 7 % de sangue de carneiro para teste de produção de hemolisinas – <i>Candida</i> spp.....	54
Figura 4.13-Placa de Petri de agar Sabouraud contendo 7 % de sangue de carneiro para teste de produção de hemolisinas – <i>Malassezia</i> spp.	55
Figura 4.14-Placa de Petri com teste de Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer) – <i>Rhodotorula</i> spp. resistente aos azóis	57
Figura 4.15-Placa de Petri com teste de Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer) – <i>Candida</i> spp. resistente aos azóis.....	57
Figura 4.16-Placa de Petri com teste de Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer) – <i>Candida</i> spp. sensível aos azóis e poliênicos	58
Figura 4.17-Placa de 96 micropoços contendo amostra em duplicata da levedura submetida ao teste de susceptibilidade ao itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B – pré-incubação	59
Figura 4.18-Placa de 96 micropoços contendo amostra em duplicata da levedura submetida ao teste de susceptibilidade ao itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B – pós-incubação (coloração amarela indica o crescimento fúngico)	60

Figura 4.19-Micropoço visualizado à lupa de aumento pós-incubação – inibição total do crescimento fúngico60

Figura 4.20-Micropoço visualizado à lupa de aumento pós-incubação – evidência de crescimento fúngico61

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Classificação da produção enzimática de acordo com Price et al. (1982) e adaptada por Ishida et al. (2012)	56
Tabela 5.1 - Classificação fenotípica das 46 leveduras isoladas da cavidade oral de cães; classificação proteômica de 37 leveduras isoladas da cavidade oral de cães; em amarelo, estão os isolados com classificações fenotípica e proteômica positivamente correspondentes	64
Tabela 5.2 - Distribuição por gêneros identificados por técnica fenotípica e pela técnica proteômica - leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	67
Tabela 5.3 - Produção de protease por leveduras isoladas da cavidade oral de cães	67
Tabela 5.4 - Classificação da intensidade de produção de protease por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	70
Tabela 5.5 - Produção de fosfolipase por leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	71
Tabela 5.6 - Classificação da intensidade de produção de fosfolipase por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	72
Tabela 5.7 - Produção de DNase por leveduras isoladas da cavidade oral de cães	73
Tabela 5.8 - Classificação da intensidade de produção de DNase por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	75
Tabela 5.9 - Produção de hemolisinas por leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	76
Tabela 5.10- Classificação da intensidade de produção de hemolisinas por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	77

Tabela 5.11- Halos em mm obtidos em teste de disco-difusão em agar – leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	79
Tabela 5.12- Interpretações obtidas em teste de disco-difusão em agar – leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	81
Tabela 5.13- Concentrações inibitórias mínimas em µg/mL em teste de microdiluição em caldo – leveduras isoladas da cavidade oral de cães.....	82
Tabela 5.14- Interpretações das concentrações inibitórias mínimas em teste de microdiluição em caldo – leveduras isoladas da cavidade oral de cães	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.O.D.	“biochemical oxygen demand”
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dr ^a	doutora
I	intermediário
Inib. Compl.	inibição completa
Ltda	limitada
MALDI-TOF	“matrix associated laser desorption/ionization - time of flight”
MIC	“minimum inhibitory concentration”
Pz	“precipitation zone”
R	resistente
RJ	Rio de Janeiro
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”
S	sensível
SP	São Paulo
spp.	espécies

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
n ^o	número
mL	mililitro
mm	milímetro
°C	graus Celsius
%	percentagem
®	registrada
pH	potencial hidrogeniônico
x	vezes
μ L	microlitro
rpm	rotação por minuto
=	igual
\geq	maior ou igual
<	menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	MICROBIOTA ORAL DOS CÃES.....	29
2.2	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	30
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DAS LEVEDURAS	32
2.4	ANTIFÚNGICOS	33
3	PROPOSIÇÃO	35
3.1	PROPOSIÇÕES GERAIS.....	35
3.2	PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS.....	35
3.3	JUSTIFICATIVA	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	COLETA DE AMOSTRAS.....	37
4.1.1	Seleção dos pacientes	37
4.1.2	Utensílios para coleta	38
4.1.3	Procedimentos para coleta	39
4.1.4	Transporte das amostras	39
4.2	DILUIÇÃO E SEMEADURA DAS AMOSTRAS	40
4.2.1	Manutenção das amostras	41
4.3	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	41
4.3.1	Identificação fenotípica das leveduras	41
4.3.1.1	Teste de produção de urease	42
4.3.1.2	Teste de produção de clamidoconídios	44
4.3.1.3	Teste para a produção de tubos germinativos.....	45
4.3.1.4	Semeadura em CHROMagar® <i>Candida</i>	45
4.3.1.5	Auxanograma	46
4.3.1.6	Zimograma.....	46
4.3.2	Identificação proteômica das leveduras	48
4.4	AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA “IN VITRO” DAS LEVEDURAS	49
4.4.1	Protease	49
4.4.2	Fosfolipase	50
4.4.3	DNase	52

4.4.4	Atividade hemolítica	53
4.4.5	Interpretação da atividade enzimática	55
4.5	TESTES DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS	56
4.5.1	Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer)	56
4.5.2	Microdiluição em caldo	58
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	97
	ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

A microbiota oral dos animais de companhia, especialmente de cães, é tema relativamente pouco estudado e que tem ganhado espaço em discussões e pesquisas nos anos recentes (Navarro et al., 2020). Tal fato pode ser explicado pela maior proximidade entre estes animais e pessoas, elevando os cães ao “status” de um ente familiar, sugerindo-lhes os cuidados antes restritos apenas aos seres humanos (Paula et al., 2021).

Em medicina veterinária, até então, maior atenção era dada apenas a microbiota da pele, ouvido e mucosa cervico-vaginal, que na maioria das vezes geram quadros clínicos evidentes aos responsáveis pelos animais, como dermatites e otites (Meason-Smith et al., 2015; Antonio et al., 2018; Korbelik et al., 2018). Dentre as leveduras mais isoladas da cavidade oral de cães estão *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp. (Brito et al., 2009; Navarro et al., 2020).

Supõe-se, que dentre as principais áreas anatômicas atuantes como fontes de compartilhamento de fungos entre cães e pessoas, esteja a cavidade oral, constituída por lábios, o revestimento interior dos lábios e bochechas, os dentes, as gengivas, dois terços anteriores da língua, o assoalho da boca e o céu da boca (palato).

Acredita-se que tal aproximação entre pessoas e cães, conseqüentemente acarrete em maior troca de microrganismos entre estes, como leveduras do gênero *Candida* e *Malassezia*, bem como fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp., que também possuem reconhecido potencial patogênico, aumentando, possivelmente, o número de enfermidades relacionadas a esses fungos tanto nas pessoas, quanto nos animais, principalmente em cavidade oral.

Para tal, estudos relacionados a caracterização da microbiota da cavidade oral de cães, visando futura correlação dos achados a doenças e outros fatores relacionados a saúde, devem ser realizados, já que até então o assunto não atraiu maior atenção de grupos de pesquisas e os dados estão escassos, ou mesmo indisponíveis.

Um dos entraves no estudo de fungos, especificamente leveduras, está na identificação das espécies. Visto a grande variedade de microrganismos distintos

que podem ser isolados de sítios como a cavidade oral, testes fenotípicos tendem a ser de alto custo e a demandar maior tempo para que se chegue à identificação das espécies, o que em muitos casos não é possível, limitando a nomenclatura ao gênero.

Para melhor compreensão das interações entre os microrganismos, das leveduras ao sítio hospedeiro e a capacidade delas em gerar enfermidades, o entendimento dos fatores de virulência pode elucidar novas técnicas de controle das infecções fúngicas.

Das enzimas mais estudadas em leveduras, principalmente em *Candida* spp., então a fosfolipase, DNase e a protease, fatores sabidamente relacionados a adesão e penetração dos tecidos, como pela produção de hifas, na cavidade oral (Luo et al., 2001). Mas, alguns fatores de virulência são menos estudados em fungos, como as hemolisinas. Estas enzimas estão relacionadas a degradação da hemoglobina para que o microrganismo utilize as moléculas de ferro circulantes no sangue, o que pode acarretar em diversos distúrbios nos animais e nas pessoas (Linares et al., 2007; Ataidés et al., 2020).

A ação hemolítica de *C. albicans* possui maior elucidação, sendo esta espécie potente produtora, porém, a ação da hemolisina de outras leveduras é ainda desconhecida, sendo poucas as pesquisas em outras espécies, como *C. dubliniensis*, por exemplo (Luo et al., 2001; Furlaneto et al., 2018).

Visto a emergência de fungemias e outras enfermidades relacionadas a outras leveduras, que não *C. albicans*, avaliou-se estes quatro fatores de virulência das leveduras da cavidade oral de cães, gerando dados importantes sobre a patogenicidade da microbiota deste sítio.

Além das dificuldades na identificação dos fungos, e de entendimento dos fatores de virulência, tanto de animais, quanto de pessoas, novos desafios têm surgido para os clínicos, e um dos mais graves é a resistência aos fármacos antifúngicos disponíveis no mercado. Em medicina veterinária não são raros relatos de isolados de *Malassezia pachydermatis* multirresistentes, bem como isolados de *Candida* spp. em humanos, e atualmente, casos ligados especificamente a *Candida auris*, que tem sido relatada a casos graves em internações de diversas localidades (Kano et al., 2020; Rhodes; Fisher, 2019; Zamith-Miranda et al., 2019).

A investigação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos da microbiota oral dos cães serve como ferramenta na prevenção de fungemias graves, fornecendo

aos clínicos ferramentas eficientes para o controle rápido e menos invasivo das infecções nos pacientes. A comparação de metodologias de testes “in vitro” pode evidenciar pontos críticos a serem melhorados em alguns protocolos da rotina laboratorial, bem como indicar qual a melhor técnica de avaliação da sensibilidade para a rotina clínica em leveduras.

A técnica da microdiluição para determinar a sensibilidade aos antifúngicos possui a vantagem de fornecer a concentração inibitória mínima (CIM, ou MIC), mas a desvantagem de possuir a metodologia mais complexa e demorada em relação as técnicas de difusão em agar (Silva et al., 2016). Porém, para testes laboratoriais envolvendo apenas pesquisa, e não diagnóstico clínico, é uma das técnicas mais utilizadas na triagem dos fungos, pelo bom custo e pelos resultados que fornece (Alves et al., 2010). A comparação destes dois métodos, além de desmascarar possíveis isolados multirresistentes, poderá direcionar quais apresentam resultados mais confiáveis e viáveis para a rotina clínica humana e veterinária.

Diante dos fatos, torna-se de suma importância a pesquisa acerca da microbiota da cavidade oral dos cães, fornecendo dados sobre os microrganismos e o sítio biológico que habitam, que auxiliarão em investigações epidemiológicas, e conseqüentemente serão ferramentas para a prevenção e controle das emergentes infecções fúngicas, tanto em saúde humana, quanto em medicina veterinária. Assim, esses são os objetivos pretendidos com os resultados obtidos nesta pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROBIOTA ORAL DOS CÃES

A saúde oral canina é tema que vem ganhando espaço nos últimos anos, visto a proximidade cada vez maior entre pessoas e estes animais. De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação, em 2021 havia aproximadamente 56 milhões de cães nos lares brasileiros.

Tal proximidade ocasiona grande troca de microrganismos entre os cães e as pessoas, principalmente pelo hábito de lambedura por parte dos cães, ou mesmo por acidentes envolvendo mordeduras (Paula et al., 2021). O tratamento de lesões causadas por mordedura de cães pode ser complicado, devido ao envolvimento de diversos tipos de microrganismos, dentre eles, leveduras (Viotto et al., 2022).

São poucos os dados que descrevem a microbiota oral dos cães, sendo a grande disponibilidade dos dados acerca da população bacteriana, como exposto por Elliott et al. (2005) e Beikler et al. (2021), sendo o gênero *Neisseria* um dos mais frequentes frente a outros gêneros bacterianos, como *Actinomyces* e *Streptococcus*.

Dentre as espécies fúngicas mais isoladas e descritas da cavidade oral de cães estão *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp. (Brito et al., 2009; Navarro et al., 2020). Ressalta-se o fato de alguns destes microrganismos, principalmente *Candida* spp., *Malassezia* spp. e *Cryptococcus* spp. estarem diretamente relacionados a enfermidades nos animais e nas pessoas, como casos de estomatites, lesões cutâneas e mesmo infecções fúngicas disseminadas mais graves, como fungemias, que vem sendo cada vez mais detectadas em medicina humana e veterinária (Jadhav; Pal, 2006; Headley et al., 2016; Biegańska et al., 2018; Angileri et al., 2018).

Navarro et al. (2020) encontraram uma população de leveduras da boca de cães no município de Campinas-SP/Brasil composta predominantemente pelos gêneros *Candida*, *Trichosporon* e *Malassezia*, sendo *Candida albicans* a espécie mais isolada. Já Mendes (2021), avaliando a microbiota da cavidade oral de cães do

estado do Rio de Janeiro, encontrou a prevalência de isolados de *Malassezia pachydermatis*, seguido por espécies do gênero *Candida*, *Geotrichum*, e em menor quantidade, *Trichosporon*. Deng e Swamson (2015) em estudo sobre microbioma e microbiota oral de cães, gatos e pessoas, encontraram prevalência dos gêneros *Candida*, *Malassezia* e, menos frequente, *Cryptococcus* na cavidade oral de cachorros do Reino Unido.

É sabido que muitas pessoas possuem o hábito de “beijar” os seus animais de estimação, embora os cães não entendam isso exatamente como um carinho e há “pets” que possuem o hábito de lamber a face de seus responsáveis, podendo haver, decorrente a estes fatos, o compartilhamento de microrganismos entre as espécies (Burk, 2018).

A odontologia veterinária vem ganhando espaço nos últimos anos, e os avanços e pesquisas nesta área vem ganhando destaque. Antes restrita apenas a limpezas orais profiláticas, hoje os procedimentos dentais se assemelham cada vez mais aos serviços oferecidos pela odontologia em humanos (Flancman et al., 2018). Assim, maior conhecimento acerca da micobiota oral dos cães é necessário para consolidação da odontologia no meio veterinário, bem como para auxiliar no tratamento de lesões causadas por acidentes com mordeduras de cães.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

Tradicionalmente, a identificação fenotípica de fungos é tarefa laboriosa e demanda grande experiência dos atuantes do laboratório. No caso de alguns gêneros, como *Candida*, podem não gerar resultados com alto poder de exatidão para classificação de algumas espécies, como a diferenciação entre *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Por outro lado, a mucosa oral de cães pode apresentar cepas ou espécies que não correspondam ao comportamento fenotípico conhecido, podendo-se estar diante de variedades ou mesmo espécies desconhecidas (Marinho et al., 2010).

Características coloniais e microscópicas, em muitas situações são suficientes para caracterizar algum gênero como, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* e *Trichosporon*, porém, a caracterização em espécie desses gêneros é

de difícil exatidão, sendo fator impeditivo nos laboratórios que utilizam apenas métodos fenotípicos manuais de identificação (Corrêa et al., 2009).

Já para a caracterização de espécies do gênero *Candida*, diversas técnicas estão disponíveis e, quando utilizadas em conjunto, tendem a dar resultados extremamente satisfatórios. Dentre os testes mais utilizados nestes casos estão os de assimilação de substratos, como auxanograma e zimograma, respectivamente, e testes mais simples, como produção de tubo germinativo, clamidoconídios e semeadura em meios cromogênicos.

Há ainda baterias de assimilação de carboidratos comerciais, como API 20C AUX e API 32C, que embora tenham alto custo de execução, são bastante utilizados na rotina laboratorial (Zaremba et al., 2006). O sistema VITEK utiliza-se de automação para realizar testes de assimilação de carboidratos, e é um dos equipamentos mais utilizados em grandes laboratórios com alta demanda de serviço. Este método tem se mostrado de alta confiabilidade para identificação de espécies de *Candida*, mas ainda requer atualizações e maior precisão para a correta identificação de outros fungos (Graf et al., 2000).

Visando agilizar e dar maior exatidão à identificação de microrganismos, novas técnicas foram desenvolvidas nos últimos anos, como o processo de identificação proteômica, ou MALDI-TOF (“Matrix Associated Laser Desorption/Ionization - Time of Flight”). Este método é baseado na análise de biomoléculas em espectrometria de massa e depende de correta manutenção dos equipamentos, bem como constante atualização de banco de dados, o que em alguns casos pode deixar a desejar na identificação de alguns microrganismos (Sanguinetti; Posteraro, 2017).

Ainda assim, de posse de informações acerca da procedência do equipamento e dos sítios biológicos a serem analisados, o MALDI-TOF pode ser ferramenta importante no auxílio à identificação dos fungos, principalmente do gênero *Candida*, sendo técnica relativamente prática e que oferece resultados rapidamente (Gitman et al., 2017; Florio et al., 2018).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DAS LEVEDURAS

A capacidade das leveduras em se aderir as superfícies, proliferarem e invadir os tecidos, como em doenças da cavidade oral, deve-se a produção de fatores de virulência que visam combater os mecanismos de defesa do hospedeiro, como camada fosfolipídica das células e evasão de células de defesa, como redes de neutrófilos. Dentre estes fatores está a produção de enzimas como protease, fosfolipase e DNase (Naves et al., 2013).

O potencial virulento tende a ser essencial para o aparecimento de micoses na cavidade oral de cães, além de outros fatores, como antibioticoterapia de amplo espectro, uso de corticosteróides, quimioterapia, procedimentos cirúrgicos e a saúde da mucosa e a resistência do hospedeiro como um todo. A candidíase oral, por exemplo, é um sinal de possível comprometimento dos mecanismos de defesa do paciente, pois está relacionada ao desequilíbrio entre os fatores de virulência fúngicos e a defesa do hospedeiro (Jammil; Yehia, 2020).

Tais enzimas têm sido detectadas “in vitro” advindas das principais leveduras que podem colonizar a cavidade oral de pessoas e animais, como *Candida* e *Malassezia*, sendo o grau de produtividade bastante variado nas pesquisas disponíveis, mostrando não haver padrão entre a produção “in vitro” e o sítio anatômico, ou situação clínica da qual se encontrava o hospedeiro no momento da coleta (Rörig et al., 2009).

As proteases são enzimas que atuam na destruição e evasão das barreiras imunológicas do paciente, enquanto as fosfolipases atuam hidrolisando as ligações éster em glicerofosfolipídios por clivagem de uma ligação éster específica, danificando, assim, a membrana celular do hospedeiro permitindo a invasão para tecidos mais profundos (Montoya et al., 2020).

A desoxirribonuclease tem o papel de clivar as ligações fosfodiéster das moléculas de DNA. Assim, sua ação tem sido relacionada com a maturação do biofilme, bem como na evasão do sistema imunológico do hospedeiro. A dificuldade de reprodução “in vitro” da DNase, principalmente, em testes que utilizam halos de degradação em placas de Petri tem sido relatada por autores, que sugerem novas técnicas como, corridas em gel de agarose, que tendem a gerar resultados mais precisos e menos interpretativos (Haas et al., 2014).

Outro fator que tem se mostrado de grande importância é a produção de hemolisinas. Estas enzimas tem ação bem caracterizada em bactérias como *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Streptococcus*, por exemplo, mas ainda são pouco elucidadas para leveduras (Fonseca; De Marco, 2022). Pesquisadores tem relatado produção de hemolisinas por praticamente todos os isolados de *Candida*, mesmo que em intensidades variadas. A hemólise dos eritrócitos é causada por uma proteína constituinte da parede celular da levedura, porém sua ação ainda não foi detalhada, sabe-se apenas que a liberação de ferro, é essencial no processo invasivo do fungo ao hospedeiro (Rocha et al., 2018; Abrão et al., 2022).

2.4 ANTIFÚNGICOS

Dentre os antifúngicos mais utilizados em medicina veterinária e humana estão os azóis, como itraconazol, fluconazol e cetoconazol, e os poliênicos, como a anfotericina B e a nistatina (Santin et al., 2011). Os azóis foram descritos pela primeira vez em 1949, e atuam inativando a enzima C-14- α -desmetilase, interrompendo a síntese de ergosterol na membrana celular dos fungos. Já os poliênicos, ligam-se diretamente ao ergosterol da membrana celular fúngica, o que forma poros que alteram a permeabilidade da membrana, ocasionando a perda de proteínas, dentre elas, íons potássio que causam a morte celular (Rezende et al., 2017).

Embora não fosse algo recorrente em anos anteriores, a resistência das leveduras aos antifúngicos vem sendo cada vez mais descrita em casos clínicos em animais e pessoas (Meinerz et al., 2007). Em cães, tem sido recorrentes esses relatos, principalmente em resistência a azóis por isolados de *Malassezia* spp. e *Sporothrix* spp., sendo os poliênicos uma alternativa na resolução desses quadros (Lima et al., 2019; Peano et al., 2020).

Porém, Brito et al. (2009) em estudo da candidose em cães, já ressaltavam que as cepas deste gênero dos animais já atingiam níveis consideráveis de resistência aos azóis, servindo de alerta a estes microrganismos pouco relacionados a casos clínicos nos cães, talvez por sub-diagnóstico.

Assim, a realização de testes de sensibilidade aos antifúngicos, devem ser estimulados, principalmente em medicina veterinária, onde são poucos difundidos. Os testes de disco-difusão em agar são mais práticos e de menor custo quando comparados ao método padrão da microdiluição em caldo, porém, ainda tem resultados contestados e que necessitam de ajustes para serem utilizados na rotina clínica veterinária e humana (Silva et al., 2016; Navarro et al., 2020).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 PROPOSIÇÕES GERAIS

- Caracterização dos componentes da microbiota leveduriforme da cavidade oral de cães.
- Epidemiologia: entendimento, controle e prevenção de doenças.

3.2 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- Isolamento de fungos leveduriformes da cavidade oral de cães.
- Identificação fenotípica e proteômica das leveduras isoladas.
- Comparação dos métodos de identificação das leveduras: fenotípico e proteômico.
- Avaliação da virulência “in vitro” (fosfolipase, protease, DNase e atividade hemolítica) dos fungos leveduriformes isolados.
- Avaliação da susceptibilidade das leveduras isoladas aos antifúngicos itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B.
- Comparação entre métodos de avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos: microdiluição em caldo e disco-difusão em agar.

3.3 JUSTIFICATIVA

Diante das emergentes doenças fúngicas na rotina clínica humana e veterinária, o surgimento de cepas de leveduras resistentes e a crescente aproximação, e conseqüente maior compartilhamento de microrganismos, entre pessoas e animais, é de suma importância o entendimento do potencial patogênico dos microrganismos presentes na microbiota oral dos cães.

Com dados escassos, ou mesmo ausentes, acerca deste assunto, este projeto de pesquisa deseja preencher lacunas nas informações disponíveis dentro desta área, levantando hipóteses e tecendo conclusões que possam auxiliar profissionais da saúde humana e veterinária em suas rotinas de trabalho e pesquisa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

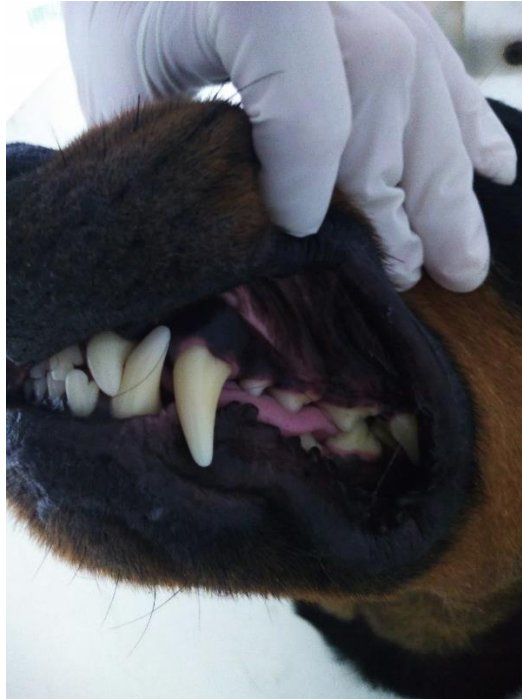
4.1.1 Seleção dos pacientes

Foram coletadas amostras de 38 cães (Figura 4.1), sendo obtidos 46 isolados de leveduras. Os animais utilizados para as coletas de amostras foram selecionados aleatoriamente em clínicas veterinárias dos municípios de Seropédica-RJ e Itaguaí-RJ, e no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo pertencentes a raças variadas e de ambos os sexos, com ao menos 1 ano de idade, com ou sem doença periodontal, excluindo-se aqueles que tenham utilizado fármacos antifúngicos nos dois meses anteriores à coleta. Assim que os tutores tivessem conhecimento e consentimento prévio do experimento a ser realizado, as coletas eram, então, realizadas no decorrer de consultas ou outros procedimentos pré-agendados nos estabelecimentos veterinários.

O projeto foi aprovado (nº: 031/2019) em reunião de 2 de novembro de 2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, protocolando o trabalho dentro da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009 e à luz dos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo A).

O projeto também foi aprovado (nº: 1936110919) em reunião de 25 de outubro de 2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, protocolando o trabalho dentro da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009 e à luz dos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo B).

Figura 4.1 – Cão selecionado para a pesquisa já contido para o procedimento de coleta



Fonte: O autor.

4.1.2 Utensílios para coleta

Para as coletas de amostras da cavidade oral de cães foram empregadas escovas dentais convencionais de cerdas macias sem uso prévio. As mesmas foram desembaladas e mergulhadas no interior de tubos de ensaio (200x25 mm) contendo 10 mL de tampão salina (suficiente para cobrir a porção das cerdas), sendo estes arrolhados por algodão e submetidos ao processo de autoclavação para esterilização (Apêndice A).

Este material era transportado em caixas de isopor contendo gelo, mantendo-os em temperatura de refrigeração, evitando a proliferação de contaminantes.

4.1.3 Procedimentos para coleta

As cerdas das escovas foram pressionadas em movimentos circulares pela cavidade oral do cão sem que houvesse evidência de dor, ou grandes incômodos aos animais, atingindo: parte interna das bochechas e dos lábios, dentes, parte superior da boca (palato duro), superfície da língua e parte inferior, abordando o palato mole. Para tal, os animais não precisaram de intervenções anestésicas, ou tranquilizantes, sendo necessária apenas contenção física.

Animais muito resistentes à essa contenção foram excluídos do estudo, visto que poderia levar sofrimento ao mesmo e risco aos médicos veterinários envolvidos na coleta.

Posteriormente, as escovas utilizadas foram devolvidas aos tubos contendo 10 mL do tampão salina, sendo os tubos armazenados em temperatura de refrigeração.

4.1.4 Transporte das amostras

As amostras (tubos de ensaio contendo 10 mL de salina e escova dental) foram transportas no interior de caixas de Isopor[®] em temperatura de refrigeração (-1 a 8 °C), até o Laboratório de Leveduras Patogênicas do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/Controlbio – Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda. – São Paulo/SP, ou para o Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica/RJ, onde ocorreram os processamentos iniciais das amostras, bem como outras etapas da pesquisa.

4.2 DILUIÇÃO E SEMEADURA DAS AMOSTRAS

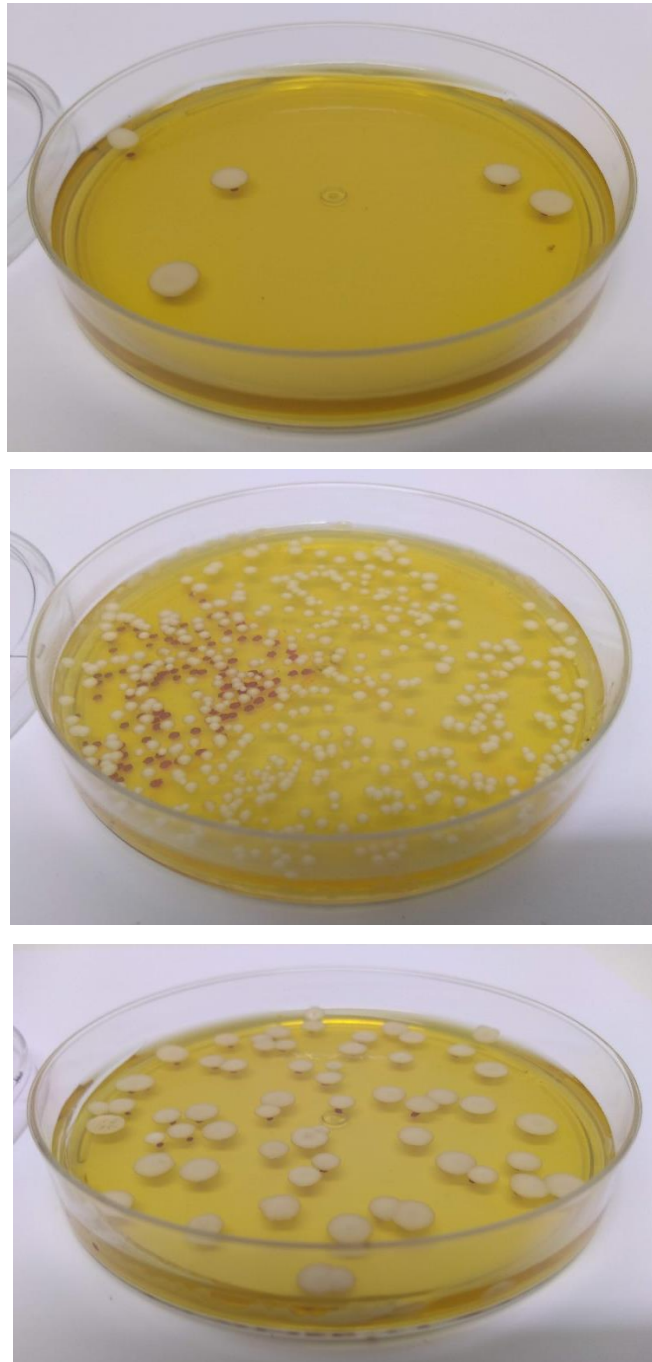
Inicialmente, os tubos contendo as escovas dentais foram submetidos à agitação em vórtex por 1 minuto, visando o desprendimento da carga microbiana das cerdas e homogeneização da mesma em solução salina.

Para cada amostra colhida (tubo de ensaio contendo 10 mL de salina e escova dental), foram realizadas diluições em tampão salina, de 10^{-1} a 10^{-3} . Para tal, 1 mL da solução salina contida no tubo de ensaio contendo a massa microbiana obtida pelas escovas dentais foi transferido, com auxílio de micropipeta monocanal e ponteiros estéreis, para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril, sendo este material homogeneizado. Novamente, 1 mL foi transferido para outro tubo contendo 9 mL de salina, e assim, sucessivamente para um terceiro tubo. Esta diluição permitiu melhor isolamento e visualização de colônias nas placas pós semeadura.

Após a diluição das amostras nos tubos de ensaio, 1 mL de cada tubo foi transferido (micropipeta monocanal e ponteiros estéreis) e semeado, pela técnica de “spread plate” com espalhamento com alça de Drigalski, para placas de Petri (90x15 mm) individuais contendo agar Sabouraud dextrose 4% acrescido de cloranfenicol (Apêndice A), totalizando três placas para cada amostra (Figura 4.2).

As placas de Petri de cada diluição permaneceram incubadas a 37 °C em estufa B.O.D., com inspeção diária, por até 20 dias. Após este período, caso não houvesse evidência de crescimento fúngico, o cultivo seria considerado negativo e a amostra descartada do experimento.

Figura 4.2 – Placa de Petri de agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol pós sementeira das diluições das amostras da cavidade oral dos cães – colônias de leveduras



Fonte: O autor.

4.2.1 Manutenção das amostras

As leveduras isoladas permaneceram, durante todo o projeto, armazenadas em tubos contendo agar Sabouraud dextrose com adição de cloranfenicol em temperatura entre -2 e 8 °C, sendo repicadas em intervalos mensais como sugerido por Kurtzman et al. (1998).

Ao final do experimento, as amostras foram mantidas em tubos de ensaio contendo agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e com a superfície colonial submersa em óleo mineral, permanecendo, assim, nas coleções micológicas do Laboratório de Leveduras Patogênicas do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/Controlbio – Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda. – São Paulo/SP, e no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica/RJ.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

4.3.1 Identificação fenotípica das leveduras

Os fungos foram avaliados, inicialmente, quanto as características de crescimento das colônias, como tempo de desenvolvimento, e avaliados quanto à aspectos macromorfológicos como pigmentação, tipos de bordas e superfície, e consistência. Estudos da micromorfologia foram realizados mediante prova de produção de tubo germinativo, produção de clamidoconídios e cápsula (De Hoog et al., 2020). Também foram realizados testes bioquímicos para verificação da produção de urease e cultivo em CHROMagar*Candida*®.

Para confirmação de espécies foram utilizadas as provas de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas (auxanograma) e provas de fermentação de fontes carbonadas (zimograma).

As identificações de leveduras tiveram como base o protocolo de identificação de leveduras do Laboratório de Leveduras Patogênicas do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP e as obras

“The Yeasts, a taxonomic study” (Kurtzman et al., 1998) e “The Yeasts, a taxonomic study” (Kurtzman et al., 2011).

4.3.1.1 Teste de produção de urease

Para o teste de produção da enzima urease utilizou-se o meio de Christensen (Apêndice A), que contém como indicador de pH o vermelho de fenol. O meio foi preparado em placas de Petri (60x15 mm), e então foram inoculadas em seu centro cada uma das amostras (cultivadas previamente por 72 horas), incubando-as a 32 °C com observações diárias por até 7 dias.

As amostras positivas, ao hidrolisarem a ureia, alteraram o pH do meio de cultivo de ácido para alcalino, modificando a coloração do indicador de pH de amarelo para róseo (Kurtzman et al., 2011) (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Placas de Petri com meio de Christensen - pH ácido em amarelo; pH alcalino, em róseo



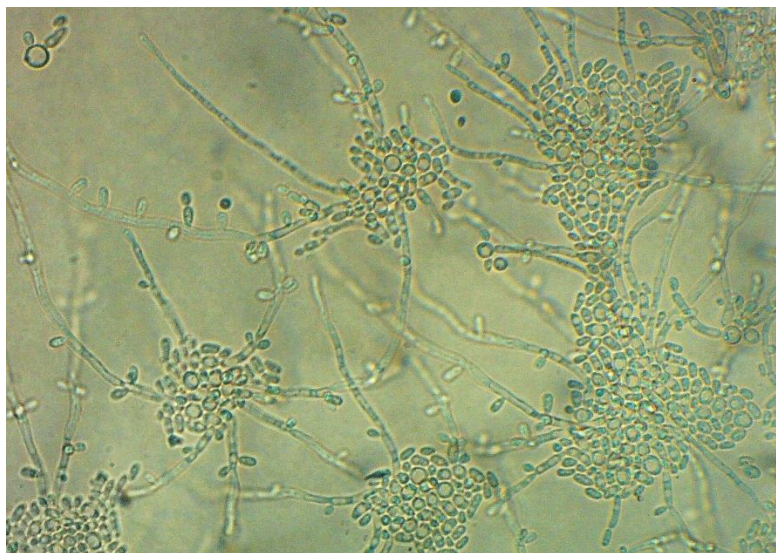
Fonte: O autor.

4.3.1.2 Teste de produção de clamidoconídios

Para verificar a formação de clamidoconídios, executou-se a técnica de microcultivo sob lamínula em substrato pobre nutricionalmente. Para isso, utilizou-se o agar arroz em placas de Petri (60x15 mm) (Apêndice A), sendo adicionado o inóculo (cultivo de 72 horas das leveduras) entre a superfície do meio de cultivo e a lamínula, com incubação a 32 °C por até 5 dias.

Passadas ao menos 24 horas, os cultivos eram analisados ao microscópio em lente de 400x, em busca de estruturas compatíveis a clamidoconídios. Em casos positivos, estava-se, possivelmente, diante das espécies *Candida albicans*, *C. dubliniensis* ou *C. tropicalis*. A presença de estruturas como artroconídios leva-nos à possibilidade dos gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon* (Kurtzman et al., 2011) (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Microscopia de *Candida* spp. após cultivo em agar arroz – produção de clamidoconídios – 400x



Fonte: O autor.

4.3.1.3 Teste para a produção de tubos germinativos

Esta análise auxilia na identificação de leveduras da espécie *Candida albicans*. Este teste foi feito em microtubos tipo Eppendorf® esterilizados contendo 0,5 mL de soro sanguíneo bovino. A suspensão (realizada com cultivos de 72 horas das leveduras) foi incubada, com agitação periódica, a 37 °C durante 3 horas em estufa microbiológica.

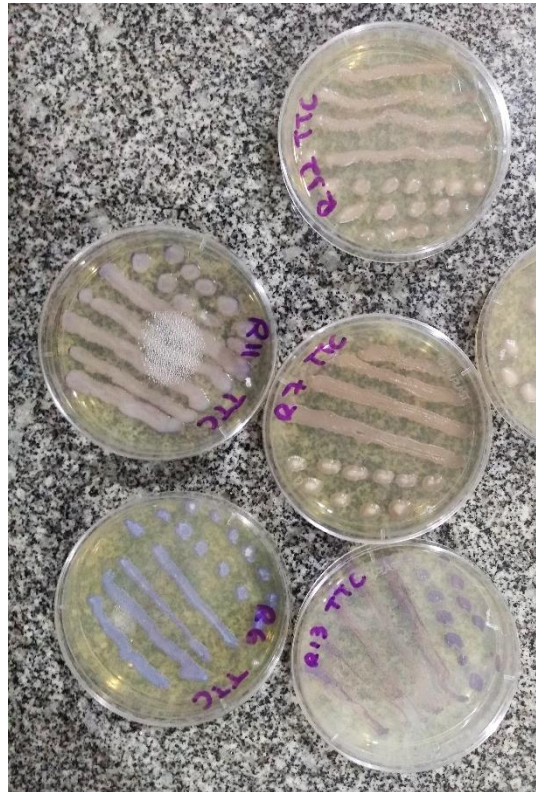
Para visualização microscópica, retira-se uma gota do soro e confecciona-se lâmina acrescida de nigrosina e lamínula para observação ao microscópio em lente de aumento de 1000x. A constatação da capacidade de formação de tubo germinativo indica estarmos diante das espécies *Candida albicans*, ou *Candida dubliniensis* (Kurtzman et al., 2011).

4.3.1.4 Semeadura em CHROMagar®*Candida*

As leveduras foram semeadas em meio diferencial cromogênico (placa de Petri - 60x15 mm) utilizado no auxílio da identificação de espécies do gênero *Candida*. As amostras permaneceram em estufa B.O.D. a 32 °C com leitura diária por até 72 horas após semeadura (Apêndice A).

A interpretação das cores seguiu o proposto por Malik et al. (2018), em que as colônias de *C. albicans* apresentam coloração esverdeada de diferentes tonalidades, as colônias de *C. tropicalis* cor azul, as colônias de *C. glabrata*, malvas, assim como, *C. krusei*, que também apresenta tonalidades escuras de malva (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Placas de Petri com CHROMagar®*Candida* – cores diferentes indicando diferentes espécies do gênero *Candida*



Fonte: O autor.

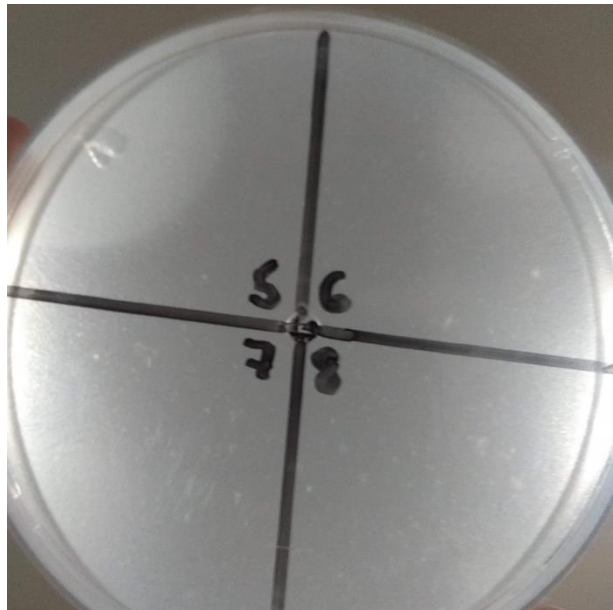
4.3.1.5 Auxanograma

Primeiramente, as suspensões de leveduras foram ajustadas em tubos com solução salina estéril em escala 4 de McFarland. Para avaliação da assimilação de fontes carbonadas utilizou-se os seguintes açúcares: lactose, glicose, sacarose, melebiose, maltose, rafinose, trealose, ramnose, celobiose, galactose, inulina, melezitose, inositol, xilose, eritritol, dulcitol e arabinose.

Ao meio básico isento de fontes carbonadas foram adicionados 2 mL da suspensão de leveduras (placas de Petri - 90x15 mm). Os açúcares foram depositados em pequenas porções em pontos equidistantes da placa de Petri, próximos à parede da mesma, e identificados numericamente (Apêndice A).

As placas permaneceram em estufa B.O.D. a 32 °C e as leituras realizadas a cada 24 horas por até 5 dias. Os testes são considerados positivos quando há o desenvolvimento de colônias na presença de açúcares, caracterizando assimilação da fonte carbonada (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Placas de Petri em teste de auxanograma – crescimento da levedura evidenciado por zonas opacas nas bordas da placa



Fonte: O autor.

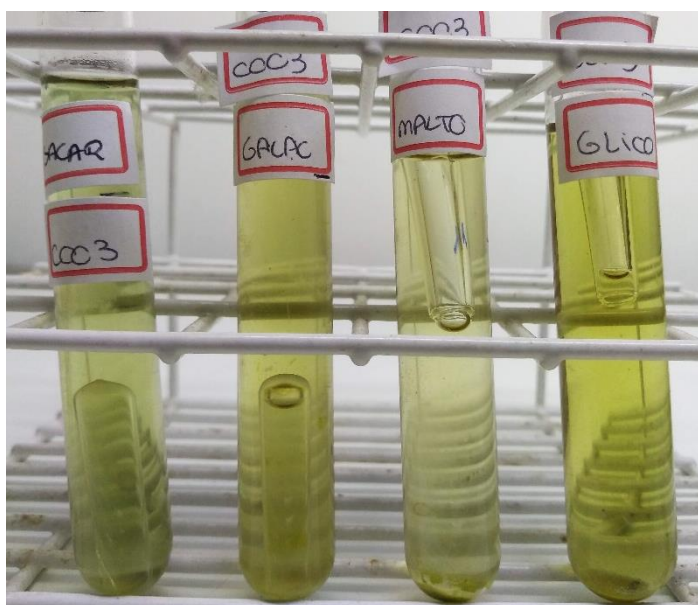
4.3.1.6 Zimograma

Tubos de ensaio receberam meio base para fermentação de açúcares acrescido de azul de bromotimol como indicador de pH, além de um tubo de Durhan invertido, que possui a função de evidenciar a produção de gases fermentativos (Apêndice A).

Já esterilizados, aos tubos (7 tubos por amostra) foram adicionados inóculos com a amostra a ser identificada. Em seguida, cada um dos 7 tubos, componentes da bateria de cada amostra, recebeu uma fonte carbonada diferente, estas previamente esterilizadas por filtração. As baterias permaneceram incubadas a 32 °C por 15 dias.

A evidência de processos fermentativos para espécies do gênero *Candida* levam em consideração a produção de gás apreendida no interior dos tubos de Durham. Para as demais leveduras, também se avaliou a produção de ácidos, verificada pela mudança da coloração do indicador de pH, de verde para o amarelo (Figura 4.7).

Figura 4.7 – Bateria de zimograma - evidência de processos fermentativos leva a produção de gás apreendida no interior dos tubos de Durham - a produção de ácidos é verificada pela mudança da coloração do indicador de pH, de verde para o amarelo



Fonte: O autor.

4.3.2 Identificação proteômica das leveduras

Dentre as 46 leveduras isoladas, 37 foram submetidas a identificação proteômica, através da técnica que utiliza espectrometria de massa, em equipamento de MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) (Bruker Daltonicas®). Esta etapa foi realizada no laboratório Controlbio – Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda. – São Paulo/SP, com o auxílio da Dr^a. Maria José Silveira, que contribuiu com a disponibilização do equipamento MALDI-TOF, espaço físico e outros materiais para a rotina laboratorial.

Para o processo de identificação, foram utilizadas culturas recentes de, no máximo, 24 horas. Para cada isolado adicionou-se 300 µL de água ultrapura estéril em um microtubo (Eppendorff®/1,5 mL) e em seguida 900 µL de etanol. Cada microtubo foi agitado em equipamento do tipo vórtex, e em seguida centrifugado a 18.000 rpm por 2 minutos.

Na próxima etapa, os microtubos permaneceram abertos por 5 minutos, após retirada do sobrenadante, para evaporação de todo etanol. Em seguida acrescentou-se 50 µL de ácido fórmico 70%, sendo necessária a homogeneização desta nova solução. Adicionou-se, então, 50 µL de acetonitrila, e novamente homogeneizou-se o conteúdo do microtubo, que, então foi centrifugado a 18.000 rpm por 2 minutos.

Por fim, 1 µL do sobrenadante foi colocado no “spot” do equipamento de MALDI-TOF. Esperou-se secar e em seguida acrescentou-se 1 µL de solução matriz e deixando-se secar. Após a secagem, o “spot” foi introduzido no equipamento para análise. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com os critérios que o fabricante do equipamento utiliza e fornece em sua base de dados informatizada e atualizada.

4.4 AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA “IN VITRO” DAS LEVEDURAS

4.4.1 Protease

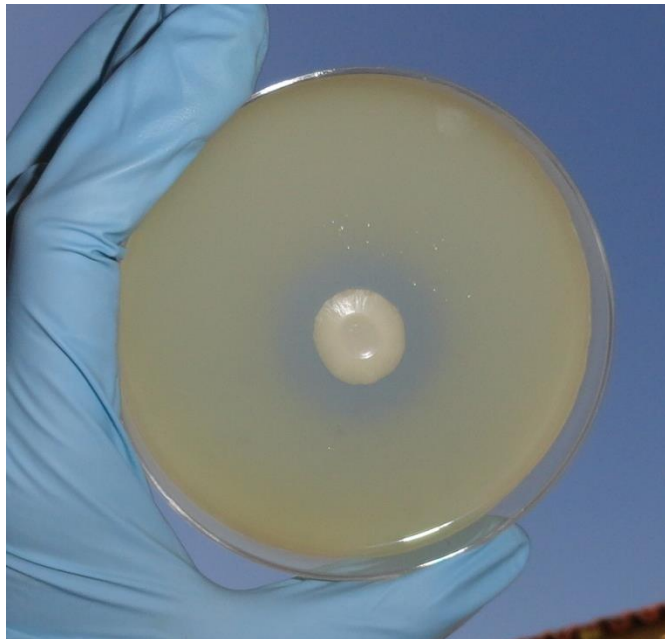
Os fungos foram cultivados por 3 dias em agar Sabouraud dextrose a 37 °C, antes de serem transferidos para as placas de detecção de atividade da protease (Rüchel et al., 1982) (Apêndice A). Três inóculos de 10 µL de diluição da colônia em salina estéril (Escala 4 de McFarland) foram depositados em três pontos distintos da placa de Petri (15x90 mm). As placas permaneceram incubadas a 32 °C por 14 dias (Aoki et al., 1994; Atades et al., 2020).

A produção de protease é caracterizada pela presença de zona clara de degradação proteica ao redor da colônia (Figura 4.8). A atividade enzimática (PzP – “precipitation zone”) dos isolados é determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato. Neste sistema, Pz=1

evidencia que não há produção enzimática. Ou seja, quanto menor for o Pz, maior é a atividade enzimática do fungo (Price et al., 1982; Ishida et al., 2012).

Foi utilizado como cepa padrão a ATCC 90028 – *Candida albicans*. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Figura 4.8 – Placa de Petri contendo agar para produção de protease – halo de degradação ao redor da colônia de *Candida* spp.



Fonte: O autor.

4.4.2 Fosfolipase

Os fungos foram cultivados por 3 dias em agar Sabouraud dextrose a 37 °C, antes de serem transferidos para as placas de detecção de atividade da fosfolipase (Price et al., 1982; Williamson et al., 1986) (Apêndice A). Três inóculos de 10 µL de diluição da colônia em salina estéril (Escala 4 de McFarland) foram depositados em três pontos distintos da placa de Petri (15x90 mm). As placas permaneceram incubadas a 32 °C por 14 dias (Echeverría et al., 2002; Ataidés et al., 2020).

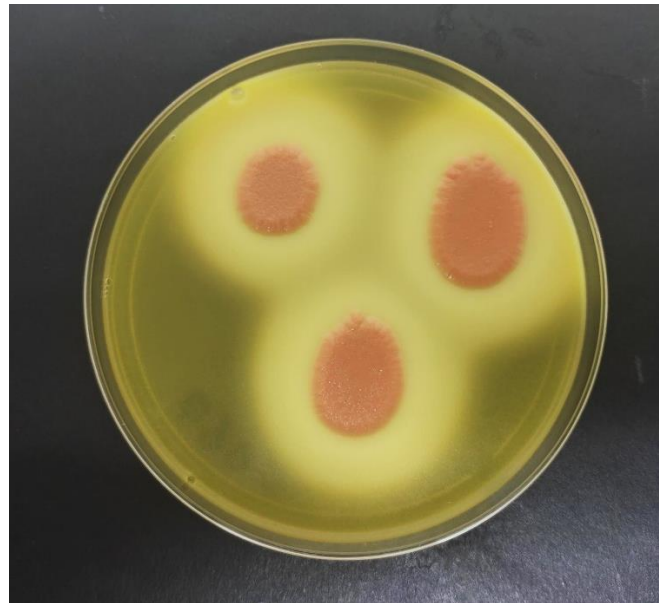
A produção de fosfolipase é caracterizada pela formação de uma zona de precipitação de cloreto de cálcio, opaca, ao redor da colônia. As aferições de

diâmetro da colônia e do halo de precipitação foram realizadas após 14 dias da inoculação inicial (Figura 4.9 e 4.10).

A atividade enzimática (PzF – “precipitation zone”) dos isolados é determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato. Neste sistema, $Pz=1$ evidencia que não há produção enzimática. Ou seja, quanto menor for o Pz, maior é a atividade enzimática do fungo (Price et al., 1982; Ishida et al., 2012).

Foi utilizado como cepa padrão o isolado B59 – *Cryptococcus neoformans* do acervo micológico do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Figura 4.9 – Placa de Petri contendo agar para produção de fosfolipase – halo de degradação ao redor da colônia de *Rhodotorula* spp. (1)



Fonte: O autor.

Figura 4.10 – Placa de Petri contendo agar para produção de fosfolipase – halo de degradação ao redor da colônia de *Rhodotorula* spp. (2)



Fonte: O autor.

4.4.3 DNase

Os fungos foram cultivados por 3 dias em agar Sabouraud dextrose a 37 °C antes de serem transferidos para as placas de detecção de atividade da DNase (Apêndice A). A diluição das leveduras foi preparada em solução salina estéril, atingindo concentração final 4 na escala de McFarland.

A semeadura (10 µL da diluição da colônia) ocorreu em três pontos distintos da placa de Petri (90x15 mm) contendo agar para teste de DNase (pH 7,3). As placas permaneceram incubadas a 32 °C por 14 dias. O teste foi considerado positivo quando, após a adição de solução 5 N HCl, houve presença de zona clara de degradação proteica ao redor da colônia (Riceto et al., 2015).

A atividade enzimática (PzD) dos isolados é determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato (Figura 4.11). Neste sistema, Pz=1 evidencia que não há produção enzimática. Ou seja, quanto menor for o Pz, maior é a atividade enzimática do fungo (Price et al., 1982; Ishida et al., 2012). Utilizou-se como cepa padrão um isolado de *Staphylococcus aureus*. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Figura 4.11 – Placa de Petri contendo agar para produção de DNase – halo de degradação ao redor da colônia de *Candida* spp.



Fonte: O autor.

4.4.4 Atividade hemolítica

Para a avaliação da atividade hemolítica das leveduras, foi utilizada a técnica proposta por Ataidés et al. (2020). Inicialmente, as colônias foram cultivadas por 3 dias em agar Sabouraud dextrose a 37 °C.

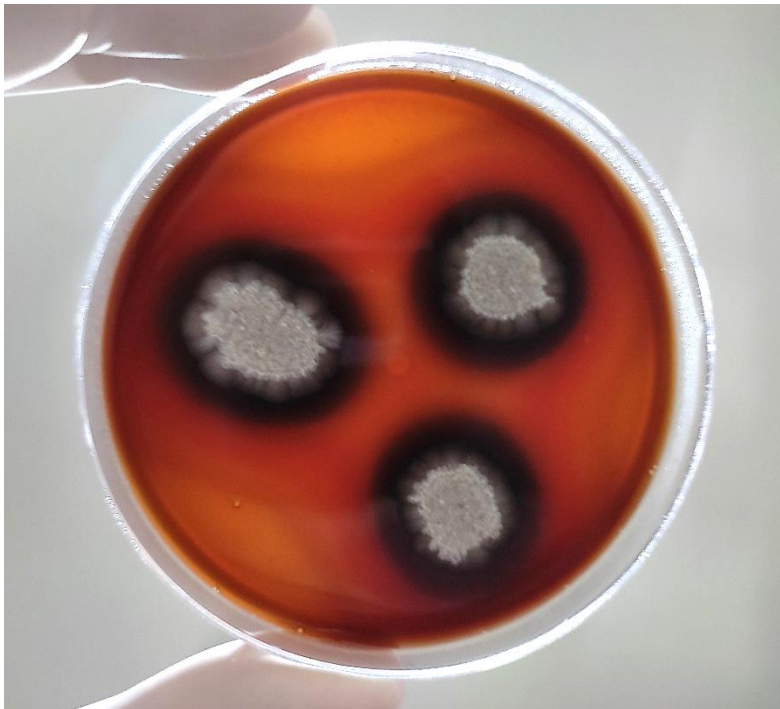
Um inóculo de 10 µL de diluição da colônia em salina estéril (escala 4 de McFarland) foi depositado em três pontos distintos da placa de Petri (15x90 mm - agar Sabouraud dextrose 3%, acrescido de 7% de sangue de carneiro) (Apêndice A). As placas permaneceram incubadas a 37 °C por 48 horas.

Após este período de incubação, a presença de um halo claro ao redor dos inóculos indicaram atividade hemolítica positiva (Figura 4.12 e 4.13). O diâmetro das colônias e as zonas de hemólise foram medidos, obtendo-se a taxa de hemólise. A atividade enzimática (PzH) dos isolados é determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato. Neste sistema, Pz=1 evidencia que não há produção enzimática. Ou seja, quanto menor for o Pz, maior é

a atividade enzimática do fungo (Price et al., 1982; Linares et al., 2007; Ishida et al., 2012).

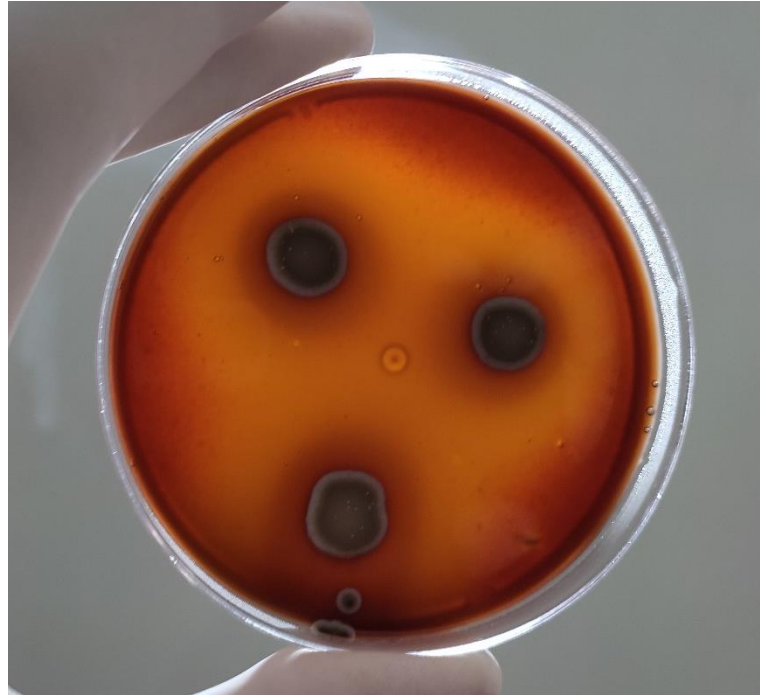
Utilizou-se como cepa padrão um isolado de *Staphylococcus aureus*. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

Figura 4.12 – Placa de Petri de agar Sabouraud contendo 7 % de sangue de carneiro para teste de produção de hemolisinas – *Candida* spp.



Fonte: O autor.

Figura 4.13 – Placa de Petri de agar Sabouraud contendo 7 % de sangue de carneiro para teste de produção de hemolisinas – *Malassezia* spp.



Fonte: O autor.

4.4.5 Interpretação da atividade enzimática

A atividade enzimática determinada (Pz) dos isolados é determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato. Neste sistema, $Pz=1$ evidencia que não há produção enzimática. Ou seja, quanto menor for o Pz, maior é a atividade enzimática do fungo. Os valores encontrados indicam classificação da produção enzimática em: alta, moderada, baixa ou negativa (Tabela 4.1) (Price et al., 1982; Linares et al., 2007; Ishida et al., 2012).

Tabela 4.1 – Classificação da produção enzimática de acordo com Price et al. (1982) e adaptada por Ishida et al. (2012)

Pz	Atividade enzimática
= 1	Negativa
0,999 ≥ 0,700	Baixa
0,699 ≥ 0,400	Moderada
0,399 ≥ 0,100	Alta

Fonte: Ishida et al. (2012)

4.5 TESTES DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

4.5.1 Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer)

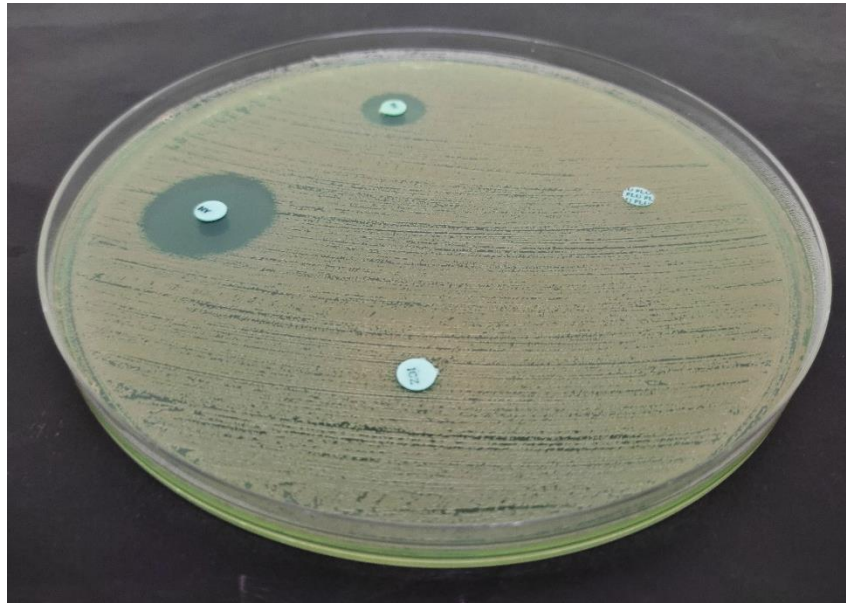
Primeiramente, colônias das leveduras em cultivo por 24 horas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina, ajustando-se a turbidez da solução para a escala 0,5 de McFarland.

A solução foi estriada, por toda a superfície, com “swab” seco estéril em placa de Petri (140x15 mm) contendo agar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 µL de azul de metileno, sendo deixadas em repouso por 15 minutos antes do depósito dos discos (Apêndice A).

Então, foram depositados os discos contendo os antifúngicos (itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B - Cecon®). As placas permaneceram incubadas a 37 °C por 24 horas (Figura 4.14, 4.15 e 4.16).

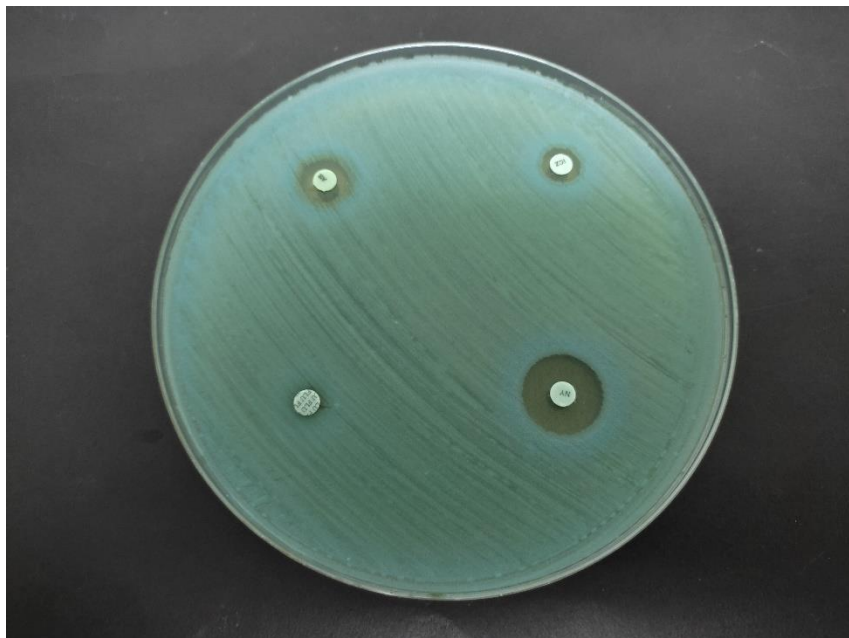
Os testes foram efetuados e interpretados de acordo com dados e valores fornecidos pelos documentos M44-A2 (2009), M44-S3 (2009), M60-S1 (2017) e M44-3ed (2018), presentes no CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”), órgão que padroniza os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, e pelos dados disponíveis na bula dos discos de antifúngicos (Cecon®).

Figura 4.14 – Placa de Petri com teste de Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer) – *Rhodotorula* spp. resistente aos azóis



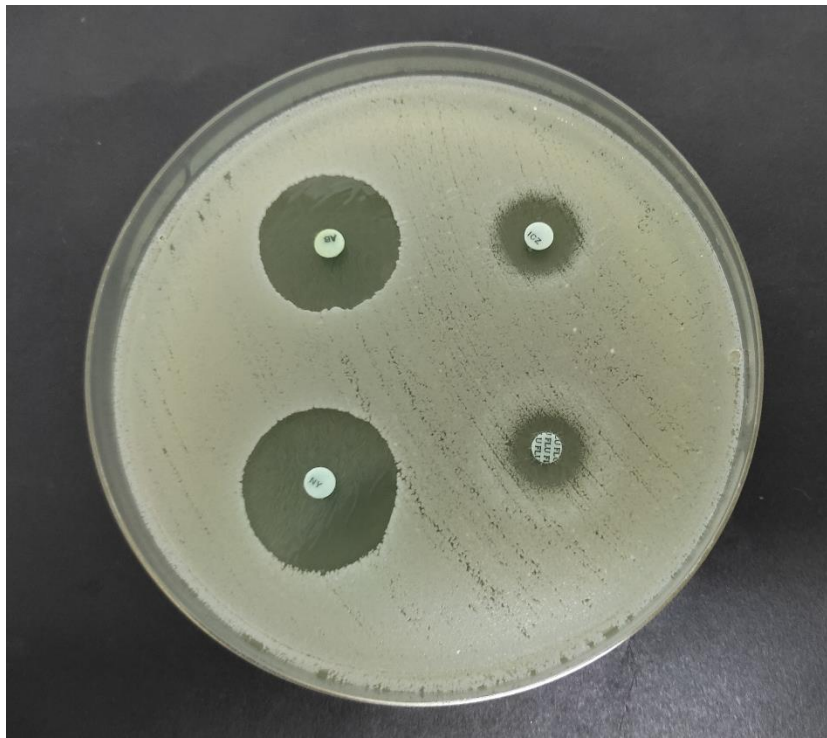
Fonte: O autor.

Figura 4.15 – Placa de Petri com teste de Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer) – *Candida* spp. resistente aos azóis



Fonte: O autor.

Figura 4.16 – Placa de Petri com teste de Disco-difusão em agar (Kirby-Bauer) – *Candida* spp. sensível aos azóis e poliênicos



Fonte: O autor.

4.5.2 Microdiluição em caldo

Para os testes de susceptibilidade utilizando-se microdiluição, seguiu-se o documento M27-A3 (CLSI, 2008) proposto pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” com modificações, como no caso dos testes feitos com a nistatina.

O meio líquido base utilizado foi o “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI) - 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com vermelho de fenol como indicador de pH. A esterilização do meio se deu por filtração em membranas de 0,22 μm , utilizando pressão positiva.

As soluções dos antifúngicos (itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B), foram preparadas utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente. Diluições dos antifúngicos em meio líquido RPMI 1640 tamponado foram preparadas para atingir uma concentração duas vezes a necessária para o teste de microdiluição em

caldo. A partir destas, então, realizou-se diluições seriadas nas placas contendo os micropoços (Figura 4.17 e 4.18).

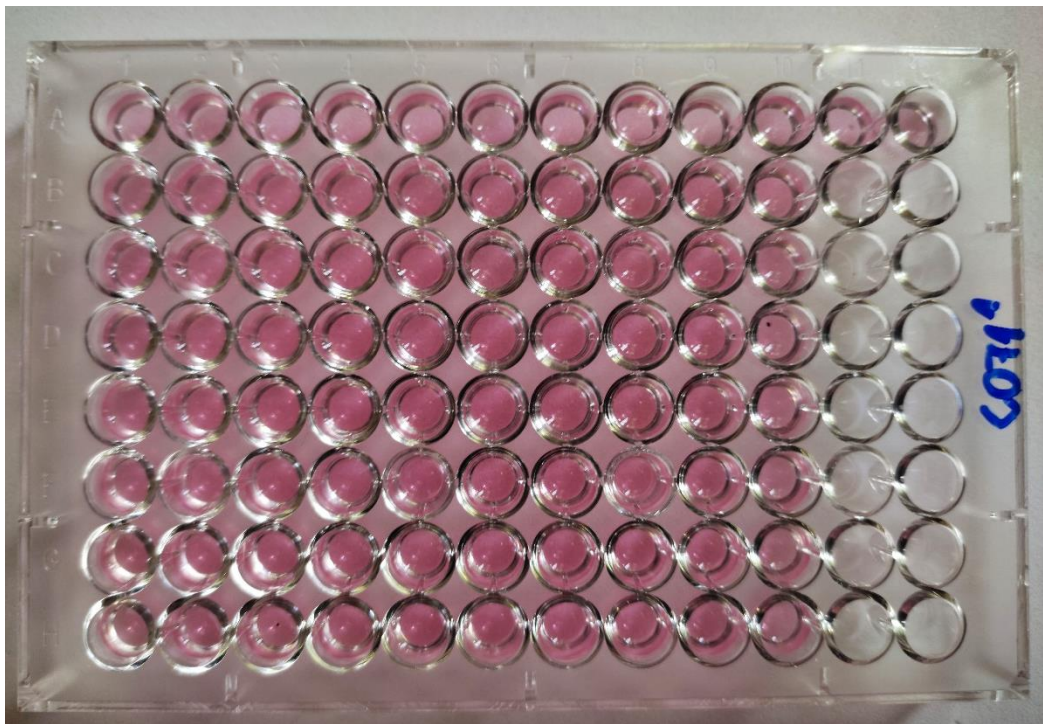
Concentrações nos micropoços para testes dos antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$):

- Itraconazol – 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625
- Fluconazol – 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125
- Nistatina – 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125
- Anfotericina B – 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625

Foram utilizadas suspensões padronizadas a 0,5 da escala de Mc Farland das leveduras isoladas como inóculo nos poços contendo os antifúngicos. Todos os testes foram feitos em duplicata.

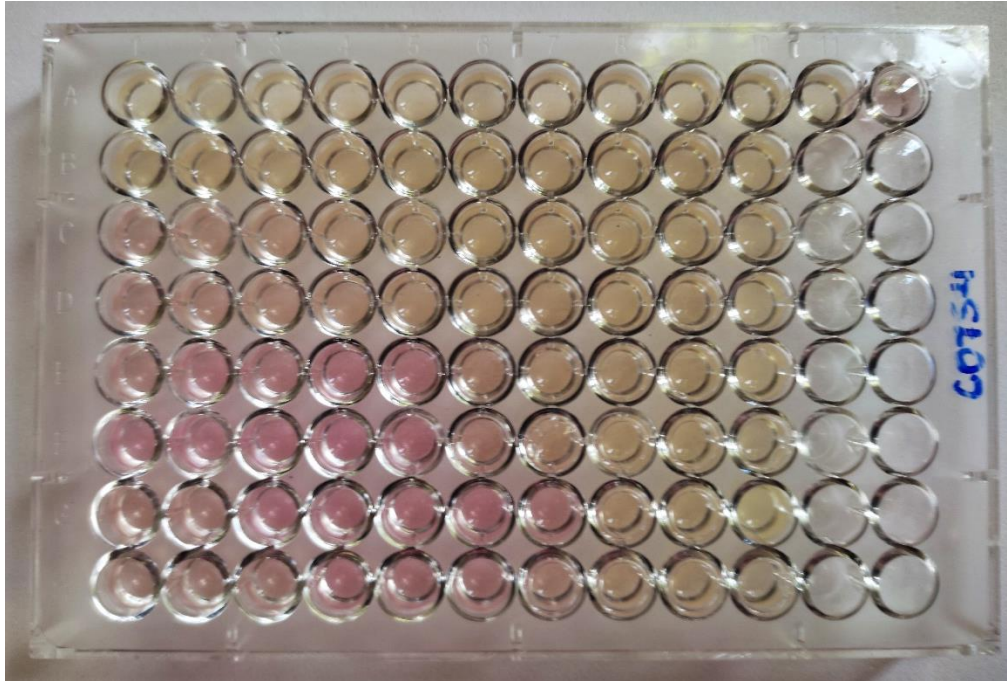
As microplacas permaneceram incubadas em estufa com circulação de ar a 37 °C e a leitura foi realizada após 24 horas de incubação. A concentração inibitória mínima foi determinada visualmente (com auxílio de lupa) como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento fúngico (Figuras 4.19 e 4.20).

Figura 4.17 – Placa de 96 micropoços contendo amostra em duplicata da levedura submetida ao teste de susceptibilidade ao itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B – pré-incubação



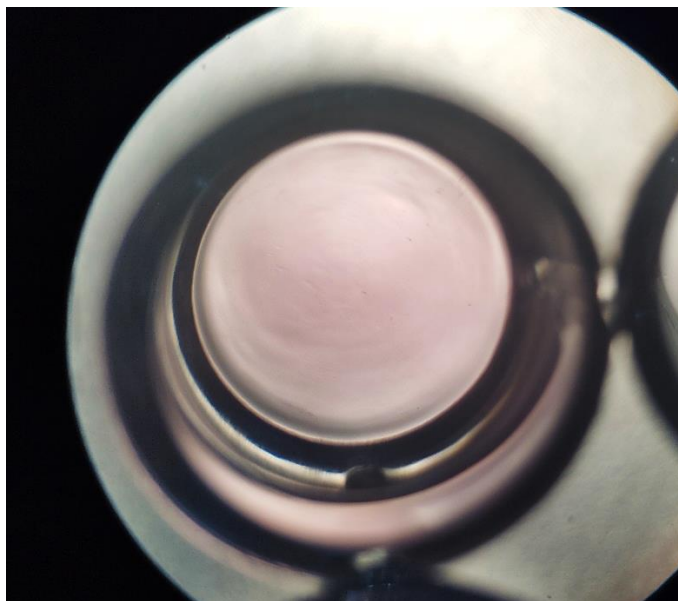
Fonte: O autor.

Figura 4.18 – Placa de 96 micropoços contendo amostra em duplicata da levedura submetida ao teste de susceptibilidade ao itraconazol, fluconazol, nistatina e anfotericina B – pós-incubação (coloração amarela indica o crescimento fúngico)



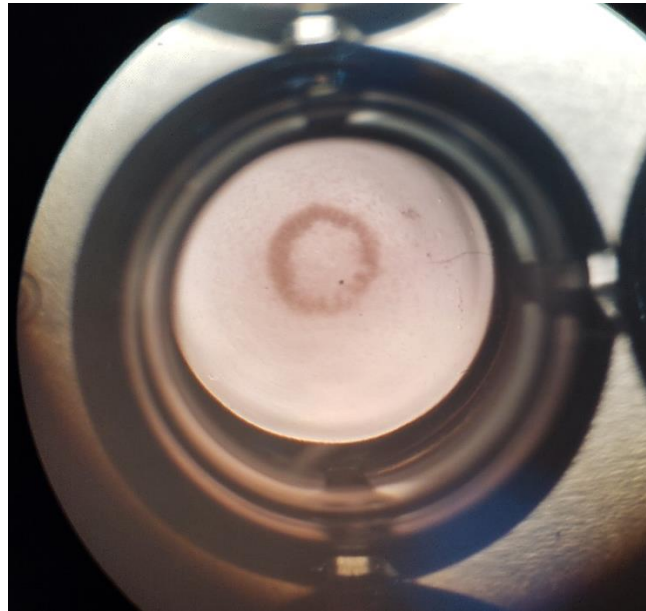
Fonte: O autor.

Figura 4.19 – Micropoço visualizado à lupa de aumento pós-incubação – inibição total do crescimento fúngico



Fonte: O autor.

Figura 4.20 – Micropoço visualizado à lupa de aumento pós-incubação – evidência de crescimento fúngico



Fonte: O autor.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística sobre a comparação das identificações das leveduras pelos testes fenotípicos e proteômico, bem como para análise da produção de fatores de virulência, foram utilizadas análises descritivas simples, como frequências em números inteiros e porcentagens.

Para a análise comparativa entre os métodos de susceptibilidade aos antifúngicos de disco-difusão em agar e microdiluição em caldo, diante das frequências dos atributos das variáveis qualitativas estudadas, procedeu-se à confecção de tabelas de contingência, nas quais foram aplicadas o teste G com o objetivo de verificar uma possível associação significativa entre os fatores, ao nível de significância de 5%. Para as tabelas que apresentaram associação significativa, procedeu-se à análise de resíduos em tabelas L x C para avaliar em quais células da tabela de contingência verificou-se um aumento ou redução significativa da frequência obtida (Ayres et al., 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se um total de 46 isolados de leveduras dentre os 38 cães utilizados para a pesquisa. Os resultados com a identificação fenotípica de todos os isolados, que foi a utilizada como critério de classificação neste trabalho, e a classificação proteômica de 37 dos isolados, estão na Tabela 5.1.

Nota-se que apenas 11 (29,72 %) dos 37 isolados comparados obtiveram correspondência positiva entre identificação fenotípica e proteômica (linhas amarelas – Tabela 5.1), sendo que, diante de características macroscópicas de colônias, ou pela microscopia, principalmente em casos de *Geotrichum* spp. e *Rhodotorula* sp., ficou evidente possível baixa eficiência na identificação proteômica, o que reforçou a escolha do método fenotípico de identificação para classificar os isolados deste estudo.

Os métodos de identificação fenotípicos ainda são bastante utilizados na rotina micológica e diante de alguns gêneros como *Rhodotorula* (aspecto colonial marcante e característico), *Malassezia* (colônia e microscopia bem definidas) e *Geotrichum* (microscopia característica do gênero), garantem segurança nesta classificação, embora a mesma seja laboriosa para nível de espécie, como demonstrado por pesquisa de Lara et al. (2021), onde encontraram forte correspondência entre a identificação fenotípica, genotípica e proteômica de *Trichosporon* spp.

Já para a identificação de espécies do gênero *Candida*, os testes fenotípicos são mais acessíveis e com interpretações bem definidas, embora possam demandar mais tempo para preparo de materiais e baterias de identificação, como no caso de auxanogramas e zimogramas. A identificação de *Candida albicans* mostra-se uma das mais exatas ao método fenotípico, visto que características como produção de clamidoconídios, tubo germinativo e coloração esverdeada quando cultivada em meio CHROMagar[®]*Candida*, são de fácil reprodução no laboratório, o que foi corroborado pelo trabalho de van Thiel et al. (2022), onde embora algumas características, como formação de hifas e pseudo-hifas, puderam variar em cepas distintas de *Candida albicans*, outros testes fenotípicos levaram a confirmação desta espécie, com posterior identificação por sequenciamento genético, consagrando a exatidão do método fenotípico.

Tabela 5.1 - Classificação fenotípica das 46 leveduras isoladas da cavidade oral de cães; classificação proteômica de 37 leveduras isoladas da cavidade oral de cães; em amarelo, estão os isolados com classificações fenotípica e proteômica positivamente correspondentes

Levedura	Identificação Fenotípica	Identificação Proteômica
1	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
2	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
3	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
4	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
6	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans (africana)</i>
7	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Candida parapsilosis</i>
8	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	<i>Candida parapsilosis</i>
10	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
11	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
12	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
13	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
15	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
16	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
17	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
18	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	Não identificado
20	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>
21	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>
22	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
23	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Diutina catenulata</i>
24	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Diutina rugosa</i>
25	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>
26	<i>Candida famata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
27	<i>Candida famata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
28	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Candida tropicalis</i>
29	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
30	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
31	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida metapsilosis</i>
32	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Candida metapsilosis</i>
33	<i>Geotrichum</i> spp.	Não identificado
34	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	<i>Cytobasidium minutum</i>
36	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Candida albicans</i>
37	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>Candida albicans</i>
38	<i>Malassezia</i> spp.	
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	
40	<i>Malassezia</i> spp.	
41	<i>Malassezia</i> spp.	

42	<i>Rhodotorula</i> spp.
43	<i>Rhodotorula</i> spp.
44	<i>Rhodotorula</i> spp.
45	<i>Rhodotorula</i> spp.
46	<i>Rhodotorula</i> spp.

Fonte: O autor.

Dentre as leveduras obtidas, as do gênero *Candida* foram prevalentes, seguidas por isolados de *Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp. e *Malassezia* spp., como detalhado na Tabela 5.2. Desta forma, diante de microrganismos de características macromorfológicas e microscópicas marcantes, bem como facilmente identificados por testes bioquímicos manuais, a identificação fenotípica mostra-se ferramenta útil e confiável para caracterização da microbiota oral de cães, levando em consideração a prevalência destes gêneros dentro da população total de microrganismos cultiváveis.

A método de identificação proteômico surge como grande ferramenta no auxílio da identificação de microrganismos, porém o alto custo de aquisição do equipamento MALDI-TOF, é o primeiro empecilho ao seu uso, sendo restrito a grandes laboratórios e instituições de ensino e pesquisa. A grande vantagem do método se dá pela praticidade e rapidez na identificação pós isolamento inicial da levedura, como descrito por Cassagne et al. (2016), mas trabalhos relacionados a esta técnica de identificação colocam em suspeita sua exatidão para alguns grupos de microrganismos, como fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, por exemplo, como em trabalho de Sanguinetti e Posteraro (2014), que questionam a real eficácia deste método para detecção deste gênero. Ressaltam que o banco de dados do MALDI-TOF para a identificação destes fungos filamentosos ainda necessita de atualizações para que possa ser de grande valia ao laboratório clínico.

Por outro lado, a identificação de leveduras, como do gênero *Candida*, tem se mostrado satisfatória e ótima aliada ao laboratório clínico. Neste trabalho, 9 dos 11 isolados correspondentes a nível de espécie entre identificação fenotípica e proteômica, pertencem ao gênero *Candida*, corroborando com a hipótese de boa performance do equipamento MALDI-TOF frente a este gênero. Assim, a metodologia proteômica mostra-se ferramenta promissora no auxílio a caracterização de leveduras da cavidade oral de cães, visto que a prevalência

dentro desta microbiota é composta por fungos do gênero *Candida*, como mostrado em pesquisa de Frias et al. (2018) que avaliaram a microbiota oral de 80 cães hígidos.

Dentre as 37 leveduras testadas proteomicamente, 27 foram identificadas como do gênero *Candida*, sendo 21 corroborantes com o achado fenotípico, sem levar em consideração a espécie detectada, exacerbando a hipótese de boa performance na identificação destes microrganismos. Putignani et al. (2011) detectaram correspondência entre 257 de um total de 303 isolados de *Candida* identificados por técnica fenotípica (VITEK®) e MALDI-TOF, ressaltando, como neste estudo, a técnica proteômica como ferramenta confiável para caracterização deste gênero.

Alguns pontos que poderiam ter afetado a eficiência da identificação proteômica nesta pesquisa, refere-se a real pureza das amostras. Diante de mecanismos de funcionamento tão sensíveis do equipamento, o mínimo grau de impureza da colônia poderia levar a falhas na correta identificação do microrganismo. Outro ponto, é a atualização do banco de dados do equipamento, que poderia não conter chaves para a detecção de certas leveduras.

Mesmo os achados incompatíveis com a macromorfologia e micromorfologia das colônias (exemplo: fenotípico = *Geotrichum* spp./proteômico = *Candida metapsilosis*), remeteram ao gênero *Candida*, mais uma vez evidenciando a tendência do equipamento MALDI-TOF em relacionar os isolados ao gênero *Candida*, possivelmente pela riqueza do banco de dados do mesmo para esses microrganismos frente aos outros gêneros leveduriformes.

Tabela 5.2 - Distribuição por gêneros identificados por técnica fenotípica e pela técnica proteômica leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação	
	Fenotípica	Proteômica
<i>Candida</i> spp.	23	27
<i>Geotrichum</i> spp.	9	0
<i>Malassezia</i> spp.	3	0
<i>Rhodotorula</i> spp.	11	2
<i>Cytobasidium</i> spp.	0	1
<i>Diutina</i> spp.	0	2
<i>Meyerozyma</i> spp.	0	1
<i>Pichia</i> spp.	0	1
<i>Torulaspota</i> spp.	0	1
Não indentificado	0	2
TOTAL	46	37

Fonte: O autor.

A produção de enzimas atuantes como fatores de virulência mostrou-se bastante variável entre os gêneros analisados e entre os microrganismos de cada gênero. Porém, algumas tendências no comportamento de produção destas enzimas puderam ser observados.

A tabela 5.3 mostra detalhadamente a produção Pz de protease dos isolados da cavidade oral dos cães, enquanto a tabela 5.4 mostra a classificação da capacidade produtiva de cada gênero separadamente.

Tabela 5.3 - Produção de protease por leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Levedura	Identificação Fenotípica	PzP	Classificação
1	<i>Candida krusei</i>	0,23	Alta
2	<i>Candida glabrata</i>	0,35	Alta
3	<i>Candida albicans</i>	0,78	Baixa
4	<i>Candida krusei</i>	0,52	Moderada
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
6	<i>Candida albicans</i>	0,78	Baixa
7	<i>Geotrichum</i> spp.	0,28	Alta
8	<i>Candida krusei</i>	0,23	Alta
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,41	Moderada
10	<i>Candida krusei</i>	0,72	Baixa

11	<i>Candida lusitaniae</i>	0,44	Moderada
12	<i>Candida lusitaniae</i>	0,53	Moderada
13	<i>Candida albicans</i>	0,39	Alta
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,24	Alta
15	<i>Candida glabrata</i>	0,16	Alta
16	<i>Candida glabrata</i>	0,4	Moderada
17	<i>Candida glabrata</i>	0,16	Alta
18	<i>Candida albicans</i>	0,37	Alta
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,85	Baixa
20	<i>Candida tropicalis</i>	0,34	Alta
21	<i>Candida tropicalis</i>	0,46	Moderada
22	<i>Candida albicans</i>	0,6	Moderada
23	<i>Geotrichum</i> spp.	0,48	Moderada
24	<i>Geotrichum</i> spp.	0,17	Alta
25	<i>Candida lusitaniae</i>	0,44	Moderada
26	<i>Candida famata</i>	0,41	Moderada
27	<i>Candida famata</i>	0,54	Moderada
28	<i>Geotrichum</i> spp.	0,89	Baixa
29	<i>Geotrichum</i> spp.	0,33	Alta
30	<i>Candida lusitaniae</i>	0,29	Alta
31	<i>Candida glabrata</i>	0,32	Alta
32	<i>Geotrichum</i> spp.	0,34	Alta
33	<i>Geotrichum</i> spp.	0,13	Alta
34	<i>Candida tropicalis</i>	0,38	Alta
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
36	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
37	<i>Geotrichum</i> spp.	0,34	Alta
38	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
40	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa
41	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa

Fonte: O autor.

Nota-se a grande capacidade dos gêneros *Candida* e *Geotrichum* em serem potentes produtores de protease quando comparados aos gêneros *Malassezia* e *Rhodotorula*. A produção “in vitro” desses fatores de virulência, não necessariamente afirmam que estas leveduras possam estar atuando como potentes

patógenos para os animais ou pessoas, o que é refletido pelo grande número de isolados de *Candida* classificados como de alta ou moderada capacidade de produção, enquanto os isolados de *Malassezia* não foram produtores da enzima.

Malassezia spp. são importantes patógenos em medicina veterinária, principalmente em cães, e também em pessoas, e possivelmente tem a produção ativa de protease durante quadros infecciosos. Noor e Alsudani (2020) detectaram alta produção de protease por isolados de *Malassezia pachydermatis* e *M. furfur*, importantes patógenos em cães e pessoas, respectivamente, indo em desconformidade aos nossos dados, o que ressalta a grande variabilidade nos achados “in vitro” para esta enzima neste gênero.

Já a *Candida*, um comensal oportunista por excelência, mesmo isolada de animais aparentemente sem enfermidades relacionadas as mesmas, mostra potente produção em diferentes situações, como de um simples saprófita, ou de potente agente infeccioso. Assim, a atividade “in vitro” desses fatores de virulência atua como importante instrumento para entender as possíveis ferramentas que estes microrganismos podem utilizar em processos infecciosos, não sendo como uma ferramenta indicativa de infecção ativa no paciente da qual foram isolados.

Abbas et al. (2021) impediram a produção de protease com a utilização de domperidona e candesartana como método alternativo aos antifúngicos convencionais para o tratamento de micoses por *Candida*, o que corrobora para fato desta enzima ser fator primordial para o estabelecimento de infecções deste gênero, sendo alvo de estudo de diversos grupos de pesquisadores.

Os gêneros *Geotrichum* e *Rhodotorula* são raramente relacionados a infecções em mamíferos, embora, neste trabalho, *Geotrichum* tenha mostrado seu alto potencial em produzir protease, ressaltando a importância em relacionar seu nome em diagnósticos diferenciais de micoses relacionadas a cavidade oral, visto a prevalência por *Candida* e *Malassezia* em infecções neste sítio.

Rhodotorula tem sido descrita como patógeno emergente em medicina veterinária, como em caso de infecção respiratória em cão descrito por Bieganska et al. (2018) e dermatite fúngica em cão relatado por Rosa et al. (2018). Assim, diante do alto número de isolados de *Rhodotorula* da cavidade oral dos cães desta pesquisa, mesmo diante do baixo potencial em produzir fatores de virulência “in vitro”, a boca dos cães mostra-se importante fonte de disseminação deste microrganismo.

Tabela 5.4 - Classificação da intensidade de produção de protease por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Produção de protease	<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Rhodotorula</i>
Alta	11	6	0	1
Moderada	9	1	0	1
Baixa	3	1	0	1
Negativa	0	1	3	8

Fonte: O autor.

O detalhamento da atividade da fosfolipase dos isolados da cavidade oral de cães está na Tabela 5.5. Este é a enzima mais estudada e entendida como fator de virulência de leveduras, principalmente *Candida* e *Malassezia*. Diante da composição fosfolipídica da membrana celular, sua produção em grande escala seria de grande importância para o estabelecimento de micoses.

Candido et al. (2000) detectaram a produção de fosfolipase em isolados de *Candida* da boca de pessoas com, e sem lesões bucais, destacando que a espécie maior produtora é a *Candida albicans*, enquanto espécies como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* não foram produtoras. Porém, os isolados deste trabalho não mostraram ser potentes produtores “in vitro” deste fator, levantando a hipótese de que esta enzima possa necessitar de substratos, ou ambiente específicos, como a superfície corpórea de um paciente imunossuprimido para expressar sua máxima produção.

Tabela 5.5 - Produção de fosfolipase por leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Levedura	Identificação Fenotípica	PzF	Classificação
1	<i>Candida krusei</i>	1	Negativa
2	<i>Candida glabrata</i>	0,74	Baixa
3	<i>Candida albicans</i>	0,88	Baixa
4	<i>Candida krusei</i>	1	Negativa
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,49	Moderada
6	<i>Candida albicans</i>	0,78	Baixa
7	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
8	<i>Candida krusei</i>	1	Negativa
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,55	Moderada
10	<i>Candida krusei</i>	1	Negativa
11	<i>Candida lusitaniae</i>	1	Negativa
12	<i>Candida lusitaniae</i>	0,91	Baixa
13	<i>Candida albicans</i>	0,77	Baixa
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,51	Moderada
15	<i>Candida glabrata</i>	0,75	Baixa
16	<i>Candida glabrata</i>	0,55	Moderada
17	<i>Candida glabrata</i>	0,44	Moderada
18	<i>Candida albicans</i>	0,71	Baixa
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,52	Moderada
20	<i>Candida tropicalis</i>	0,76	Baixa
21	<i>Candida tropicalis</i>	0,73	Baixa
22	<i>Candida albicans</i>	0,62	Moderada
23	<i>Geotrichum</i> spp.	0,56	Moderada
24	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
25	<i>Candida lusitaniae</i>	0,52	Moderada
26	<i>Candida famata</i>	1	Negativa
27	<i>Candida famata</i>	0,74	Baixa
28	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
29	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
30	<i>Candida lusitaniae</i>	0,88	Baixa
31	<i>Candida glabrata</i>	1	Negativa
32	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
33	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
34	<i>Candida tropicalis</i>	1	Negativa
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,75	Baixa
36	<i>Geotrichum</i> spp.	0,86	Baixa
37	<i>Geotrichum</i> spp.	1	Negativa
38	<i>Malassezia</i> spp.	0,75	Baixa
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,52	Moderada
40	<i>Malassezia</i> spp.	0,85	Baixa
41	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,4	Moderada
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,45	Moderada

44	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,46	Moderada
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,83	Baixa
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,68	Moderada

Fonte: O autor.

A Tabela 5.6 torna mais nítido que nenhum dos gêneros demonstrou ser forte produtor de fosfolipase “in vitro”, o que corrobora com a hipótese de altos níveis serem produzidos mais facilmente em condições específicas nos hospedeiros. Em estudo comparativo entre *C. albicans* e outras espécies de *Candida* isoladas da boca de pessoas, Andreola et al. (2016) encontram diferença significativa na produção da fosfolipase entre os dois grupos, tendo a *C. albicans* produção consideravelmente superior frente ao grupo de espécies não-*albicans*.

Diante dos isolados de *C. albicans* obtidos da boca dos cães desta pesquisa, este sítio pode atuar como potente disseminador deste fungo para outros animais e mesmo para pessoas, como em acidentes por mordeduras, ou mesmo por simples lambeduras dos animais de estimação. Além disso, a produção de fosfolipase demonstrada nos testes indica seu potencial em estabelecer um processo infeccioso invasivo.

Tabela 5.6 - Classificação da intensidade de produção de fosfolipase por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Produção de fosfolipase	<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Rhodotorula</i>
Alta	0	0	0	0
Moderada	4	1	0	9
Baixa	11	1	2	2
Negativa	8	7	1	0

Fonte: O autor.

A DNase (Tabela 5.7) dentre os fatores de virulência em leveduras, ainda é o menos estudado e de ação pouco elucidada. Sua ação clivando ligações fosfodiester do DNA pode influenciar drasticamente na imunossupressão do hospedeiro, ação bem descrita pela produção por bactérias, como em trabalho de Zang et al. (2022), em que detectaram a ação específica da DNase de *Mycobacterium avium* no ataque aos neutrófilos do hospedeiro. Trabalhos recentes em micologia têm demonstrado a ação de proteases semelhantes a DNase na destruição de armadilhas extracelulares de neutrófilos, permitindo a fuga de células de *Paracoccidioides brasiliensis*, por exemplo, como em estudo de Zonta et al. (2021). Assim, ressalta-se a importância de melhor caracterização deste fator de virulência das leveduras.

Todos os 46 isolados (Tabela 5.8) mostraram-se ser potenciais produtores desta enzima “in vitro”. O gênero *Candida* ganha destaque, visto que 20 isolados foram classificados como sendo de alta produção da DNase, o que diante do caráter oportunista e do grande número de afecções bucais geradas por este microrganismo, é de se supor o caráter essencial da DNase na invasão tecidual por leveduras de *Candida*. Zhang et al. (2017) corroboram com esta hipótese em estudo que demonstra a alta capacidade de isolados de *Candida albicans* produtores de DNase em destruir armadilhas extracelulares de neutrófilos. Porém, testes “in vivo”, ou modelos que mimetizam a colonização fúngica, poderiam evidenciar melhor o papel e mecanismo de ação deste fator de virulência.

Tabela 5.7 - Produção de DNase por leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação Fenotípica	PzD	Classificação
1	<i>Candida krusei</i>	0,29	Alta
2	<i>Candida glabrata</i>	0,38	Alta
3	<i>Candida albicans</i>	0,29	Alta
4	<i>Candida krusei</i>	0,13	Alta
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,27	Alta
6	<i>Candida albicans</i>	0,32	Alta
7	<i>Geotrichum</i> spp.	0,32	Alta
8	<i>Candida krusei</i>	0,13	Alta
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,2	Alta
10	<i>Candida krusei</i>	0,15	Alta
11	<i>Candida lusitaniae</i>	0,12	Alta
12	<i>Candida lusitaniae</i>	0,18	Alta
13	<i>Candida albicans</i>	0,19	Alta

14	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,27	Alta
15	<i>Candida glabrata</i>	0,39	Alta
16	<i>Candida glabrata</i>	0,34	Alta
17	<i>Candida glabrata</i>	0,31	Alta
18	<i>Candida albicans</i>	0,17	Alta
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,29	Alta
20	<i>Candida tropicalis</i>	0,21	Alta
21	<i>Candida tropicalis</i>	0,34	Alta
22	<i>Candida albicans</i>	0,39	Alta
23	<i>Geotrichum</i> spp.	0,44	Moderada
24	<i>Geotrichum</i> spp.	0,3	Alta
25	<i>Candida lusitaniae</i>	0,54	Moderada
26	<i>Candida famata</i>	0,13	Alta
27	<i>Candida famata</i>	0,19	Alta
28	<i>Geotrichum</i> spp.	0,32	Alta
29	<i>Geotrichum</i> spp.	0,19	Alta
30	<i>Candida lusitaniae</i>	0,37	Alta
31	<i>Candida glabrata</i>	0,4	Moderada
32	<i>Geotrichum</i> spp.	0,15	Alta
33	<i>Geotrichum</i> spp.	0,4	Moderada
34	<i>Candida tropicalis</i>	0,56	Moderada
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,19	Alta
36	<i>Geotrichum</i> spp.	0,33	Alta
37	<i>Geotrichum</i> spp.	0,17	Alta
38	<i>Malassezia</i> spp.	0,58	Moderada
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,63	Moderada
40	<i>Malassezia</i> spp.	0,61	Moderada
41	<i>Malassezia</i> spp.	0,6	Moderada
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,34	Alta
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,65	Moderada
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,33	Alta
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,19	Alta
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,49	Moderada

Fonte: O autor.

Um ponto a ser destacado no método de avaliação da produção de DNase em placas de Petri é a dificuldade na visualização dos halos de degradação. Esta dificuldade é relatada por outros autores, porém, neste trabalho, principalmente para os isolados do gênero *Candida*, os halos foram evidentes e de fácil medição, corroborando para a utilização desta técnica para a aferição de produção da DNase. Gerceker et al. (2009) ressaltam estes entraves no teste de DNase e sugerem uma

nova metodologia baseadas na degradação do meio contendo DNA em tubos, o que tornaria a leitura mais fácil.

Tabela 5.8 - Classificação da intensidade de produção de fosfolipase por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães Classificação da intensidade de produção de DNase por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Produção de DNase	<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Rhodotorula</i>
Alta	20	7	0	8
Moderada	3	2	3	3
Baixa	0	0	0	0
Negativa	0	0	0	0

Fonte: O autor.

A produção de hemolisinas por microrganismos é bastante elucidada em bactérias, porém, diante do aumento de casos de fungemias, principalmente, maior atenção tem sido dada a estas enzimas produzidas também por fungos, como no trabalho de Favero et al. (2014), que encontraram alta ação hemolítica em isolados de *Candida albicans* e *C. tropicalis* (Tabela 5.9 e Tabela 5.10). Ainda pouco diagnosticada em animais, possivelmente por negligência às micoses, as fungemias possuem na produção de hemolisinas importante fator para seu estabelecimento e desenvolvimento, como indicado por Furlaneto et al. (2018), onde isolados de *Candida albicans* de pacientes com fungemia foram fortes produtores de hemolisinas “in vitro”.

Dentre os 46 isolados deste estudo, apenas 3 mostraram alta capacidade de produção de hemolisinas “in vitro”, embora o gênero *Candida* tenha apresentado notável capacidade em produzi-las, sendo todos os seus isolados produtores, independente de capacidade produtiva. O gênero *Malassezia*, embora sabidamente seja um importante patógeno em micoses superficiais em animais e pessoas, e importante agente em fungemias de humanos, como descrito por Dankner et al. (1987) relatando fungemias por *Malassezia* em adultos e neonatos, não demonstrou ser potente causador de hemólise nas placas de Petri, o que remete à necessidade de condições específicas do organismo do hospedeiro para expressar este fator de virulência.

Tabela 5.9 - Produção de hemolisinas por leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação Fenotípica	PzH	Classificação
1	<i>Candida krusei</i>	0,727	Baixa
2	<i>Candida glabrata</i>	0,597	Moderada
3	<i>Candida albicans</i>	0,602	Moderada
4	<i>Candida krusei</i>	0,692	Moderada
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
6	<i>Candida albicans</i>	0,772	Baixa
7	<i>Geotrichum</i> spp.	0,73	Baixa
8	<i>Candida krusei</i>	0,812	Baixa
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,758	Baixa
10	<i>Candida krusei</i>	0,795	Baixa
11	<i>Candida lusitaniae</i>	0,746	Baixa
12	<i>Candida lusitaniae</i>	0,58	Moderada
13	<i>Candida albicans</i>	0,81	Baixa
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
15	<i>Candida glabrata</i>	0,667	Moderada
16	<i>Candida glabrata</i>	0,663	Moderada
17	<i>Candida glabrata</i>	0,684	Moderada
18	<i>Candida albicans</i>	0,647	Moderada
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
20	<i>Candida tropicalis</i>	0,739	Baixa
21	<i>Candida tropicalis</i>	0,664	Moderada
22	<i>Candida albicans</i>	0,736	Baixa
23	<i>Geotrichum</i> spp.	0,782	Baixa
24	<i>Geotrichum</i> spp.	0,783	Baixa
25	<i>Candida lusitaniae</i>	0,716	Baixa
26	<i>Candida famata</i>	0,701	Baixa
27	<i>Candida famata</i>	0,545	Moderada
28	<i>Geotrichum</i> spp.	0,621	Moderada
29	<i>Geotrichum</i> spp.	0,287	Alta
30	<i>Candida lusitaniae</i>	0,628	Moderada
31	<i>Candida glabrata</i>	0,263	Alta
32	<i>Geotrichum</i> spp.	0,647	Moderada
33	<i>Geotrichum</i> spp.	0,356	Alta
34	<i>Candida tropicalis</i>	0,546	Moderada
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
36	<i>Geotrichum</i> spp.	0,651	Moderada
37	<i>Geotrichum</i> spp.	0,699	Moderada
38	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,66	Moderada
40	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa
41	<i>Malassezia</i> spp.	1	Negativa

42	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,76	Baixa
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,74	Baixa
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	Negativa
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	0,76	Baixa

Fonte: O autor.

Tabela 5.10 - Classificação da intensidade de produção de hemolisinas por gêneros de leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Produção de hemolisinas	<i>Candida</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Rhodotorula</i>
Alta	1	2	0	0
Moderada	12	4	0	1
Baixa	10	3	0	4
Negativa	0	0	3	6

Fonte: O autor.

Devido a ausência de dados acerca da interpretação de dados de microdiluição para nistatina, neste trabalho comparou-se as técnicas de disco-difusão em agar e microdiluição apenas para itraconazol, fluconazol e anfotericina B, sendo as análises sobre a nistatina apenas descritivas. Os dados numéricos e interpretados estão nas Tabelas 5.11, 5.12, 5.13 e 5.14.

Para as análises realizadas com o itraconazol, fluconazol e anfotericina B, verificou-se pelo teste G, que houve associação significativa entre a técnica utilizada de disco-difusão e microdiluição e entre os níveis de sensibilidade (sensível, intermediário e resistente) ($P < 0,05$).

No ensaio com o itraconazol e o fluconazol verificou-se um aumento significativo das amostras intermediárias com o uso da técnica de disco-difusão em relação ao uso da microdiluição ($P < 0,05$). Esta constatação não foi observada com o uso da anfotericina B, já que os resultados apresentaram apenas duas categorias, sensível e resistente.

Com o uso da anfotericina B verificou-se um aumento significativo das amostras sensíveis com o uso da técnica de disco-difusão em relação ao uso da microdiluição enquanto que se observou um aumento significativo das amostras

resistentes com o uso da técnica da microdiluição em relação ao uso da disco-difusão ($P < 0,05$).

Esta comparação mostra que as duas técnicas podem gerar diferenças significativas na escolha de fármacos para terapias antifúngicas, principalmente para a anfotericina B, visto que a microdiluição em caldo acusou maior número de isolados resistentes. Para estes casos, a disco-difusão poderia direcionar, em muitos casos, a tratamentos que culminariam em falhas terapêuticas. A mesma reflexão cabe para o itraconazol e para o fluconazol, em que muitos dos isolados considerados intermediários na disco-difusão foram classificados como resistentes na microdiluição. Assim, mesmo diante da praticidade da disco-difusão em agar, a microdiluição tende a apresentar resultados mais seguros para o sucesso clínico da terapia antifúngica.

Pfaller et al. (2003) encontraram boa performance de testes de disco-difusão em agar e Etest em agar comparados ao método de referência de microdiluição para fluconazol e voriconazol, porém sugerem, que ajustes devem ser feitos nestes testes para que estes possam ser utilizados com segurança na rotina clínica. Tal pesquisa restringiu-se à sensibilidade por isolados de *Candida*. Estes achados corroboram com os nossos no que diz respeito à praticidade da disco-difusão e sua inconsistência em alguns achados, colocando sob menor credibilidade seus resultados para escolha clínica de antifúngicos.

Fato marcante nos dados apresentados neste trabalho é o número elevado de leveduras resistentes aos azóis. Na rotina clínica da medicina veterinária estes são os fármacos (itraconazol, cetoconazol, miconazol) utilizados empiricamente como primeira escolha para micoses, além de ser componente de shampoos, que geralmente possuem clorexidina em associação. Os antifúngicos desta classe também estão presentes em soluções tópicas otológicas, e dificilmente encontra-se no mercado algum tratamento para otite que não possua um azol em sua composição.

Tais fatos são descritos e evidenciados em trabalho de Angileri et al. (2018) que consideram estes fatos de uso indiscriminado de antifúngicos para justificar um caso de dermatite disseminada por *Malassezia pachydermatis* em cão, onde houve resistência ao tratamento por itraconazol e cetoconazol, comprovado laboratorialmente por teste de microdiluição em caldo.

Estes fatores evidenciam o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina veterinária, o que pode contribuir para o elevado número de resistência na microbiota oral dos cães deste estudo. Um fator que corrobora com a resistência das leveduras da boca dos cães, possivelmente é o hábito de lambedura que os mesmos possuem, desta forma, eles podem submeter esta microbiota a ação de antifúngicos quando lambem partes do corpo com essas drogas, como no pós-banho com soluções antissépticas contendo azóis, por exemplo.

A menor resistência aos antifúngicos poliênicos pode ser justificada pelo menor uso destes fármacos em medicina veterinária. São drogas que praticamente não são utilizadas em primeira escolha em animais, sendo a nistatina escolha de pouca relevância para os médicos veterinários, restrita praticamente ao tratamento de micoses superficiais como a dermatofitose. Minnat et al. (2022) ressaltam esse uso em cães com dermatofitose e também apontam para o grande número de resistência destes fungos à nistatina. Mas, diante dos achados sobre os isolados da cavidade do oral dos cães, os poliênicos mostram-se boa escolha para o tratamento em animais com estomatite, ou mesmo para acidentes por mordedura em pessoas e outros animais.

Já a anfotericina B, é utilizada em medicina veterinária em maior número de casos, principalmente em casos de resistência, ou alguma outra situação que justifique o não uso de azóis, como o itraconazol. Berto e Dalzochio (2021) destacam o menor uso de anfotericina B em cães por conta de sua potente ação nefrotóxica, o que acarretaria em acompanhamento do paciente em internações, onerando custos aos tutores, fator ainda impeditivo no exercício da medicina veterinária e cura total dos pacientes.

Tabela 5.11 - Halos em mm obtidos em teste de disco-difusão em agar – leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação Fenotípica	Itraconazol	Fluconazol	Nistatina	Anfotericina B
1	<i>Candida krusei</i>	16	0	14	14
2	<i>Candida glabrata</i>	0	0	19	15
3	<i>Candida albicans</i>	0	0	19	11
4	<i>Candida krusei</i>	16	0	13	12
5	<i>Rhodotorula spp.</i>	0	0	22	12
6	<i>Candida albicans</i>	0	0	20	14

7	<i>Geotrichum</i> spp.	10	0	21	12
8	<i>Candida krusei</i>	17	17	15	10
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	17	15	10	14
10	<i>Candida krusei</i>	17	9	17	15
11	<i>Candida lusitaniae</i>	18	18	15	12
12	<i>Candida lusitaniae</i>	0	0	18	10
13	<i>Candida albicans</i>	0	0	14	16
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	21	15
15	<i>Candida glabrata</i>	0	0	22	17
16	<i>Candida glabrata</i>	0	0	24	17
17	<i>Candida glabrata</i>	0	0	21	17
18	<i>Candida albicans</i>	0	0	20	17
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	25	16
20	<i>Candida tropicalis</i>	0	0	20	16
21	<i>Candida tropicalis</i>	0	0	22	18
22	<i>Candida albicans</i>	0	0	20	17
23	<i>Geotrichum</i> spp.	15	21	12	0
24	<i>Geotrichum</i> spp.	14	17	17	11
25	<i>Candida lusitaniae</i>	9	0	20	12
26	<i>Candida famata</i>	0	0	19	15
27	<i>Candida famata</i>	0	0	19	9
28	<i>Geotrichum</i> spp.	0	0	16	12
29	<i>Geotrichum</i> spp.	14	11	32	29
30	<i>Candida lusitaniae</i>	0	0	19	13
31	<i>Candida glabrata</i>	14	12	26	22
32	<i>Geotrichum</i> spp.	20	22	21	17
33	<i>Geotrichum</i> spp.	17	21	14	13
34	<i>Candida tropicalis</i>	21	22	13	12
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	16	11
36	<i>Geotrichum</i> spp.	0	0	20	19
37	<i>Geotrichum</i> spp.	0	0	21	12
38	<i>Malassezia</i> spp.	42	35	30	34
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	29	17
40	<i>Malassezia</i> spp.	43	32	22	35
41	<i>Malassezia</i> spp.	32	13	30	31
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	11	0	29	11
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	31	18
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	29	11
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	11	0	19	12
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	0	0	28	22

Fonte: O autor.

Tabela 5.12 - Interpretações obtidas em teste de disco-difusão em agar – leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação Fenotípica	Itraconazol	Fluconazol	Nistatina	Anfotericina B
1	<i>Candida krusei</i>	I	R	S	S
2	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S	S
3	<i>Candida albicans</i>	R	R	S	S
4	<i>Candida krusei</i>	I	R	S	S
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
6	<i>Candida albicans</i>	R	R	S	S
7	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S	S
8	<i>Candida krusei</i>	I	I	S	S
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	I	I	S	S
10	<i>Candida krusei</i>	I	R	S	S
11	<i>Candida lusitaniae</i>	I	I	S	S
12	<i>Candida lusitaniae</i>	R	R	S	S
13	<i>Candida albicans</i>	R	R	S	S
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
15	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S	S
16	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S	S
17	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S	S
18	<i>Candida albicans</i>	R	R	S	S
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
20	<i>Candida tropicalis</i>	R	R	S	S
21	<i>Candida tropicalis</i>	R	R	S	S
22	<i>Candida albicans</i>	R	R	S	S
23	<i>Geotrichum</i> spp.	I	S	S	R
24	<i>Geotrichum</i> spp.	I	I	S	S
25	<i>Candida lusitaniae</i>	R	R	S	S
26	<i>Candida famata</i>	R	R	S	S
27	<i>Candida famata</i>	R	R	S	S
28	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S	S
29	<i>Geotrichum</i> spp.	I	R	S	S
30	<i>Candida lusitaniae</i>	R	R	S	S
31	<i>Candida glabrata</i>	I	R	S	S
32	<i>Geotrichum</i> spp.	S	S	S	S
33	<i>Geotrichum</i> spp.	I	S	S	S
34	<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
36	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S	S
37	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S	S
38	<i>Malassezia</i> spp.	S	S	S	S
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
40	<i>Malassezia</i> spp.	S	S	S	S
41	<i>Malassezia</i> spp.	S	R	S	S
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S

43	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S	S

Legenda: S – sensível; I – intermediário; R – resistente

Fonte: O autor.

Tabela 5.13 - Concentrações inibitórias mínimas em µg/mL em teste de microdiluição em caldo – leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação Fenotípica	Itraconazol	Fluconazol	Nistatina	Anfotericina B
1	<i>Candida krusei</i>	Sem MIC	Sem MIC	4	2
2	<i>Candida glabrata</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	0.5
3	<i>Candida albicans</i>	Sem MIC	Sem MIC	2	0.5
4	<i>Candida krusei</i>	Sem MIC	Sem MIC	Sem MIC	4
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	4	1
6	<i>Candida albicans</i>	Sem MIC	Sem MIC	2	0.25
7	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	4	2
8	<i>Candida krusei</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	0.125
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	2	0.25
10	<i>Candida krusei</i>	Sem MIC	Sem MIC	4	2
11	<i>Candida lusitaniae</i>	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
12	<i>Candida lusitaniae</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	0.25
13	<i>Candida albicans</i>	0.125	0.25	0.0625	Inib. Compl.
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	1	0.25
15	<i>Candida glabrata</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	Inib. Compl.
16	<i>Candida glabrata</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	Inib. Compl.
17	<i>Candida glabrata</i>	32	64	1	0.125
18	<i>Candida albicans</i>	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
20	<i>Candida tropicalis</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	0.125
21	<i>Candida tropicalis</i>	Sem MIC	Sem MIC	1	1
22	<i>Candida albicans</i>	0.25	0.5	0.5	Inib. Compl.
23	<i>Geotrichum</i> spp.	2	4	0.5	0.25
24	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	4	2
25	<i>Candida lusitaniae</i>	0.125	0.25	0.0625	Inib. Compl.
26	<i>Candida famata</i>	Sem MIC	Sem MIC	2	2
27	<i>Candida famata</i>	8	16	2	1
28	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	16	4
29	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	16	2
30	<i>Candida lusitaniae</i>	Sem MIC	Sem MIC	8	2
31	<i>Candida glabrata</i>	Sem MIC	Sem MIC	2	0.5
32	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	2	1

33	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	Sem MIC	Sem MIC
34	<i>Candida tropicalis</i>	0.25	0.5	0.5	8
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
36	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	2	1
37	<i>Geotrichum</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	1	0.25
38	<i>Malassezia</i> spp.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	1	0.5
40	<i>Malassezia</i> spp.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
41	<i>Malassezia</i> spp.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.	Inib. Compl.
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	2	0.5
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	2	1
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	Sem MIC	Sem MIC	Sem MIC	32
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	1	8	0.5	0.25
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	4	32	Inib. Compl.	Inib. Compl.

Legenda: Inib. Compl. – inibição completa do crescimento fúngico

Fonte: O autor.

Tabela 5.14 - Interpretações das concentrações inibitórias mínimas em teste de microdiluição em caldo – leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Leveduras	Identificação Fenotípica	Itraconazol	Fluconazol	Anfotericina B
1	<i>Candida krusei</i>	R	R	R
2	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S
3	<i>Candida albicans</i>	R	R	S
4	<i>Candida krusei</i>	R	R	R
5	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
6	<i>Candida albicans</i>	R	R	S
7	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	R
8	<i>Candida krusei</i>	R	R	S
9	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
10	<i>Candida krusei</i>	R	R	R
11	<i>Candida lusitanae</i>	S	S	S
12	<i>Candida lusitanae</i>	R	R	S
13	<i>Candida albicans</i>	S	S	S
14	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
15	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S
16	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S
17	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S
18	<i>Candida albicans</i>	S	S	S
19	<i>Rhodotorula</i> spp.	S	S	S
20	<i>Candida tropicalis</i>	R	R	S
21	<i>Candida tropicalis</i>	R	R	S
22	<i>Candida albicans</i>	R	S	S
23	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S

24	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	R
25	<i>Candida lusitanae</i>	S	S	S
26	<i>Candida famata</i>	R	R	R
27	<i>Candida famata</i>	R	R	S
28	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	R
29	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	R
30	<i>Candida lusitanae</i>	R	R	R
31	<i>Candida glabrata</i>	R	R	S
32	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S
33	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	R
34	<i>Candida tropicalis</i>	R	S	R
35	<i>Rhodotorula</i> spp.	S	S	S
36	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S
37	<i>Geotrichum</i> spp.	R	R	S
38	<i>Malassezia</i> spp.	S	S	S
39	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
40	<i>Malassezia</i> spp.	S	S	S
41	<i>Malassezia</i> spp.	S	S	S
42	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
43	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
44	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	R
45	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S
46	<i>Rhodotorula</i> spp.	R	R	S

Legenda: S – sensível; I – intermediário; R – resistente

Fonte: O autor.

6 CONCLUSÕES

- A microbiota leveduriforme oral dos cães é composta por gêneros tradicionalmente envolvidos em micoses em animais e pessoas, como *Candida* spp. e *Malassezia* spp.

- A técnica de identificação fenotípica é confiável para a identificação das leveduras isoladas da cavidade oral dos cães.

- A técnica de identificação proteômica necessita de atualizações para melhor identificar os componentes da microbiota leveduriforme da cavidade oral dos cães, principalmente para leveduras não-*Candida*.

- A produção "in vitro" de enzimas atuantes como fatores de virulência é facilmente reproduzível, mas não necessariamente atua como indicador de processo infeccioso ativo baseado no grau de produção pela levedura, visto que variados níveis foram detectados nos diversos gêneros isolados.

- Para o tratamento de enfermidades bucais em cães e tratamento de lesões causadas por leveduras oriundas da cavidade oral de cães, os antifúngicos poliênicos são escolha mais racional em relação aos azóis, visto o elevado número de isolados fúngicos resistentes ao itraconazol e fluconazol.

REFERÊNCIAS¹

Abbas HA, Gad AI, El-Sayed MA, El-Ganiny AM. Impeding Virulence of *Candida albicans* by Candesartan and Domperidone. *Curr Microbiol.* 2021 Nov;78(11):3957-3967. doi: 10.1007/s00284-021-02663-x.

Abrão FY, Marreto LCNL, de Carvalho JCB, Silva PH dos S, de Carvalho FS, Morais RP, e Souza LKH. Fatores de virulência de espécies de *Candida* isoladas na saliva de profissionais da saúde: Factores de virulencia de las especies de *Candida* aisladas en la salvación de los profesionales de la salud. *Lat. Americ. J. of Develop.* [Internet]. 2022 Jan. 21 [cited 2022 Aug. 31];4(1):68-80. doi: 10.46814/lajdv4n1-006.

Alves IA, Camargo FP, Goulart LS. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp [Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical *Candida* sp isolates]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010 Sep-Oct;43(5):575-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822010000500021.

Andreola P, Demathé A, Galafassi D, Elsemann EB, Elsemann RB, Gazzoni AF. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Rev de Odont UNESP.* 2016 Set; 45:219-26. doi: 10.1590/1807-2577.26115.

Angileri M, Pasquetti M, De Lucia M, Peano A. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. *Med Mycol Case Rep.* 2018 Dec 21;23:58-61. doi: 10.1016/j.mmcr.2018.12.004.

Animais de estimação representam 67% do número de habitantes do Brasil. *Correio do Estado* [citado 29 ago 2022]. Disponível em: <https://correiodoestado.com.br/cidades/animais-representam-67-do-numero-de-habitantes-do-brasil/392074>.

Antonio DSN, Abreu DPB de, Bonci MM, Makita MT, de Campos SG, Baroni F de A. In vitro virulence of yeasts isolated from the cervicovaginal region of bitches. *Braz J Vet Med.* 2018 May. 27;39(1):61-7. doi: 10.29374/2527-2179.bjvm0888.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Kato J, Ninomiya K, Vidotto V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1994 Dec;128(3):143-50. doi: 10.1007/BF01138475.

Ataides FS, Costa CR, Santos AS, Freitas VAQ, Silva TC, Zara ALSA, Jesuino RSA, Silva MRR. In vitro characterization of virulence factors among species of the *Candida parapsilosis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020 Jan 27;53:e20190336. doi: 10.1590/0037-8682-0336-2019.

Ayres M, Ayres MJr, Ayres DL, Santos AAS. *BioEstat. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Belém, 2007. V. 364. Software versão 5.3.

Beikler T, Bunte K, Chan Y, Weiher B, Selbach S, Peters U, Klocke A, Watt RM, Flemmig TF. Oral Microbiota Transplant in Dogs with Naturally Occurring Periodontitis. *J Dent Res*. 2021 Jul;100(7):764-70. doi: 10.1177/0022034521995423.

Berto C, Dalzochio T. Nefrotoxicidade e resistência fúngica associadas à Anfotericina B: uma revisão comentada. *Saúde e meio ambient.: rev interdisciplin*. 2021 Mar;10:141-57. doi: 10.24302/sma.v10.2720.

Biegańska MJ, Rzewuska M, Dąbrowska I, Malewska-Biel B, Ostrzeszewicz M, Dworecka-Kaszak B. Mixed Infection of Respiratory Tract in a Dog Caused by *Rhodotorula mucilaginosa* and *Trichosporon jirovecii*: A Case Report. *Mycopathologia*. 2018 Jun;183(3):637-44. doi: 10.1007/s11046-017-0227-4.

Brito EH, Fontenelle RO, Brilhante RS, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha MF. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *Vet J*. 2009 Nov;182(2):320-6. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.07.001.

Brito EHS, Fontenelle RODS, Brilhante RSN, Cordeiro RDA, Sidrim JJC, Rocha MFG. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Ciênrur*. 2009 Dec;39(9):2655-64. doi: 10.1590/S0103-84782009000900046.

Burk A. Do Dogs Like Kisses?. 2018. [citado: 29 ago. 2022]. Disponível em: <https://thehappypuppy.com/do-dogs-like-kisses/>.

Candido RC, Azevedo RV, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal [Enzyme typing of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Sep-Oct;33(5):437-42. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822000000500005.

Cassagne C, Normand AC, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*. 2016 Nov;59(11):678-90. doi: 10.1111/myc.12506.

Clinical and Laboratory Standards Institute. M44 – Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing for yeasts. 1^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Suplemento M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, approved standard. 3^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Suplemento M44-A2. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. 2^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Suplemento M44-S3. Zone Diameter Interpretive Standards, Corresponding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Breakpoints, and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Suplemento M60-S1. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Corrêa Pdos R, David PR, Peres NP, da Cunha KC, de Almeida MT. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas [Phenotypic characterization of yeasts isolated from the vaginal mucosa of adult women]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009 Apr;31(4):177-81. Portuguese. doi: 10.1590/s0100-72032009000400004.

Dankner WM, Spector SA, Fierer J, Davis CE. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complication of hyperalimentation. *Rev Infect Dis*. 1987 Jul-Aug;9(4):743-53. doi: 10.1093/clinids/9.4.743.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al Hatmi AMS, Figueras MJ. (2020). Atlas of clinical fungi. 4^a ed. Utrecht, Holanda; 2020. 1600p.

Deng P, Swanson KS. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br J Nutr.* 2015 Jan;113 Suppl:S6-17. doi: 10.1017/S0007114514002943.

Echevarría A, Durante AG, Arechaval A, Negroni R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* [Comparative study of two culture media for the detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* strains]. *Rev Iberoam Micol.* 2002 Jun;19(2):95-8. Spanish.

Elliott DR, Wilson M, Buckley CM, Spratt DA. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5470-6. doi: 10.1128/JCM.43.11.5470-5476.2005.

Favero D, Furlaneto-Maia L, França EJ, Góes HP, Furlaneto MC. Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Curr Microbiol.* 2014 Feb;68(2):161-6. doi: 10.1007/s00284-013-0459-6.

Flancman R, Singh A, Weese JS. Evaluation of the impact of dental prophylaxis on the oral microbiota of dogs. *PLoS One.* 2018 Jun 25;13(6):e0199676. doi: 10.1371/journal.pone.0199676.

Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Front Microbiol.* 2018 May 29;9:1097. doi: 10.3389/fmicb.2018.01097.

Fonseca L, De Marco P. Inibição de fatores de virulência em *S. aureus* e em *P. aeruginosa*. *RevSALUS-Revista Científica Internacional da Rede Acadêmica das Ciências da Saúde da Lusofonia.* 2022; 4(Sup):103.

Frias DFR, Kozusny-Andreani DI, Prina RM. Identificação da microbiota gengival de cães aparentemente hígidos. *Nuc* 2018 Mar;15(1):129-36. doi: 10.3738/1982.2278.2792

Furlaneto MC, Góes HP, Perini HF, Dos Santos RC, Furlaneto-Maia L. How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species? *Folia Microbiol (Praha).* 2018 Jul;63(4):405-12. doi: 10.1007/s12223-018-0584-5.

Gerceker D, Karasartova D, Elyürek E, Barkar S, Kiyam M, Ozsan TM, Calgin MK, Sahin F. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. *J Gen Appl Microbiol*. 2009 Aug;55(4):291-4. doi: 10.2323/jgam.55.291.

Gitman MR, McTaggart L, Spinato J, Poopalarajah R, Lister E, Husain S, Kus JV. Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. by Using a Composite Correlation Index (CCI)-Based Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method Appears To Not Offer Benefit over Traditional Broth Microdilution Testing. *J Clin Microbiol*. 2017 Jul;55(7):2030-34. doi: 10.1128/JCM.00254-17.

Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol*. 2000 May;38(5):1782-5. doi: 10.1128/JCM.38.5.1782-1785.2000.

Haas B, Bonifait L, Vaillancourt K, Charette SJ, Gottschalk M, Grenier D. Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. *BMC Res Notes*. 2014 Jul 4;7:424. doi: 10.1186/1756-0500-7-424.

Headley SA, Mota FC, Lindsay S, de Oliveira LM, Medeiros AA, Pretto-Giordano LG, Saut JP, Krockenberger M. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*-Induced Arthritis with Encephalitic Dissemination in a Dog and Review of Published Literature. *Mycopathologia*. 2016 Aug;181(7-8):595-601. doi: 10.1007/s11046-016-0009-4.

Ishida K, Alviano DS, Silva BG, Guerra CR, Costa AS, Nucci M, Alviano CS, Rozental S. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. *Braz J Med Biol Res*. 2012 May;45(5):411-6. doi: 10.1590/s0100-879x2012007500034.

Jacques SM. *Bioestatística. Princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed; 2003. 255 p.

Jadhav VJ, Pal M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Dec;23(4):233-4. doi: 10.1016/s1130-1406(06)70050-x.

Jammil NAN, Yehia MM. Virulence Factors of Yeasts Isolated From Oral Lesions. *Annals of the College of Medicine, Mosul*, 2020; 41(2): 170-7. doi: 10.33899/mmed.2020.164160

Kano R, Aramaki C, Murayama N, Mori Y, Yamagishi K, Yokoi S, Kamata H. High multi-azole-resistant *Malassezia pachydermatis* clinical isolates from canine *Malassezia dermatitis*. *Med Mycol*. 2020 Feb 1;58(2):197-200. doi: 10.1093/mmy/myz037.

Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. Analysis of the otic mycobiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Vet Dermatol*. 2018 Oct;29(5):417-e138. doi: 10.1111/vde.12665.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts: a taxonomic study*. 5^a ed. Estados Unidos: Elsevier Science; 1998. 1055p.

Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, Holanda: Elsevier; 2011.

Lara BR, de Camargo BB, Paula CR, Junior DPL, Garces HG, Arnoni MV, Silveira M, Gimenes VMF, Siqueira LPM, Takahashi JPF, Melhem MSC, Richini-Pereira VB, Anversa L, Ruiz LDS. Comparing the phenotypic, genotypic, and proteomic identification of *Trichosporon* species: A globally emerging yeast of medical importance. *Med Mycol*. 2021 Dec 3;59(12):1181-90. doi: 10.1093/mmy/myab050.

Lima RM, da Silva WLF, de Abreu Lazzarini J, Raposo NRB. Esporotricose brasileira: desdobramentos de uma epidemia negligenciada. *Rev de APS*. 2019 Apr-Jun;22(2). doi: 10.34019/1809-8363.2019.v22.16496

Linares CE, de Loreto ES, Silveira CP, Pozzatti P, Scheid LA, Santurio JM, Alves SH. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007 Jul-Aug;49(4):203-6. doi: 10.1590/s0036-46652007000400001.

Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*. 2001 Aug;39(8):2971-4. doi: 10.1128/JCM.39.8.2971-2974.2001.

Malik UM, Khan AB, Satti ML. Comparative Evaluation of CHROMagar and API 20C AUX in Isolation and Identification of *Candida* Species. *Jour Isl Intern Med Col*. 2018 Jun;13(2):85-90.

Marinho SA, Teixeira AB, Santos OS, Cazanova RF, Ferreira CA, Cherubini K, de Oliveira SD. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Braz J Microbiol*. 2010 Apr;41(2):286-94. doi: 10.1590/S1517-83822010000200004.

Meason-Smith C, Diesel A, Patterson AP, Older CE, Mansell JM, Suchodolski JS, Rodrigues Hoffmann A. What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiol Ecol.* 2015 Dec;91(12):fiv139. doi: 10.1093/femsec/fiv139.

Meinerz AR, Nascente Pda S, Schuch LF, Cleff MB, Santin R, Brum Cda S, Nobre Mde O, Meireles MC, Mello JR. Suscetibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol [In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Jan-Feb;40(1):60-2. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822007000100012.

Mendes CA. Fatores de virulência “in vitro” de leveduras isoladas da cavidade oral de cães [dissertação]. Seropédica-RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária; 2021.

Minnat TR, AL-Ezzy AIA, Maroof S waleed. In Vitro Susceptibility of Antifungal Agents Against Dermatophytes Species Isolated From Pet Dogs. *DJVS.* 2022 Mar;1(3):14-22.

Montoya AM, Montesino CA, Carrión-Álvarez D, González GM, Rojas OC. A comparative study of extracellular enzymes from chromoblastomycosis agents reveals the potential association of phospholipase with the severity of the lesions. *Microb Pathog.* 2020 Oct;147:104367. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104367.

Navarro BS, Auler ME, Dos Santos RLO, da Silva Ruiz L, Nascimento DC, Felipe PAN, Domaneschi C, Moreira D, Baroni FA, Pires MFC, Paula CR. Antifungal sensitivity and species of yeasts in oral mucosa of street mixed-breed dogs. *J Mycol Med.* 2020 Dec;30(4):101010. doi: 10.1016/j.mycmed.2020.101010.

Naves PLF, Pinto Santana D, Leão Ribeiro E, Severo Menezes AC. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Cmbio.* 2013 Nov;12(2):229-33.

Noor AT, Ali A Alsudani. Detection of some virulence enzymes of *Malassezia* spp. isolated from patients of Pityriasis Versicolor and their sensitivity to some antifungal agents. *QJPS.* 2020 Dec;26(1):Bio 10-21. doi: 10.29350/qjps.2021.26.1.1239. Paula CR, Navarro BS, Bonci MM, Nascimento DC. Importance of Yeasts in Oral Canine Mucosa. In: *Canine Genetics, Health and Medicine.* Londres: IntechOpen; 2021. p. 91-111.

Peano A, Johnson E, Chiavassa E, Tizzani P, Guillot J, Pasquetti M. Antifungal Resistance Regarding *Malassezia pachydermatis*: Where Are We Now? *J Fungi* (Basel). 2020 Jun 25;6(2):93. doi: 10.3390/jof6020093.

Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1440-6. doi: 10.1128/JCM.41.4.1440-1446.2003.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982 Mar;20(1):7-14. doi: 10.1080/00362178285380031.

Putignani L, Del Chierico F, Onori M, Mancinelli L, Argentieri M, Bernaschi P, Coltella L, Lucignano B, Pansani L, Ranno S, Russo C, Urbani A, Federici G, Menichella D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst*. 2011 Mar;7(3):620-9. doi: 10.1039/c0mb00138d.

Rezende C, Segura R, Riva SBM, Castro VDCO. Mecanismos de ação dos antifúngicos. *Rev Unifev: Ciên & Tecn*. 2017; 2:316.

Rhodes J, Fisher MC. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. *Curr Opin Microbiol*. 2019 Dec;52:84-9. doi: 10.1016/j.mib.2019.05.008.

Riceto ÉB, Menezes Rde P, Penatti MP, Pedroso Rdos S. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol*. 2015 Apr-Jun;32(2):79-82. doi: 10.1016/j.riam.2013.11.003.

Rocha CHL, Rocha FMG, Mendonça AMS, de Alencar Pereira EW, da Silva FMC, Santos AR. Virulência de isolados clínicos de *Candida tropicalis*. *Rev Invest Biom*. 2018;9(2):118-28.

Rörig KC, Colacite J, Abegg MA. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida* [Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Mar-Apr;42(2):225-7. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822009000200029.

Rosa JMA, Moraes DFSD, Lima SR, Neves RCSM, Colodel EM, Almeida ABPF, Sousa VRF, Nakazato L, Dutra V. Fungal dermatitis associated to *Rhodotorula*

glutinis in dog (*Canis familiaris*): case report. Arq Bras Med Vet Zoot. 2018 Mar-Apr;70:437-2. doi: 10.1590/1678-4162-9573.

Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982 Sep;20(3):233-44. doi: 10.1080/00362178285380341.

Sanguinetti M, Posteraro B. MALDI-TOF mass spectrometry: any use for *Aspergilli*? Mycopathologia. 2014 Dec;178(5-6):417-26. doi: 10.1007/s11046-014-9757-1.

Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):369-79. doi: 10.1128/JCM.01640-16.

Santin R, Madrid IM, Nascente PDS, Meireles MCA, Mello JRBD. Suscetibilidade de leveduras a antissépticos orais. MEDVEP. Rev cient Med Vet. 2011 Augo-Oct;406-8.

Silva ACN, Júnior AAV, Cunha FA, Cunha MCSO, Menezes EA. Teste de sensibilidade de *Candida albicans* pelo método de disco-difusão: uma comparação de meios de cultura. RBAC. 2016 Jan;48(4):363-9. doi: 10.21877/2448-3877.201600209

Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. J Med Vet Mycol. 1986 Oct;24(5):415-7. doi: 10.1080/02681218680000631.

van Thiel IAM, Stavrou AA, de Jong A, Theelen B, Davids M, Hakvoort TBM, Admiraal-van den Berg I, Weert ICM, de Kruijs MAMH, Vu D, Moissl-Eichinger C, Heinsbroek SEM, Jonkers DMAE, Hagen F, Boekhout T, de Jonge WJ, van den Wijngaard RM. Genetic and phenotypic diversity of fecal *Candida albicans* strains in irritable bowel syndrome. Sci Rep. 2022 Mar 30;12(1):5391. doi: 10.1038/s41598-022-09436-x.

Vieira de Melo AP, Zuza-Alves DL, da Silva-Rocha WP, Ferreira Canário de Souza LB, Francisco EC, Salles de Azevedo Melo A, Maranhão Chaves G. Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. J Mycol Med. 2019 Jun;29(2):132-9. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.02.002.

Viotto AHA, Delamura IF, Souza MC, Baggio AMP, Ferriolli SC, Bizelli VF, Ramos EU, Bassi APF. Tratamento de lesão por mordedura de cão: um relato de caso. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2022; 50(Especial):0-0.

Zamith-Miranda D, Heyman HM, Cleare LG, Couvillion SP, Clair GC, Bredeweg EL, Gacser A, Nimrichter L, Nakayasu ES, Nosanchuk JD. Multi-omics Signature of *Candida auris*, an Emerging and Multidrug-Resistant Pathogen. *mSystems*. 2019 Jun 11;4(4):e00257-19. doi: 10.1128/mSystems.00257-19.

Zang X, Dang G, Cai Z, Shao M, Tang Y, Cao J, Cui Z, Liu S. Extracellular DNase MAP3916c attacks the neutrophil extracellular traps and is needed for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* virulence. *Vet Microbiol*. 2022 Aug 3;273:109529. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109529.

Zhang X, Zhao S, Sun L, Li W, Wei Q, Ashman RB, Hu Y. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *Am J Transl Res*. 2017 Jan 15;9(1):50-62.

Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kierklo A, Tokajuk G, Dabrowska E, Pawińska M, Klimiuk A, Stokowska W, Abdelrazek S. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci*. 2006;51 Suppl 1:233-6.

Zonta YR, Dezen ALO, Della Coletta AM, Yu KST, Carvalho L, Dos Santos LA, Deprá IC, Kratofil RM, Willson ME, Zbytnuik L, Kubes P, Ximenes VF, Dias-Melicio LA. *Paracoccidioides brasiliensis* Releases a DNase-Like Protein That Degrades NETs and Allows for Fungal Escape. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 10;10:592022. doi: 10.3389/fcimb.2020.592022.

APÊNDICE A – Meios de cultivo, utensílios e reagentes

- Escova dental para coleta de amostras

- Escova dental de cerdas macias
- NaCl 8,5 g
- Cloranfenicol 0,5 g
- Água destilada 1000 mL

Colocar 10 mL da solução salina acrescida do cloranfenicol em um tubo de ensaio (200x25 mm) e adicionar a escovar dental. Colocar rolha de algodão no tubo. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

- Meio agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol

- Peptona de carne 10,0 g
- Dextrose 20,0 g
- Cloranfenicol 0,5 g
- Agar bacteriológico 15,0 g
- Água destilada 1000 mL
- pH 5,7

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

- Meio de Christensen

- Ureia 20,0 g
- Agar agar 16,0 g
- Cloreto de Sódio 5,0 g
- Fosfato Monopotássico 2,0 g
- Peptona de Gelatina 1,0 g
- Dextrose 1,0 g
- Vermelho Fenol 0,012 g
- Água destilada 1000 mL
- pH 6,8

Deve ser esterilizado por filtração.

- Meio agar arroz

- Arroz integral 20,0 g
- Agar agar 20,0 g
- Água destilada 1000 mL

A mistura do meio deve ser submetida a banho maria durante 45 minutos, e posteriormente feita filtração, sendo a parte líquida aproveitada e as sementes dispensadas. O volume deve ser ajustado até atingir 1000mL.

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

- Meio CHROMagar® *Candida*

- Cromopeptona 10,0 g
- Glicose 20,0 g
- Mistura de cromogênios 2,0 g
- Cloranfenicol 0,5 g
- Dióxido de titânio 0,35 g
- Agar agar 15,0 g
- pH 6,0
- Água destilada 1000 mL

Apenas a água deve ser autoclavada a 121 °C por 15 minutos; o pó é misturado diretamente à água estéril, e então imediatamente ocorre o plaqueamento do meio.

- Meio base para auxanograma

- "Yeast Nitrogen Base" (YNB) 6,7g
- Agar agar 18g
- Água destilada 1000mL

O YNB deve ser homogeneizado em 100mL de água, e então, esterilizado por filtração em membrana Millipore® 0,22µl. O agar agar é diluído em 900 mL de água destilada e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Após o agar agar atingir temperatura de 55 °C em banho maria, a parte filtrada é misturada ao mesmo. A suspensão de levedura é adicionada junto ao meio em cada placa de Petri e, após solidificação, as fontes carbonadas são adicionadas em pontos equidistantes.

- Meio base para zimograma

- Extrato de levedura 4,5g
- Peptona de caseína 7,5g
- Água destilada 1000mL
- Solução estoque de azul de bromotimol 4mL (50mg/75mL de água destilada)

Utiliza-se tubos de ensaio de 150x12 mm com tampas rosqueadas, contendo em seu interior tubos de Durhan invertidos. Os tubos já contendo toda a solução são autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Para cada amostra de levedura, são utilizados sete tubos, sendo cada um destes fonte de açúcar pré-estabelecido.

- Meio para produção de protease

- Soroalbumina bovina (fração V) 2,0 g
- “Yeast Carbon Base” (YCB) 11,7g
- Cloridrato de tiamina 1,0 g
- Agar agar 18,0 g
- Água destilada 1000 mL

A soroalbumina bovina misturada ao cloridrato de tiamina e 100 mL da água destilada devem ser esterilizados por filtração em membrana Millipore® 0,22µl. O YCB acrescido de agar destilada a 900 mL devem ser autoclavados a 121 °C por 15 minutos, e após este processo, resfriados em banho maria a 55 °C. Por fim, as duas soluções devem ser homogeneizadas e distribuídas em placas de Petri.

- Meio para produção de fosfolipase

- Gema de ovo 80,0 g
- NaCl 57,3 g
- CaCl₂ 0,55 g
- Agar Sabouraud dextrose 65,0 g
- Água destilada 1000 mL

Para redução da carga microbiana dos ovos, os mesmos devem ficar submersos por 1 hora em solução alcoólica de iodo. Seguido a esse procedimento, as gemas devem ser separadas e colocadas em recipiente estéril. O volume desejado de gema deve ser pipetado, evitando-se vestígios da membrana da gema na composição final.

Os demais componentes são autoclavados a 121 °, durante 15 minutos e resfriados em banho maria a 55 °C, para então serem misturados as gemas, sendo a mistura homogeneizada e distribuída em placas de Petri.

- Meio para produção de DNase

- Triptose 20,0 g
- Ácido desoxirribonucleico 2,0 g
- Cloreto de sódio 5,0 g
- Agar agar 15,0 g
- Água destilada 1000mL

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e distribuir o meio em placas de Petri.

- Meio para produção de hemolisinas

- Peptona de carne 10,0 g
- Dextrose 30,0 g
- Sangue de carneiro 70 mL
- Agar bacteriológico 15,0 g
- Água destilada 1000 mL

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos. Adicionar o sangue após temperatura do meio atingir 55 °C em banho maria. Distribuir o meio em placas de Petri.

- Meio agar Muller Hinton para aintifungigrama

- Extrato de carne 2,0 g
- Hidrolisado de caseína 17,5 g
- Amido 1,5 g
- Agar agar 15,0 g
- Glicose 20,0 g
- Azul de metileno 5,0 µL
- Água destilada 1000 mL
- pH 7,3

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



fundada em 1930

"En scientiam veri via est certior"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Tel. (11) 3091 7842

ceufa@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "Microbioma da cavidade oral de cães e de seus tutores Identificação fenogenotípica e proteômica da microbiota, sensibilidade a antifúngicos e virulência" registrada com o nº 031/2019, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula e Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni, Mario Mendes Bonci, Sergio Gaspar de Campos, Daniel Paiva Barros de Abreu, Rita de Cassia Silva da Costa e Glória Maria Direito, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 26/11/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2019 a 30/09/2023
Espécie/linhagem/raça	Cão - variados
Nº de animais	120
Peso/idade	1-70kg
Sexo	M+F
Origem	Centro cirúrgico do HMPA/UFRRJ

São Paulo, 04 de dezembro de 2019.

Profa. Associada Dra. Sílvia Vanessa Lourenço
Coordenadora do CEUA-FOUSP

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Microbioma da cavidade oral de cães e de seus tutores - identificação fenogenotípica e proteômica da micobiota, sensibilidade a antifúngicos e virulência.", protocolada sob o CEUA nº 1936110919 (06/2019), sob a responsabilidade de **Francisco de Assis Baroni** e equipe; Mário Mendes Bonci; Sergio Gaspar de Campos; Claudete Rodrigues Paula; Daniel Paiva Barros de Abreu; Rita de Cássia Silva da Costa; Glória Maria Dineiro - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 25/10/2019.

We certify that the proposal "Oral cavity microbiome of dogs and their guardians - mycobiota phenogenotypic and proteomic identification, antifungal sensitivity and virulence.", utilizing 120 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1936110919 (06/2019), under the responsibility of **Francisco de Assis Baroni** and team; Mário Mendes Bonci; Sergio Gaspar de Campos; Claudete Rodrigues Paula; Daniel Paiva Barros de Abreu; Rita de Cássia Silva da Costa; Glória Maria Dineiro - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/25/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **11/2019 a 10/2023**

Área: **Microbiologia E Imunologia Veterinária**

Origem: **Hospital Veterinário da UFRRJ**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 20 anos**

N: **120**

Linhagem: **Variadas**

Peso: **1 a 70 kg**

Local do experimento: - Coleta de amostras: Hospital Veterinário da UFRRJ. - Identificação fenotípica dos isolados: Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da UFRRJ e no Laboratório de Leveduras Patogênicas do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP. - Identificação proteômica dos isolados: Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ. - Identificação genotípica das amostras: Laboratório de Leveduras Patogênicas do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP. - Testes de virulência e sensibilidade aos antifúngicos: Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da UFRRJ.

Sempélica, 25 de outubro de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro