

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

SABRINA TAINAH DA CRUZ SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO TRATO
RESPIRATÓRIO SUPERIOR E DO TRATO DIGESTÓRIO DE
CAPRINOS E DE OVINOS DO ESTADO DO CEARÁ**

FORTALEZA

2013

SABRINA TAINAH DA CRUZ SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO TRATO
RESPIRATÓRIO SUPERIOR E DO TRATO DIGESTÓRIO DE
CAPRINOS E DE OVINOS DO ESTADO DO CEARÁ**

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Co-Orientadora: Profª. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho

Bibliotecário (a) Leila Cavalcante Sátiro – CRB-3 / 544

S586i Silva, Sabrina Tainah da Cruz.
 Isolamento e caracterização de leveduras do trato respiratório superior e do trato digestório de caprinos e de ovinos do estado do Ceará / Sabrina Tainah da Cruz. — 2013.
 CD-ROM 70f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.
 “CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.
 Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
 Orientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
 Co-orientação: Prof^a.Dr^a. Raimunda sâmia Nogueira Brilhante.
 1. Caprinos. 2. Ovinos. 3. Leveduras. 4. Fatores de virulência. 5. Sensibilidade. I. Título.

CDD: 633

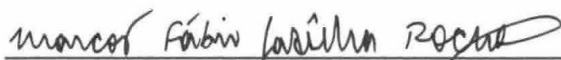
SABRINA TAINAH DA CRUZ SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO TRATO
RESPIRATÓRIO SUPERIOR E DO TRATO DIGESTÓRIO DE
CAPRINOS E DE OVINOS DO ESTADO DO CEARÁ**

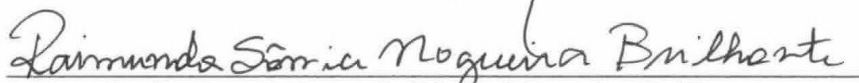
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em: 09/07/2013.

BANCA EXAMINADORA:



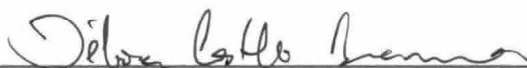
Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Orientador



Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará
Co-orientadora



Prof. Dra. Érika Helena Salles de Brito
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Examinadora



Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia
Universidade Federal do Ceará
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível – CAPES/PNPD
Examinadora

À minha mãe que esteve ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri,
nas horas que me lamentei e nas horas que, de uma forma ou de outra, demonstrei total
alegria. Agradecer pelo sorriso diário, sem mágoas nem rancores, agradecer de peito aberto.
Agradeço por tentar me acalmar nos meus dias de mal humor, sempre com carinho.
Hoje quero parar e agradecer, porque a senhora fez, faz e fará sempre parte de minha história!
A senhora é sempre maravilhosa.
Obrigada pela vida!...

“A felicidade às vezes é uma benção, mas geralmente é uma conquista ”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Aos proprietários que abriram as portas de suas propriedades e aceitaram que seus animais participassem desta pesquisa.

Ao professor Vicente José de Figueirêdo Freitas do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da UECE, através do qual ingressei no mundo científico durante a graduação e que durante a execução deste trabalho disponibilizou seus animais para realização de coletas, sempre que necessário.

Ao professor Marcos Fábio Gadelha Rocha por ter sido atencioso quando o procurei para pedir que me orientasse em um projeto de mestrado. Obrigada por sua orientação, dedicação, ensinamentos, apoio e cobranças que são indispensáveis para o aprimoramento de seus orientados.

À professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante por sempre se dispor a ajudar na execução do projeto e por sua preocupação em saber se estava tudo acontecendo como deveria acontecer, enfim seu apoio, os ensinamentos e as cobranças também foram muito importantes durante o período do mestrado.

À professora Rossana de Aguiar Cordeiro por sempre estar disponível para ajudar e por se manter sempre próxima dos alunos e disposta a escutar.

À professora Débora Castelo Branco que sempre esteve disposta a ajudar diretamente no projeto. Além disso, se mostrou uma amiga, que comecei a admirar quando a vi apresentando sua tese de doutorado, com simplicidade e inteligência, características que a torna uma pessoa especial. Existem pessoas que a gente olha e gosta imediatamente, e você Debis é uma dessas pessoas para mim.

Ao professor José Júlio Costa Sidrim pela organização e estrutura do Centro Especializado em Micologia Médica.

À equipe do CEMM pela agradável e divertida convivência, em especial Luise Castro (minha aluna de iniciação científica favorita), Jonathas Sales, Ramila Macêdo, Lucas Pereira de Alencar, Jamille Alencar, Manoel Paiva, Vitor Luz, Rita Amanda, Glaucia Guedes.

Ao Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira que realizou este projeto comigo, por seu companheirismo, sua dedicação, seu compromisso nos experimentos, suas explicações e principalmente por sua paciência comigo nos meus momentos estresse. Além disso, sua participação da coleta das amostras até os últimos testes no laboratório foram sempre divertidas, o que tornava o trabalho mais leve.

À Paula Bittencourt Vago, primeira aluna do CEMM com quem tive contato e que assim que conheci gostei de imediato, primeiro por também gostar de cavalos e depois por se mostrar uma pessoa amiga, leal e companheira.

À Terezinha de Jesus e ao Daniel Teixeira Lima, pelo suporte proporcionado para a realização de nossas pesquisas.

À minha avó, Helena Ferreira da Cruz (*in memorian*) um exemplo de mulher que nunca desistiu nos momentos difíceis e que me ensinou que quando se tem fé em Deus tudo é possível.

À minha mãe, Margarida Maria da Cruz Marques, pelo amor, atenção e carinho dados a esta filha que é tão chatinha às vezes, e pelo exemplo de mãe, avó, esposa, dona de casa e trabalhadora.

Ao meu tio Jorge Ferreira da Cruz, pelo amor e carinho e por ter me ensinado que estudar é o mais importante a ser feito na vida e por ter me dado a oportunidade de seguir esse seu conselho desde criança.

Ao meu padrasto João Francisco Gonçalves Marques, pelo apoio, carinho e pelas oportunidades de ampliar meus conhecimentos.

Ao meu namorado, Anderson da Silva Bezerra que me acompanha a tantos anos nessa jornada de estudos (maravilhosos 10 anos), pelo seu amor, carinho, companheirismo, apoio e paciência. Enfim por estar sempre presente na minha vida, melhorando cada momento.

À toda a minha família e à família do meu namorado pela amizade e pelo apoio.

Ao meu amigo e companheiro de travessuras Alf (*in memorian*), simplesmente um cão sensacional.

RESUMO

A criação de pequenos ruminantes é uma atividade importante realizada no Brasil, especialmente na região Nordeste. Entretanto, estudos sobre a microbiota fúngica de caprinos e ovinos ainda são escassos. Assim, esta pesquisa objetivou investigar a microbiota de leveduras dos tratos respiratório e digestivo de caprinos (*Capra aegragus hircus*) e ovinos (*Ovis ariesi*), com destaque para a sensibilidade antifúngica, *in vitro*, e a produção de fatores de virulência dos isolados de *Candida*. Para isso, 120 animais (60 caprinos e 60 ovinos) de diferentes fazendas no Estado do Ceará foram avaliados. As amostras foram coletadas a partir das cavidades nasal, oral e retal com *swabs* estéreis, que foram mantidos em tubos contendo 1 mL de solução salina com cloranfenicol. O material foi inoculado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose suplementado com cloranfenicol e a identificação das espécies foi baseada em características macromorfológicas, micromorfológicas e bioquímicas. Foram recuperados 193 isolados de leveduras, dos quais 160 foram *Candida* spp., 17 foram *Trichosporon* spp. e 16 foram *Rhodotorula* spp. Isolados de *Candida* foram obtidos a partir de 45 cabras e 29 ovelhas, enquanto que os de *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp. foram de uma cabra e 15 ovelhas e de duas cabras e 15 ovelhas, respectivamente. Posteriormente 140 *Candida* spp. (21 *C. albicans*, 68 *C. tropicalis*, 12 *C. famata*, 12 Complexo *C. parapsilosis*, 12 *C. krusei*, 12 *C. guilliermondii*, 3 *C. glabrata*) foram submetidas a testes de produção de fosfolipases e proteases e análise de sensibilidade antifúngica, *in vitro*, através do método de microdiluição em caldo, diante anfotericina B, itraconazol e fluconazol, de acordo com a metodologia padrão do documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* e a produção de biofilme foi avaliada em *C. albicans* (n=15) e *C. tropicalis* (n=15). Secreção de fosfolipases foi observada em *C. albicans* (12/21), *C. tropicalis* (8/68) e Complexo *C. parapsilosis* (1/12), enquanto que todas as espécies de *Candida* isoladas mostraram atividade de proteases *C. albicans* (8/21), *C. tropicalis* (54/68), *C. krusei* (11/12), *C. guilliermondii* (2/12), Complexo *C. parapsilosis* (8/12), *C. famata* (10/12), *C. glabrata* (2/3), com 95/140 isolados positivos. Quanto a produção de biofilme, (13/15) cepas de *C. tropicalis* foram classificadas como forte produtoras e (2/15) como produtoras moderadas enquanto que entre as cepas de *C. albicans*, (5/15) foram fortes produtoras, (5/15) produtoras moderadas, (4/15) fracas produtoras e (1/15) não produtora. Os intervalos de MIC encontrados foram 0,03125-1, 0,125-> 64 e 0,03125-> 16 µg / mL para a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, respectivamente. A resistência a ambas as drogas azólicas foi observada em *C. albicans* (9/21) e *C. tropicalis* (12/68), resistência ao fluconazol foi observada em *C. albicans* (1/21),

Complexo *C. parapsilosis* (2/12) e *C. tropicalis* (6/68) e resistência ao itraconazol foi observada em (3/68) *C. tropicalis*. No geral, observou-se a predominância de *Candida* spp. como parte da microbiota da cavidade nasal, oral e retal de caprinos e ovinos, inclusive com cepas de *C. albicans* e de *C. tropicalis* resistentes a azólicos, secretoras de fosfolipases e de proteases, bem como produtoras de biofilme.

Palavras-chave: Caprinos. Ovinos. Leveduras. Fatores de virulência. Sensibilidade antifúngica.

ABSTRACT

Small ruminant farming is an important activity performed in Brazil, especially in the Northeast region. However, studies on the fungal microbiota of goats and sheep are scarce. Thus, this project aimed at investigating the yeast microbiota of the respiratory and digestive tracts of goats (*Capra aegragus hircus*) and sheep (*Ovis ariesi*), with emphasis on the *in vitro* antifungal susceptibility and the production of virulence factors by the *Candida* isolates. For such, 120 animals (60 goats and 60 sheep) from different farms in the State of Ceará were assessed. The samples were collected from nasal, oral and rectal cavities with sterile swabs, which were maintained in tubes containing 1 mL of saline solution supplemented with chloramphenicol. The material was inoculated on Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar supplemented with chloramphenicol and the species identification was based on macromorphological, micromorphological and biochemical features. A total of 193 yeast isolates were recovered, out of which 160 were *Candida* spp., 17 *Trichosporon* spp. and 16 *Rhodotorula* spp. *Candida* isolates were isolated from 45 goats and 29 sheep, while those of *Rhodotorula* spp. and *Trichosporon* spp. were from one goat and 15 sheep and 2 goats and 15 sheep, respectively. Afterwards, 140 *Candida* spp. isolates (21 *C. albicans*, 68 *C. tropicalis*, 12 *C. famata*, 12 complex *C. parapsilosis*, 12 *C. krusei*, 12 *C. guilliermondii*, 3 *C. glabrata*) were tested for production of phospholipases and proteases and antifungal susceptibility analysis, *in vitro*, through the broth microdilution method with amphotericin B, itraconazole and fluconazole, according to the standard methodology of the Clinical Laboratory Standards Institute. Biofilm production was evaluated among *C. albicans* (n=15) and *C. tropicalis* (n=15). Phospholipase secretion was observed in *C. albicans* (12/21), *C. tropicalis* (8/68) and complex *C. parapsilosis* (1/12), while all of the *Candida* species showed proteases activity, *C. albicans* (8/21), *C. tropicalis* (54/68), *C. krusei* (11/12), *C. guilliermondii* (2/12), complex *C. parapsilosis* (8/12), *C. famata* (10/12), *C. glabrata* (2/3), with 95/140 positive isolates. Among biofilm production, *C. tropicalis* strains (13/15) were classified as strong producer and (2/15) moderate producers, while those of *C. albicans* were classified as strong producers (5/15), moderate producers (5/15), weak producers (4/15) and non-producer (1/15). The MIC ranges were 0.03125-1, 0.125->64 and 0.03125->16 µg/mL for amphotericin B, fluconazole and itraconazole, respectively. Resistance to both azole drugs was observed among *C. albicans* (9/21) and *C. tropicalis* (12/68), resistance to fluconazole was observed among *C. albicans* (1/21), complex *C. parapsilosis* (2/12) and *C. tropicalis* (6/68) and resistance to itraconazole was observed among (3/68) *C. tropicalis*. Overall, the data showed a

predominance of *Candida* spp. as part of the microbiota of the nasal, oral and rectal cavities of goats and sheep, including *C. albicans* and *C. tropicalis* strains azole resistant, phospholipase and proteases secreting, as well as biofilm producing.

Keywords: Goats. Sheep. Yeasts. Virulence factors. Antifungal susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prova de assimilação de carboidrato de <i>Candida</i> spp. Observa-se uma turvação do meio aonde a levedura avaliada assimilou os açúcares.....	20
Figura 2: Prova de assimilação de nitrogênio de <i>Candida</i> spp. com crescimento fúngico na peptona (P), que é a fonte de nitrogênio controle do teste.....	21
Figura 3: Prova de produção de urease em meio ágar ureia de Christensen, resultado positivo para a produção da enzima em <i>Trichosporon</i> spp.....	21
Figura 4: Prova de assimilação de nitrogênio de <i>Rhodotorula</i> spp., com crescimento fúngico no nitrato (N) e na peptona (P), sendo esta última o controle do teste.....	22
Figura 5: Produção de fosfolipases por espécies de <i>Candida</i> em meio ágar gema de ovo. Observam-se halos esbranquiçados e opacos ao redor das colônias, que indicam a produção da enzima. A linha preta representa o diâmetro da colônia e a linha vermelha o diâmetro do halo.	26
Figura 6: Produção de proteases por espécies de <i>Candida</i> em meio ágar contendo albumina sérica bovina. Observam-se halos esbranquiçados e opacos ao redor das colônias, que indicam a produção da enzima. A linha preta representa o diâmetro da colônia e a linha vermelha o diâmetro do halo.....	28

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Table 1 - Frequency of yeasts isolated from the different collection sites of goats and sheep.....	57
Table 2 - Production of phospholipases and proteases by <i>Candida</i> spp. from nasal, oral and rectal cavities of goats and sheep	58
Table 3 - <i>In vitro</i> antifungal susceptibility of <i>Candida</i> species isolated from nasal, oral and rectal cavities of goats and sheep.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A caprinovinocultura no Nordeste	18
2.2 Leveduras e sua relação com caprinos e ovinos	19
2.3 Fatores de virulência de <i>Candida</i> spp.....	24
2.4 Monitoramento de resistência antifúngica em <i>Candida</i> spp.	31
3. JUSTIFICATIVA	34
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo Geral	36
5.2 Objetivos Específicos	36
6. CAPÍTULO 1.....	37
7. CONCLUSÕES.....	60
8. PERSPECTIVAS.....	61
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A criação de caprinos e de ovinos é uma atividade agropecuária praticada em todo o mundo, para exploração de pele, leite e carne. Esta atividade vem se destacando e já se tornou uma importante fonte de renda para os produtores rurais. No Brasil, onde há aproximadamente 9.386.316 caprinos e 17.668.063 ovinos (IBGE, 2011) a caprinovinocultura tem se expandido em todos os estados brasileiros, contribuindo para o desenvolvimento sócio-econômico do país e, de modo particular, da região Nordeste, aonde estão 8.538.290 caprinos e 10.112.726 ovinos, dentre os quais 1.044.998 caprinos e 2.142.567 ovinos estão no Estado do Ceará (IBGE, 2011).

O crescimento da exploração de pequenos ruminantes no Brasil está transformando o sistema de produção da pecuária local. No Nordeste do Brasil a atividade apresenta grande importância social, pois os rebanhos fornecem carne e leite de ótima qualidade, por um baixo custo, trazendo alternativas alimentares para milhares de habitantes rurais, além de constituir-se uma fonte de renda (ALENCAR et al., 2010).

De maneira geral, nessa região brasileira, esses animais são explorados tradicionalmente em sistemas de criação extensivos com reduzida adoção de tecnologias, caracterizado por alimentação deficiente, além de manejo e profilaxia inadequados, o que resulta em baixa produtividade e resultados econômico-financeiros insatisfatórios para o produtor (FILGUEIRA et al., 2009). Dessa forma essa atividade tem requerido novos conhecimentos técnicos e científicos para que possa ser desenvolvida em todo seu potencial (COSTA et al., 2010).

Várias enfermidades afetam esses rebanhos, dentre as quais estão as infestações parasitárias e infecções bacterianas e fúngicas, que interferem na produção do plantel. Assim, falhas no manejo desses animais contribuem para a elevada taxa de mortalidade e o baixo desfrute da atividade na região (ALENCAR et al., 2010). Nesse contexto, torna-se fundamental a realização de estudos que contribuam com o aumento do conhecimento sobre a sanidade desses animais.

De forma geral, são poucos os trabalhos que abordam sobre infecções fúngicas e microbiota fúngica por leveduras nas demais espécies animais, quando comparados a humanos e aves (WROBEL et al., 2008). Nesses estudos, espécies do gênero *Candida* são frequentemente isoladas e comumente relacionadas a enfermidades tanto em animais como no homem. Assim, nos últimos anos, tornou-se uma preocupação de diferentes pesquisadores, conhecer o perfil de sensibilidade de cepas de *Candida* spp. diante das drogas antifúngicas

comumente utilizadas, para monitorar a ocorrência do fenômeno de resistência nesse gênero de leveduras. Adicionalmente, a produção de diferentes fatores de virulência por espécies desse gênero têm sido investigada, merecendo destaque a produção de fosfolipases, de proteases e de biofilme, que estão relacionadas ao estabelecimento de infecções por estas leveduras no hospedeiro.

Diante do exposto, o conhecimento da microbiota fúngica por leveduras dos tratos respiratório superior e digestório dos pequenos ruminantes, da produção *in vitro* de fatores de virulência e do perfil de sensibilidade a antifúngicos por cepas de *Candida* spp. isoladas desses animais torna-se importante para um melhor conhecimento da relação parasito-hospedeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A caprinovinocultura no Nordeste

As ovelhas domésticas são prováveis descendentes da ovelha selvagem Mouflon (*Ovis aries orientalis*) originários da Ásia (MCMANUS et al., 2010a). A atividade ovina no país se desenvolveu principalmente em regiões em que as condições ecológicas permitiram a exploração de pastagens naturais. De modo semelhante, os caprinos naturalizados no Brasil são descendentes de animais trazidos pelos colonizadores portugueses logo após o descobrimento, e desenvolveram uma alta capacidade de sobrevivência e alta prolificidade na região Nordeste, devido a um processo de seleção natural durante várias gerações (MCMANUS et al., 2010b).

O Nordeste tem sido destacado durante séculos como área de vocação para a exploração de ruminantes domésticos, notadamente caprinos e ovinos, pelo potencial da vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos animais destas espécies. Os ovinocultores e caprinocultores da região tradicionalmente adotam os sistemas extensivos de produção e tem na caatinga o principal suporte forrageiro (COSTA et al., 2010a). No entanto, em épocas de seca, falta de alimentos e ausência de práticas de conservação de forragem tornam os produtores rurais extremamente dependentes de concentrados comerciais. As irregularidades das precipitações associadas às temperaturas elevadas durante o dia e às características físicas dos solos, em geral rasos e pedregosos, apresentam-se como fatores limitantes da produção agropecuária nordestina, pois influenciam diretamente na fisiologia dos animais e na produção vegetal para alimentação do rebanho (GOULART et al., 2009).

A criação de caprinos e de ovinos é uma atividade que tem uma grande identificação com a agricultura familiar e nessas pequenas criações a mão de obra familiar é utilizada na execução das atividades e o custo com infraestrutura é baixo, visto o pequeno porte dos animais. No entanto, para ser economicamente viável, a caprinovinocultura deve ser praticada em larga escala e na agricultura familiar, a atividade é vista mais como uma atividade de complementação de renda, poupança ou fonte de alimento, do que como a principal fonte de renda para a manutenção da família (MALA et al., 2009).

Para viabilizar a caprinovinocultura na agricultura familiar é necessária a adoção de medidas para redução dos custos de implantação e manutenção do rebanho e aumento da produtividade. Entre essas medidas destacam-se a redução do custo com instalações e

alimentação e a adoção de medidas sanitárias que visem à redução da mortalidade e melhorem o desempenho dos animais (MALA et al., 2009).

Segundo Alencar et al. (2010), para a estruturação da cadeia produtiva, visando um produto de boa qualidade, é importante o estabelecimento de boas práticas de manejo nutricional, reprodutivo e sanitário do rebanho, sendo o manejo sanitário adequado um importante fator para o sucesso dos criatórios de pequenos ruminantes, uma vez que falhas interferem negativamente na produtividade do plantel, causando prejuízo financeiro para os produtores. Dessa forma, para se obter uma boa produtividade na criação desses animais, precisa-se dispor de condições sanitárias mínimas para atingir um bom desempenho (FILGUEIRA et al., 2009; ALENCAR et al., 2010).

2.2 Leveduras e sua relação com caprinos e ovinos

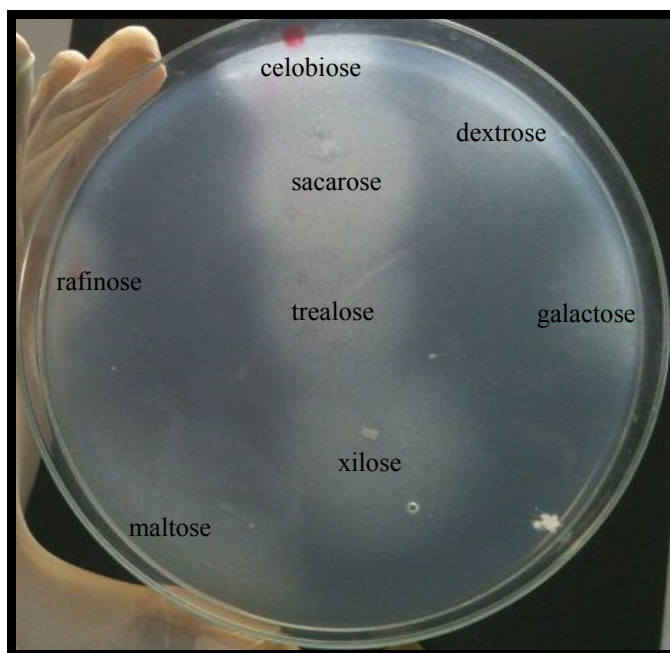
As leveduras são definidas como fungos unicelulares, brancos ou avermelhados, cuja unidade funcional é o blastoconídio. A maioria das leveduras, com relevância clínica, se reproduz por processos vegetativos, cujos principais mecanismos são o brotamento celular, a fissão celular e a formação de artroconídios (DE HOOG et al., 2000). De acordo com De Hoog et al., 2000, levedura é um termo descritivo para qualquer fungo que se reproduz por brotamento. As espécies denominadas de leveduras se encontram classificadas na divisão *Ascomycota*, na qual podemos citar os gêneros *Candida* e *Saccharomyces* e da divisão *Basidiomycota*, na qual podemos citar os gêneros *Trichosporon* e *Rhodotorula* (DE HOOG et al., 2000).

O diagnóstico laboratorial das leveduras é realizado por meio da observação da macromorfologia e da micromorfologia das colônias e também através de testes bioquímicos. Leveduras do gênero *Candida* no geral, apresentam colônias lisas, úmidas ou secas, de coloração branca ou creme. A micromorfologia pode ser observada a partir da realização de microcultivo em meio ágar-fubá acrescido de Tween 80, que promove a formação de estruturas fúngicas características. E dentre os testes bioquímicos que podem ser realizados estão o perfil de assimilação de carboidratos (auxonograma) (FIG. 1) e de nitrogênio (FIG. 2), fermentação de carboidratos (zimograma) e a capacidade dos isolados de produzir a enzima urease, que é realizado no meio ureia de Christensen. Este é um teste colorimétrico que permite a distinção a qual divisão pertence o microrganismo, *Ascomycota* (*Candida* spp.) que são negativos para a produção da enzima ou *Basidiomycota* (*Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp.) que são positivos para a produção enzimática. Ademais, deve ser realizada

a observação do crescimento das colônias em meio cromogênico, que objetiva identificar colônias mistas e permite um diagnóstico presuntivo rápido (DE HOOG et al., 2000).

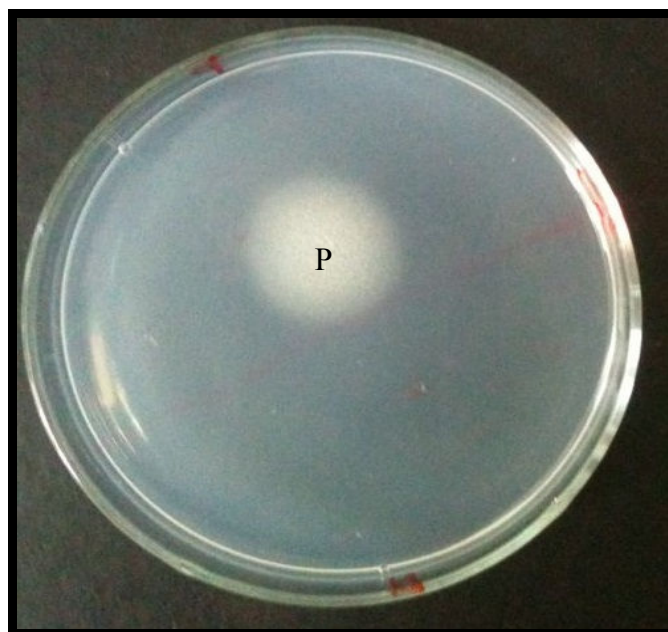
Já as leveduras de *Trichosporon* spp. apresentam colônias rugosas, secas de coloração branca a creme. E sua identificação é baseada na observação macromorfológica das colônias, assim como na micromorfológica, que é realizada por meio do cultivo em lâmina em meio ágar extrato de malte a 2%. Adicionalmente também são avaliados o perfil de assimilação de carboidratos e de nitrogênio, e a prova da produção de urease em meio ureia de Christensen (FIG. 3) (DE HOOG et al., 2000).

Para a identificação de *Rhodotorula*, tem-se como base a observação da macromorfologia, na qual as colônias geralmente apresentam coloração alaranjada, e a observação da micromorfologia, que é realizada em meio ágar extrato de malte a 2%. No processo de identificação dessas leveduras também devem ser realizados o auxonograma, assimilação de nitrogênio (FIG. 4) e a avaliação da produção de urease, que para esse gênero tem resultado positivo (DE HOOG et al., 2000).



Fonte: CEMM, 2013 – foto realizada pela autora

Figura 1: Prova de assimilação de carboidrato de *Candida* spp. Observa-se uma turvação do meio aonde a levedura avaliada assimilou os açúcares.



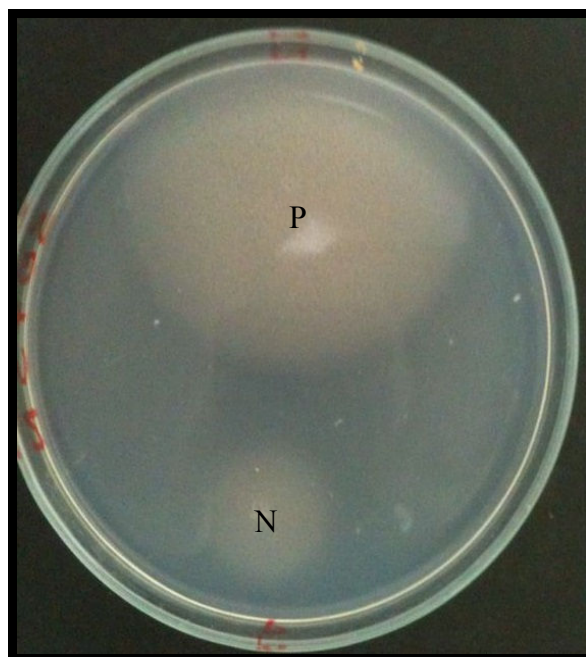
Fonte: CEMM, 2013 – foto realizada pela autora

Figura 2: Prova de assimilação de nitrogênio de *Candida* spp. com crescimento fúngico na peptona (P), que é a fonte de nitrogênio controle do teste.



Fonte: CEMM, 2013 – foto realizada pela autora

Figura 3: Prova de produção de urease em meio ágar ureia de Christensen, resultado positivo para a produção da enzima em *Trichosporon* spp.



Fonte: CEMM, 2013 – foto realizada pela autora

Figura 4: Prova de assimilação de nitrogênio de *Rhodotorula* spp., com crescimento fúngico no nitrato (N) e na peptona (P), sendo esta última o controle do teste.

As leveduras são relatadas como patógenos (CASTELO-BRANCO et al., 2013) e como componentes da microbiota de algumas espécies animais (BRITO et al., 2009; SIDRIM et al., 2010; BRILHANTE et al., 2011; BRILHANTE et al., 2012; BRILHANTE et al., 2013; CORDEIRO et al., 2013) porém, de uma forma geral, estudos sobre a microbiota fúngica por leveduras são pouco descritos em mamíferos saudáveis e, são poucos os estudos que visam conhecer a microbiota por leveduras dos diferentes sistemas orgânicos dos pequenos ruminantes. Em um estudo realizado por Hassan et al. (2012), por exemplo, os autores encontraram *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa* e *T. cutaneum* em amostras coletadas das cavidades nasais e vaginais e em amostras de fezes e de leite de caprinos e de ovinos saudáveis.

Sabe-se que grande parte das infecções em animais são causadas por microrganismos que compõem a microbiota (COUTINHO et al., 2006; SPANAMBERG et al., 2009). Spanamberg et al. (2009), por exemplo, relataram casos de mastite micótica em ruminantes, causadas, principalmente, por leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, porém os autores mencionam que *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp. também podem estar associadas a alterações clínicas da glândula mamária. Adicionalmente, Hassan et al. (2012) relataram a presença de *C. neoformans* em amostras de leite de ovelhas com mastite.

O manejo sanitário adequado tem um papel preponderante no sucesso dos criatórios de pequenos ruminantes, uma vez que falhas interferem negativamente na produtividade da criação de caprinos e ovinos. Para lograr êxito na arte de criar animais, precisa-se dispor de condições sanitárias mínimas para atingir uma boa produtividade (ALENCAR et al., 2010). As doenças interferem diretamente na produção desses animais, sejam elas infecciosas, parasitárias, nutricionais, ou de outra natureza, e aquelas que acometem os sistemas respiratório e digestório representam um sério problema para a caprinovinocultura, uma vez que podem levar a grandes perdas econômicas, devido aos elevados índices de morbidade e de mortalidade (ANDRADE et al., 2012; ROSA et al., 2013).

O sistema respiratório é um dos sistemas mais vulneráveis a injúrias em decorrência da sua exposição a numerosas partículas com potencial nocivo, tais como agentes infecciosos, alergênicos, físicos e químicos, sendo frequente a ocorrência de processos inflamatórios (PUGH, 2005). Dependendo da agressividade do agente e da susceptibilidade do hospedeiro, os mecanismos de defesa do aparelho respiratório podem não ser suficientes, possibilitando a instalação de determinadas enfermidades (CARLTON et al., 1998).

No estudo sobre a prevalência de leveduras em pequenos ruminantes saudáveis, realizado por Hassan et al. (2012) foi isolada *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* da cavidade nasal de caprinos e ovinos. Os autores também relataram o isolamento de *Rhodotorula mucilaginosa* da cavidade nasal de caprinos e ovinos. Nos animais clinicamente doentes, com enfermidades de etiologias diversas, não-fúngicas, também foram isoladas as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *R. mucilaginosa* da cavidade nasal de caprinos e ovinos, mas *C. parapsilosis* foi isolada somente em ovinos.

Infecções por leveduras menos comumente encontradas na microbiota do trato respiratório desses animais também são relatadas, como nos casos de criptococose em caprinos (OLIVEIRA et al., 2011) e ovinos (PEREIRA et al., 2005; SILVA et al., 2009), sendo *Cryptococcus gattii* isolado de caprinos com doença pulmonar grave (BARÓ et al., 1998; TORRES-RODRIGUES et al., 2006). *C. neoformans* também foi isolado no trabalho de Hassan et al. (2012) a partir da cavidade nasal de caprinos com distúrbios respiratórios.

Nos ruminantes, de uma forma geral, o sistema digestório possui características próprias bem definidas, o que lhes permite aproveitar os nutrientes contidos em alimentos fibrosos. Isto ocorre graças à ação de microrganismos que habitam esse sistema, além da ação mecânica executada através do processo de ruminação. O bom funcionamento ruminal é de fundamental importância para a saúde dos ruminantes e para que isso ocorra os

microrganismos que compõem a microbiota do rúmen devem estar em equilíbrio (CUNNINGHAM, 2008).

No rúmen de caprinos, essa microbiota é composta por fungos anaeróbios dos gêneros *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, e *Neocallimastix* (ABRÃO et al., 2010). Porém já foi relatada a presença das leveduras *Pichia membranifaciens* e *Candida tropicalis* no rúmen de caprinos, no entanto não se sabe ao certo o papel desses microrganismos no funcionamento rumenal desses animais (ABRÃO et al., 2011). Adicionalmente, visando a uma melhora na produtividade desses animais, leveduras tem sido introduzidas na alimentação animal, como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Após se instalarem e proliferarem no trato gastrointestinal, essas leveduras promovem o melhor funcionamento ruminal, aumentando a eficiência de utilização da energia e dos nutrientes no rúmen. No entanto, as consequências da introdução dessas leveduras na alimentação desses animais, para a microbiota do trato gastrointestinal, ainda não são conhecidas (MARTIN & NISBET, 1992; WALLACE, 1994; GRAMINHA et al., 2011).

Hassan et al. (2012) estudando pequenos ruminantes clinicamente saudáveis isolaram nas fezes desses animais *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Nas fezes de ovinos, os autores também encontraram *R. mucilaginosa* e *T. cutaneum*. Nos animais portadores de doenças de etiologias diversas, não-fúngicas, os autores também isolaram *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* de fezes de caprinos e ovinos e *R. mucilaginosa* e *T. cutaneum* apenas das fezes de caprinos.

A presença de leveduras como parte da microbiota também é relatada em várias outras espécies animais como cães (BRITO et al., 2007; BRITO et al. 2009), aves (SIDRIM et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012), camarões (BRILHANTE et al., 2011), cavalos (CORDEIRO et al., 2013) e aves (BRILHANTE et al., 2013), sendo mais frequente o isolamento de *Candida* spp. Assim o conhecimento sobre presença dessa levedura em caprinos e ovinos pode auxiliar no planejamento de medidas de sanidade nas criações desses animais, contribuindo com o melhoramento da produtividade do rebanho, e tornando a atividade mais lucrativa para o produtor.

2.3 Fatores de virulência de *Candida* spp.

Infecções por leveduras em mamíferos, inclusive aquelas causadas pelo gênero *Candida*, são pouco frequentes, quando comparados a humanos e a aves (WROBEL et al., 2008). No entanto, nos últimos anos, tem sido observado um aumento considerável de relatos

de candidíase, com diferentes manifestações clínicas e acometendo diversas espécies animais (BRITO et al., 2009).

As leveduras do gênero *Candida* podem provocar doenças cutâneas ou sistêmicas no homem e em outros animais, que podem ocorrer de forma primária ou secundária, devido ao uso prolongado de antibióticos, a deficiências nutricionais, a infecções virais e/ou bacterianas, ao estresse crônico, dentre outros fatores que deprimam o sistema imunológico (LACAZ et al., 2002; SANTIN et al., 2007; VIEIRA & COUTINHO, 2009). A disseminação de leveduras presentes no trato gastrointestinal de alguns animais pode representar um problema na medicina humana e veterinária (MAIA, 2009).

Desta forma, a passagem de microrganismos comensais a agentes patogênicos, sob condições hospedeiras favoráveis, depende de vários fatores de virulência (COSTA et al., 2009), que favorecem a instalação do microrganismo e a invasão tecidual no hospedeiro (MANE et al., 2010; YENISEHIRLI et al., 2010).

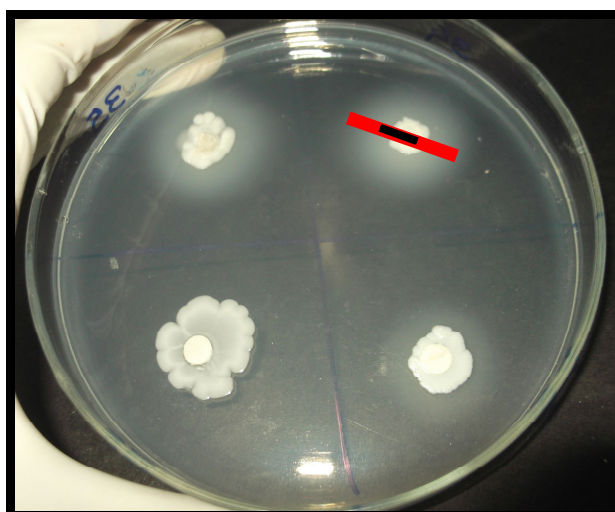
Diversas espécies de *Candida*, por exemplo, possuem fatores de virulência, como a capacidade de adesão ao tecido do hospedeiro, estabelecendo ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície do patógeno e da célula epitelial (GHANNOUM, 2000). Dentre estes fatores podemos citar a formação de tubo germinativo, que consiste na transição morfológica da levedura para sua forma filamentosa, a qual possui maior capacidade de aderir e penetrar nas células do hospedeiro. A variabilidade fenotípica, que altera a morfologia da colônia e a modulação antigênica, que consiste na modificação de antígenos de parede também são fatores que aumentam a virulência dessas leveduras (IBRAHIM et al., 1995; GHANNOUM, 2000; ZENG et al., 2008; ALBY & BENETT, 2009; VIEIRA & COUTINHO, 2009; YENİŞEHİRLİ et al., 2010).

Dentre os fatores de virulência, destacam-se as enzimas hidrolíticas que atuam no meio extracelular digerindo fosfolipídios e proteínas presentes na membrana celular dos tecidos do hospedeiro, facilitando a penetração do microrganismo e favorecendo sua patogenicidade (COSTA et al., 2010b). As fosfolipases fazem parte de um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam uma ou mais ligações éster nos glicerofosfolipídios, principais componentes químicos das membranas celulares hospedeiras. Estas enzimas são denominadas com letras (A, B, C, e D) variando de acordo com o sítio-alvo de ligação na molécula do fosfolipídio além disso, algumas recebem números após as letras para identificar subtipos de fosfolipases, (GHANNOUM, 2000). Com a taxa de produção dessa enzima podemos estabelecer um valor preditivo de mortalidade (IBRAHIM et al., 1995; SAMARANAYAKE

et al., 2005). As fosfolipases já foram implicadas como fatores de virulência de vários organismos, dentre eles de *Candida* spp., sendo que o tipo de fosfolipases implicada na virulência varia de acordo com o microrganismo (IBRAHIM et al., 1995; GHANNOUM, 2000).

A elevada atividade de fosfolipases está correlacionada com outros fatores de virulência, como ao aumento da capacidade de aderência às células epiteliais e da mortalidade, em modelos animais (SAMARANAYAKE et al., 2005; COSTA et al., 2009) e à maior capacidade de invasão dos tecidos hospedeiros e de formação de tubo germinativo (SAMARANAYAKE et al., 2005).

Um método para a detecção da atividade de fosfolipases em *C. albicans*, de fácil execução e reprodutibilidade foi descrito por Price, Wilkinson e Gentry em 1982. O método consiste em semear as cepas em placas contendo meio ágar Sabouraud dextrose, acrescido de gema de ovo que é uma rica fonte de fosfolipídios, este se tornou um método clássico na triagem de cepas de *Candida* spp. para produção de fosfolipases por diversos pesquisadores (FIG. 5). Uma zona de precipitação densa a redor da colônia é observado nos isolados positivos, possivelmente, devido à formação de complexos de cálcio com os ácidos graxos, liberados em decorrência da ação enzimática sobre os fosfolipídios do meio (GHANNOUM, 2000; CAFARCHIA et al., 2008; ZENG et al., 2008; COSTA et al., 2009; VIEIRA & COUTINHO, 2009).



Fonte: CEMM, 2013 – foto realizada pela autora

Figura 5: Produção de fosfolipases por espécies de *Candida* em meio ágar gema de ovo. Observam-se halos esbranquiçados e opacos ao redor das colônias, que indicam a produção da enzima. A linha preta representa o diâmetro da colônia e a linha vermelha o diâmetro do halo.

O grau de atividade de fosfolipases (Pz) é definido obtendo-se a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total, formado por colônia e zona de precipitação. Assim, quando Pz é igual a um ($Pz = 1$), não há produção de fosfolipases extracelular, quando Pz é menor que um ($Pz < 1$), há atividade da enzima, sendo que $Pz \geq 0,64$ demonstra uma baixa atividade e $Pz < 0,64$ demonstra uma alta atividade enzimática (GHANNOUM, 2000; VIEIRA & COUTINHO, 2009). No entanto, o método desenvolvido por Price, Wilkinson e Gentry (1982) não é capaz de diferenciar a produção de lipases e fosfolipases, por isso é utilizado somente como método de triagem inicial. Além disso, para as cepas com baixa produção enzimática é necessário utilizar métodos mais sensíveis, como ensaios colorimétricos e radiométricos específicos (GHANNOUM, 2000; COSTA et al., 2009).

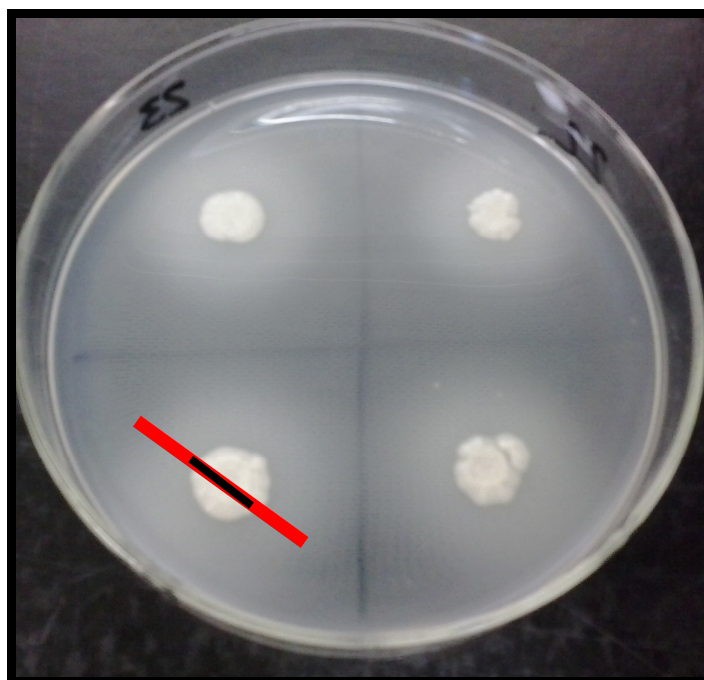
A atividade proteolítica tem acenado como potencial fator de virulência em fungos. Essas enzimas atuam no colágeno, elastina, imunoglobulina, fibrinogênio, e fatores do complemento, causando danos teciduais, fornecendo nutrientes para o patógeno e proteção contra o sistema imune do hospedeiro (MONOD et al., 2002; MONOD, 2008).

A atividade de proteases também já foi descrita em *Candida* spp., onde essas enzimas colaboram para a invasão tecidual e colonização do organismo e permitem um maior número de fontes de nitrogênio disponíveis para o fungo, por degradação de proteínas (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; MOHAN & BALLAL, 2008). Estas enzimas se diferenciam quanto à especificidade e mecanismo de ação, sendo classificadas de acordo com seu mecanismo catalítico em serina, cisteína, metaloproteinases e aspartil proteinases.

As aspartil proteinases (SAPs) compõem uma família de 10 isoenzimas secretadas por *C. albicans*, e são consideradas importantes fatores de virulência da espécie, aumentando o potencial de invasão no hospedeiro (MONOD et al. 2002). A família de genes SAP inclui, pelo menos, dez genes diferentes SAP1-SAP10 que codificam enzimas com funções semelhantes, mas propriedades moleculares diferentes, como peso molecular, ponto isoelétrico e pH para a atividade ideal (NAGLIK et al., 2003). Também é relatado que, além de *C. albicans*, essas enzimas são produzidas por *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002).

Os métodos mais utilizados para avaliar a produção de proteases são o espectrofotométrico e em placas (FIG. 6) (VIDOTTO et al., 2004; AKCAĞLAR et al., 2011). O primeiro consiste basicamente na leitura da absorbância de um inóculo da levedura através do espectrofotômetro, a um determinado comprimento de onda. Outro método consiste na avaliação da produção da enzima em meio sólido contendo albumina sérica bovina, sendo a

positividade observada com a formação de um halo de proteólise ao redor da colônia (VIDOTTO et al., 2004). A produção é mensurada através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da zona de proteólise ao redor da colônia (Pz), assim quando o $Pz=1$ não houve produção da enzima e, quanto menor o Pz, maior a produção enzimática (VIDOTTO et al., 2004).



Fonte: CEMM, 2013 – foto realizada pela autora

Figura 6: Produção de proteases por espécies de *Candida* em meio ágar contendo albumina sérica bovina. Observam-se halos esbranquiçados e opacos ao redor das colônias, que indicam a produção da enzima. A linha preta representa o diâmetro da colônia e a linha vermelha o diâmetro do halo.

Biofilme é uma comunidade sésil caracterizada por células que formam microcolônias e que estão aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, embebidas numa matriz exopolimérica de substâncias extracelulares exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética (COSTERTON et al. 2003).

Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são importantes no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (KUHN et al., 2002). Os microrganismos associados em biofilmes exibem um comportamento diferente dos microrganismos na forma planctônica, no que diz respeito ao crescimento e à capacidade para resistir aos agentes biocidas. As infecções associadas à utilização de

implantes médicos invasivos estão relacionadas com a formação de biofilmes nesses dispositivos. As células microbianas podem invadir os tecidos em contacto com o dispositivo ou serem liberadas na corrente sanguínea, causando infecção. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o dispositivo e do meio ou fluido ao quais os microrganismos estão expostos (DONLAN, 2001).

A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos e às defesas naturais do organismo. Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos podem estar relacionados às limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, às alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (DUNNE, 2003).

O processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana seguida do processo de maturação do biofilme. A fase inicial de adesão caracteriza-se pela aproximação do microrganismo à superfície de adesão. Uma vez atingida uma distância, a interação entre o microrganismo e a superfície depende do somatório das forças atrativas e repulsivas geradas entre estas duas partes e este processo é denominado de adesão primária. (COSTERTON et al., 2003; ZOBELL, 2003).

Em um estágio mais avançado do processo de adesão, é estabelecido um conjunto de fenômenos que caracterizam a adesão secundária, na qual os microrganismos fracamente aderidos consolidam o processo de adesão, produzindo exopolissacarídeos que formam complexos com os materiais da superfície onde aderem e/ou através de receptores específicos localizados na superfície das paredes celulares e após a adesão à superfície, tem início o processo de maturação do biofilme (HAWSER & DOUGLAS, 2003).

Uma vez atingida a maturação, são geradas no biofilme uma série de alterações na forma de crescimento e cooperação fisiológica entre as células (COSTERTON et al., 2003). Em um biofilme maduro, as células mais próximas da superfície tornam-se inativas, e em uma fase posterior morrem devido à falta de nutrientes, diminuição do pH, diminuição da concentração de oxigênio e ao acúmulo de produtos tóxicos resultantes no metabolismo celular. No final do processo de maturação, o biofilme acaba por atingir uma massa crítica e é estabelecido um equilíbrio dinâmico no qual o crescimento de células é compensado pela libertação de células planctônicas disponíveis para a colonização de outras superfícies. (LA TOURETTE PROSSER et al., 2003).

Uma característica particular dos biofilmes formados por *Candida* são as diversas formas que podem estar presentes no biofilme formado por cada uma das espécies. Os biofilmes maduros com um crescimento de 48 horas consistem numa rede densa de células sob a forma de blastoconídios, de hifas e de pseudo-hifas (HAWSER & DOUGLAS, 2003).

O crescimento do biofilme está limitado pela existência de nutrientes no meio ambiente e pela difusão desses mesmos nutrientes através da matriz do biofilme, bem como pela liberação de resíduos. E sua maturação é também controlada por outros fatores, os quais são o pH interno, a difusão do oxigênio dissolvido e a osmolaridade (O'TOOLE & KOLTER, 2003).

O biofilme é um importante fator de virulência do gênero *Candida*, pois confere resistência a terapia antifúngica devido a limitação da penetração de substâncias através da de sua matriz (SILVA et al., 2011). Os componentes da matriz dos biofilmes formados pelas espécies de *Candida* interferem na resistência a agentes antifúngicos, como exemplo, podemos citar o biofilme produzido por *C. tropicalis*, que é menos susceptível a agentes antifúngicos do que o biofilme de *C. albicans*, possivelmente devido a presença do polímero hexosamina na matriz do biofilme (AL-FATANI & DOUGLAS, 2006). Dessa forma tem-se buscado um maior conhecimento sobre a patogenicidade da formação do biofilme dentre as leveduras gênero *Candida* e dentre as espécies mais estudadas estão *C. albicans* e *C. tropicalis*.

A maioria dos casos de candidose ocorre devido à infecção por *C. albicans*, no entanto, nos últimos anos houve um aumento no número de infecções causadas por espécies de *Candida* não *albicans* e dentre estas espécies está a *C. tropicalis* que emergiu como o segundo ou terceiro agente mais comum de candidemia, principalmente em pacientes oncológicos, e sendo frequentemente associada com infecções nosocomiais do trato urinário (KOTHAVADE et al., 2010).

Segundo Stepanovic et al. (2000), a avaliação da formação de biofilme pode ser mensurada de várias formas, sendo mais frequentemente demonstrada pelo teste de tubo em que a película que reveste uma cultura bacteriana ou fúngica no tubo é corada com um corante catiônico e visualmente dividida em escalas, ou pelo teste em placa de microtitulação, em que a densidade óptica do biofilme corado é determinada por espectrofotometria.

2.4 Monitoramento de resistência antifúngica em *Candida* spp.

A resistência aos derivados azólicos começou a ser observada com o aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, entre pacientes HIV positivos que apresentavam candidíase oral e esofágica, previamente à introdução de terapia anti-retroviral (JOHNSON, 2008; KANAFANI & PERFECT, 2008).

Estes acontecimentos impulsionaram uma busca por uma abordagem terapêutica efetiva para o paciente, visando ao aumento da sua sobrevida. Assim, a busca de informações sobre o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos da rotina clínica, principalmente dos fungos mais comumente envolvidos em infecções, tem sido de grande importância na elaboração de planos terapêutico e profilático adequado à região.

Em 1985, o comitê da Área de Micologia do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), então conhecido como National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), publicou o seu primeiro relatório, no qual foram exibidos os resultados de um pequeno estudo colaborativo. Constatou-se que 20% dos laboratórios membros da instituição realizavam testes de sensibilidade a agentes antifúngicos, na maioria das vezes, com *Candida* spp., empregando o método de diluição em caldo, e obtinham resultados de concentração inibitória mínima (CIM) discrepantes. Assim, decidiu-se desenvolver e padronizar uma metodologia reprodutível e exequível para laboratórios de rotina. Em 1997, após extenso trabalho de padronização, foi aprovada a utilização dos métodos de microdiluição (documento M27-A) para a determinação da sensibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos, especificando seus pontos de corte. Em 2002, a Norma M27-A2 padronizou as faixas de referência de CIM 24 e 48 horas, para drogas previamente estabelecidas. Em 2009, foi publicado o documento M27-A3, que traz como principal mudança a alteração na percentagem de leitura em relação aos derivados azólicos, onde a leitura para concentração inibitória mínima mudou de 80% de inibição para 50% em relação ao crescimento fúngico (CLSI, 2008).

O teste de sensibilidade a antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo é realizado em placas acrílicas estéreis de 96 poços em formato de U. Nestas placas o inóculo é diluído a uma concentração definida e igual para os diversos poços, e então estes inóculos, são expostos a drogas antifúngicas com concentrações sucessivamente decrescentes, sendo possível observar o efeito destes fármacos sobre o crescimento fúngico, identificando assim a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo, denominada de concentração inibitória mínima (CIM) padronizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

No geral, a taxa de resistência aos azólicos permanece baixa, entre a maioria das espécies de *Candida* spp. invasoras, variando de 1- 2,1% em *C. albicans*, de 0,4-4,6% no Complexo *C. parapsilosis* e de 1,4 - 6,6% em *C. tropicalis* (KANAFANI & PERFECT, 2008). Algumas espécies de *Candida* sp. apresentaram resistência a outros antifúngicos derivados azólicos usados e assim torna o tratamento de candidíase com a terapia clássica difícil (JOHNSON, 2008; MAIA, 2009; GOMES et al., 2010; NUNES et al., 2011).

Existem muitos trabalhos com o monitoramento do perfil de sensibilidade a drogas de leveduras isoladas de amostras clínicas humanas. No entanto, são escassos os trabalhos com leveduras isoladas de animais. O nosso grupo de pesquisa (Centro Especializado em Micologia Médica) tem realizado muitas pesquisas nessa área, tendo relatado o isolamento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos de cães (BRITO et al., 2007; BRITO et al. 2009), de aves (SIDRIM et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012; ALENCAR, 2012; BRILHANTE et al., 2013), de camarões (BRILHANTE et al., 2011), de cavalos (BITTENCOURT, 2012; CORDEIRO et al., 2013), e de ouriço cacheiro (CASTELO-BRANCO et al., 2013). Adicionalmente, este mesmo grupo também isolou *C. neoformans* resistente a itraconazol a partir de fezes de pombos (COSTA et al. 2010b).

As espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* vem apresentando resistência a alguns derivados azólicos o que pode ser consequência de mudanças na sequência de genes ou em sua expressão e que por sua vez, podem estar relacionados a processos seletivos devido a exposição a derivados azólicos utilizados prática clínica (KANAFANI & PERFECT, 2008; BRILHANTE et al., 2012) ou na agricultura (YANG et al., 2012).

De forma geral, existem dois mecanismos primordiais relacionados ao desenvolvimento de resistência aos derivados azólicos em *Candida* spp. Dentre os quais está o desenvolvimento de bombas de efluxo ativo, que são codificadas pelos genes *CDR1* e *CDR2*, os quais codificam proteínas pertencentes à superfamília *ATP binding cassette*, e pelo gene *MDR1*, que codifica uma proteína pertencente à classe *major facilitators*. Com este mecanismo há um comprometimento da eficácia da droga devido a superexpressão desses genes e o consequentemente o aumento da atividade das bombas impedem o acúmulo da droga no interior da célula. A regulação positiva de *CDR1* e *CDR2* confere resistência a quase todos os azólicos, enquanto que de *MDR1*, confere resistência específica a fluconazol (KANAFANI & PERFECT, 2008). O segundo mecanismo consiste na alteração da enzima lanosterol C14- α -demetilase, molécula-alvo dos derivados azólicos, codificada pelo gene

ERG11. A ocorrência de superexpressão ou de mutações nesse gene resulta na redução de sensibilidade ou resistência a esse grupo de antifúngicos (KANAFANI & PERFECT, 2008).

Até o presente momento, não foram encontrados estudos de sensibilidade antifúngica e avaliação da produção de fatores de virulência *in vitro* de *Candida* spp. isoladas de caprinos e de ovinos.

3. JUSTIFICATIVA

Alguns fungos causadores de micoses são importantes patógenos tanto na área da medicina veterinária, quanto na medicina humana. Caprinos e ovinos podem conter em sua microbiota, leveduras potencialmente patogênicas que eventualmente poderão lhes causar infecções fúngicas, afetando a produtividade das criações e aumentando os custos de produção. Dessa forma, este estudo justifica-se pela necessidade de busca do conhecimento acerca da microbiota fúngica dos sistemas respiratório superior e digestório de caprinos e de ovinos, com posterior avaliação do perfil de virulência de *Candida* spp. e monitoramento da resistência antifúngica *in vitro*.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. Caprinos (*Capra aegragus hircus*) e ovinos (*Ovis aries*) apresentam como parte da microbiota dos tratos respiratório superior e digestório, espécies de leveduras potencialmente patogênicas.
2. Leveduras do gênero *Candida* isoladas dos sistemas respiratório e digestório de caprinos e de ovinos apresentam resistência a derivados azólicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Caracterizar as leveduras da microbiota do trato respiratório superior e do trato digestório de caprinos (*Capra aegragus hircus*) e de ovinos (*Ovis ariesi*), no Estado do Ceará.

5.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar leveduras presentes na cavidade nasal, na cavidade oral e no reto de caprinos e de ovinos;
- Avaliar a produção de fosfolipases e proteases pelas cepas de *Candida* spp. isoladas destes animais;
- Avaliar a produção de biofilme de cepas pertencentes às espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*.
- Estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* das leveduras isoladas frente à anfotericina B e aos derivados azólicos, fluconazol e itraconazol;

6. CAPÍTULO 1

Veterinary Microbiology - Original Research

Production of virulence factors and high azole resistance rate among *Candida* spp. from small ruminants

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Sabrina Tainah da Cruz Silva^{1,2}, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira¹, Luise Castro Borges¹, Paula Bittencourt Vago^{1,2}, Jonathas Sales de Oliveira¹, André Jalles Monteiro³, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira^{1,4}, Rossana de Aguiar Cordeiro¹, José Júlio Costa Sidrim¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,2}

¹Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

²School of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

³Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

⁴School of Medicine, Christus College - UNICHRISTUS, Fortaleza, Ceará, Brazil

Corresponding Author. R. S. N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP:60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax:55 85 3295-1736. E-mail: brilhante@ufc.br

ABSTRACT

Small ruminant production is an agricultural activity common worldwide. However, studies on the fungal microbiota of these animals are scarce. Therefore, this study aimed at isolating yeasts from the nasal, oral and rectal region of these animals and evaluating the production of virulence factors, including phospholipases, proteases and biofilm and the antifungal susceptibility of the recovered *Candida* spp. isolates. A total of 120 animals from farms of the Ceará State, Brazil, were assessed in this study. The samples were collected from nasal, oral and rectal cavities with sterile swabs. A total of 193 yeast isolates were recovered, of which 160 were *Candida* spp., 17 were *Trichosporon* spp. and 16 were *Rhodotorula* spp. *Candida* spp. strains were tested for the production of phospholipases, proteases and biofilm and for *in vitro* antifungal susceptibility to amphotericin B, itraconazole and fluconazole. Only the strains of *C. albicans*, *C. tropicalis* and the *C. parapsilosis* complex produced phospholipases, but all of the analyzed *Candida* species produced proteases. Strains of *C. tropicalis* showed higher production of biofilm when compared to the strains of *C. albicans*. Resistance to both of the azole drugs was observed in the strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*. In summary, *Candida* spp. were predominant in the microbiota of the nasal, oral and rectal cavities of small ruminants, including azole-resistant strains of *C. albicans* and *C. tropicalis* that secrete phospholipases and proteases and produce biofilm.

Key words: *Candida* spp., yeast, goat, sheep, resistance, phospholipases, proteases, biofilm.

INTRODUCTION

Small ruminant production is an agricultural activity practiced around the globe and in Brazil this activity has expanded and is contributing for the social economic development of the country. However, studies on the fungal microbiota and infections in small ruminants are scarce. Hassan *et al.* (2012), for example, studying the microbiota of healthy goats and sheep isolated *Candida* spp., *Trichosporon* spp. and *Rhodotorula* spp. from the nasal and vaginal regions, from feces and milk. These findings are relevant because yeasts from environmental and animal sources are cited as emerging human pathogens, with several reports of infection with *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, among others (Spanamberg *et al.*, 2008).

The presence of yeasts as part of the microbiota has been reported in several animal species, such as dogs (Brito *et al.*, 2007; Brito *et al.* 2009), birds (Sidrim *et al.*, 2010; Brilhante *et al.*, 2012; Brilhante *et al.*, 2013), crustaceans (Brilhante *et al.*, 2011) and horses (Cordeiro *et al.*, 2013) with *Candida* spp. as the most commonly isolated genus.

It is important to emphasize that commensal microorganisms may become pathogenic agents when favorable host-associated conditions are met, and when virulence factors are produced (Costa *et al.*, 2009), such as hydrolytic enzymes (Ibrahim *et al.*, 1995; La Fleur *et al.*, 2011) and biofilm (Monod *et al.*, 2002), which will favor the microorganism colonization and host tissue invasion (Yenisehirli *et al.*, 2010).

Therefore, this study aimed at isolating yeasts from the nasal, oral and rectal region of healthy goats and sheep and evaluating the production of virulence factors, including phospholipases, proteases and biofilm, and the antifungal susceptibility of the recovered *Candida* spp. isolates.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Clinical samples were collected from 60 goats and 60 sheep healthy from the cities of Guaiúba (4° 2' 31" S, 38° 38' 16" W), Horizonte (4° 5' 51" S, 38° 29' 27" W), Caucaia (3° 44' 4" S, 38° 39' 23" W) and Itaitinga (3° 58' 20" S, 38° 31' 44" W), in the Ceará State, Brazil. Samples were obtained from male goats (n=5) and sheep (n=7), female goats (n=55) and sheep (n=53), of which 60 sheep and 30 goats were mixed-bred and the remaining 30 were Saanen goats. This study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Ceará State University (protocol no. 12641465-6).

Sample collection

Samples were collected from the nasal, oral and rectal cavities with sterile swabs, which were inserted into the anatomical site, reaching a depth of 15 cm, and rotated 180°. Then, the swabs were placed in sterile tubes containing 1 mL of sterile saline (0.9% NaCl), which were refrigerated at $\approx 4^{\circ}\text{C}$ until processing, within a maximum of 12 hours (Brilhante *et al.*, 2010).

Isolation and fungal identification

Swabs were inoculated in Petri dishes containing 2% Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (0.5 g/L). The plates were incubated at 25°C for up to 10 days, with daily evaluation for the presence of microbiological growth.

After this period, yeast colonies were submitted to Gram staining and microscopically (40X) evaluated for the presence of blastoconidia, hyphae or pseudohyphae, as well as to discard the possibility of bacterial contamination. Then, the genus and, whenever possible, the species of the yeasts were identified using specific morphological and biochemical tests (De Hoog *et al.*, 2000).

Colonies with macromorphology suggestive of *Candida* sp. were initially cultivated on chromogenic medium (HiChrome Candida Differential Agar; HiMedia) to identify mixed colonies. Pure colonies were subcultured into tubes containing potato dextrose agar and after 24-48h, the microorganisms were grown on cornmeal/Tween 80 agar for morphological analysis. The identification of *Trichosporon* sp. was based on macromorphology of colonies on Sabouraud agar and on micromorphology on 2% malt extract agar. The identification of *Rhodotorula* sp. was based on macromorphology and micromorphology of colonies on 2% malt extract agar (De Hoog *et al.*, 2000). Then, all strains were subcultured in tubes containing Christensen's urea agar to evaluate urease production. Also, the sugar and nitrogen assimilation, and sugar fermentation were evaluated and interpreted according to De Hoog *et al.* (2000).

Phospholipases production assay

A total of 140 strains of *Candida* spp. (21 *C. albicans*, 68 *C. tropicalis*, 12 *C. famata*, 12 *C. parapsilosis* complex, 12 *C. guilliermondii*, 12 *C. krusei* and 3 *C. glabrata*) were tested for the production of phospholipases, according to Sidrim *et al.* (2010). The inocula were prepared in 0.9% sterile saline at a final concentration of 4 on the McFarland scale. Sterilized filter paper disks of 5 mm diameter were impregnated with 5 μ L of inoculum and placed on Petri dish containing 2% dextrose Sabouraud agar supplemented with 1 mol/L sodium chloride, 0.05 mol/L calcium chloride and 8% sterile egg yolk emulsion. Plates were then incubated at 35 °C for up to seven days and the phospholipase activity (Pz) was determined by calculating the ratio between the diameter of the yeast colony and the total diameter (colony + precipitation zone), which allowed the strain to be classified as negative (Pz=1), positive ($0.64 \leq \text{Pz} < 1$) or strongly positive ($\text{Pz} < 0.64$) (Sidrim *et al.*, 2010).

Proteases production assay

The same strains submitted to phospholipase activity tests were also assessed for the production of proteases. The test was performed according to Vidotto *et al.* (2004), with modifications. For the preparation of 200 mL of the base medium, 0.04 g MgSO₄, 0.5 g K₂HPO₄, 1 g NaCl, 0.2 g of yeast extract, 4 g glucose and 3 g bacteriological agar were added to 150 mL of distilled water, and the mixture was sterilized. Then, 0.5 g of bovine serum albumin was diluted with 50 mL of distilled water and the solution was filtered and added to the base medium, which was immediately distributed in Petri dishes in a volume of 20 mL per dish. For each tested strain, an inoculum with concentration of 5 on the McFarland scale was made and a sterilized filter paper disk was impregnated with 10 µL of this inoculum and then placed on the agar surface. The plates were, then, incubated at 35 °C for up to 5 days. Afterwards, the protease activity (Pz) was determined by calculating the ratio between the diameter of the yeast colony and the total diameter (colony + proteolysis zone around the colony). Lower Pz values indicated higher protease production, while Pz values of 1 indicated the absence of enzymatic activity.

Biofilm formation assay

For the biofilm formation assay, nine strains of *C. albicans* and seven strains of *C. tropicalis* resistant to fluconazole and itraconazole, two strains of *C. tropicalis* resistant to fluconazole and six strains of each species susceptible to all tested antifungals were used. The methodology was developed according to Peeters *et al.* (2008) and Ravi *et al.* (2009), with modifications. Initially, the isolates were cultivated on Sabouraud agar for 48 h at 30 °C. After this period, samples were transferred to Sabouraud broth and incubated for 24h at 150 rpm. Then, they were centrifuged (300rpm – 10min), the supernatant was discarded, the pellet was washed with sterile PBS and a new centrifugation was performed. This washing step was

repeated twice. Then, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in RPMI medium at a concentration of 0.5 in the McFarland scale. Afterwards, 100 μ L of the inoculum were incubated in each well of a 96-well flat-bottomed microtiter polystyrene plate and maintained 48 h at a 150 rpm, at 37°C. Positive and negative growth control wells were used. After incubation, the supernatant was carefully aspirated from the wells and three washings were performed with PBS-Tween. Wells were then washed with 100 μ L of 100% methanol. Once dried, 100 μ L of 0.3% crystal violet were added and left for 20 min. After this period, the crystal violet was removed and two washings with 200 μ L of sterile distilled water were performed. Finally, 150 μ L of 33% acetic acid were added to the stained wells and left for 30sec. After this period the volume was transferred to another plate which was read immediately in a spectrophotometer to obtain the results of the optic density at a wavelength of 590 nm (OD590nm). The data of the optic density obtained were corrected by subtracting the optic density values obtained for the negative control. The cut-off value (ODc) for the assay was defined as three standard deviations above the average OD590 nm of the negative control. At the end, all strains were classified, according to Stepanovic *et al.* (2000), as non-producers of biofilm ($\text{OD}_{590\text{nm}} \leq \text{ODc}$), weak producers ($\text{ODc} < \text{OD}_{590\text{nm}} \leq 2 \times \text{ODc}$), moderate producers ($2 \times \text{ODc} < \text{OD}_{590\text{nm}} \leq 4 \times \text{ODc}$) and strong producers ($4 \times \text{ODc} < \text{OD}_{590\text{nm}}$).

Antifungal susceptibility test

To study the *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida* strain from small ruminants, the same strains tested for phospholipase and protease production were evaluated through broth microdilution method standardized by the *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, document M27-A3, 2008). The tested drugs were amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC) and itraconazole (ITC), diluted according to the document M27-A3 (CLSI, 2008). The concentrations tested for AMB and ITC ranged from 0.03125 to 16 μ g/mL and from 0.125 to

64 µg/mL for FLC (CLSI, 2008). The yeast inocula were prepared from 48 h *Candida* cultures grown on potato dextrose agar, at 35 °C, reaching a final concentration of 0.5–2.5 x 10³ cells/mL in RPMI medium buffered to pH 7 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), as recommended by the CLSI (2008). All samples were tested in duplicate and microdilution plates were incubated at 35 °C, for 48 h. The minimum inhibitory concentration (MIC) for AMB was defined as the lowest concentration capable of inhibiting 100% of the yeast growth, while for azole derivatives, MICs were defined as the lowest concentration capable of inhibiting 50% of yeast growth, when compared to the control well (CLSI, 2008). MICs >1, ≥64 and ≥1 µg/mL (CLSI, 2008) indicated resistance to AMB, FLC and ITC. However, fluconazole MICs of ≥8 µg/mL against *C. albicans*, *C. parapsilosis* complex and *C. tropicalis* indicated *in vitro* resistance to this drug (Pfaller, 2012). As a quality control, the strain of *C. parapsilosis* ATCC 22019 was included in each test (CLSI, 2008).

Statistical Analysis

Fisher's exact test was used to analyze the frequency of yeast recovery and phospholipase and protease production by *Candida* spp. Analysis of Variance (ANOVA) and Student's t-test were used to compare the production of biofilm by *C. albicans* and *C. tropicalis*. Finally, Kruskal-Wallis' test and Mann-Whitney's test were used to compare the MIC differences among *Candida* strains. For all tests, results with P<0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Yeast Isolation

In this study, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. and *Trichosporon* spp. were isolated. Among the isolates, *Candida* spp. was isolated from 45/60 goats and 26/60 sheep, comprising

at least one collection site. The positivity in goats per anatomical site was 32/60 nasal cavities, 36/60 oral cavities and 18/60 rectal cavities, while in sheep the positivity rate per site was 11/60 nasal cavities, 25/60 oral cavities and 10/60 rectal cavities.

From 11/45 positive goats and 5/26 positive sheep the genus *Candida* was simultaneously recovered from all three assessed anatomical sites. From 19/45 goats and 10/26 sheep, isolates were recovered from two anatomical sites, and from 15/45 goats and 11/26 sheep yeasts were obtained from only one anatomical site. Two species of *Candida* were isolated from the same anatomical site of a given individual in 14/45 positive goats and 8/26 positive sheep. From the remaining animals, one single species of yeast was isolated per anatomical site.

A total of 160 *Candida* isolates were obtained from goats and sheep, comprising seven species: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. glabrata* (Table 1). The most frequent species were *C. tropicalis* (68/160, $P<0.0001$), *C. famata* (24/160) and *C. albicans* (21/160). *C. tropicalis* was more commonly isolated from goats, when compared to sheep ($P<0.0001$), especially from the nasal and oral cavities ($P<0.05$, Table 1). *C. albicans* was more commonly isolated from the oral cavity ($P<0.01$) of both animal species, when compared to the other two anatomical sites.

Also, 16 isolates of *Rhodotorula* spp. were obtained, of which 11 were *R. glutinis* (1 goat and 10 sheep), two were *R. mucilaginosa* (sheep) and 3 were *R. minuta* (2 goats and 1 sheep) (Table 1). The strains of *Trichosporon* spp. were more isolated from sheep (15/17) and were found in all three investigated anatomical sites. In goats, this genus was not isolated from the rectum (Table 1).

Phospholipase and protease production assay

A total of 140 strains of *Candida* were tested for the production of phospholipases and proteases. The results of Pz for the enzymatic production are shown in Table 2. From the total, 120 were negative (Pz=1) for the production of phospholipases, while 21 were positive (12 *C. albicans*, 8 *C. tropicalis* and 1 *C. parapsilosis* complex), of which 11 were strongly positive (Pz<0.64). *C. albicans* presented higher phospholipase production (P<0.001), when compared to the other *Candida* species, and out of the tested isolates, 5/21 were positive and 7/21 were strongly positive. As for *C. tropicalis*, 4/7 were positive and 3/7 were strongly positive and the only phospholipase-producing *C. parapsilosis* complex showed strong enzymatic activity (Table 2). Among resistant strains, 6/9 *C. albicans* and 5/21 *C. tropicalis* presented enzymatic activity. Concerning the production of proteases, 45 strains were negative (Pz=1) and 95 were positive (Pz<1). The species that presented protease-producing strains were *C. albicans* (8/21), *C. tropicalis* (54/68), *C. krusei* (11/12), *C. guilliermondii* (2/12), *C. parapsilosis* complex (8/12), *C. famata* (10/12) and *C. glabrata* (2/3) (Table 2). *C. tropicalis* presented higher protease production (P<0.0001), when compared to the other *Candida* species. Among the azole resistant strains, 3/9 *C. albicans* and 18/21 *C. tropicalis* produced the enzyme.

Biofilm formation assay

The test to assess the production of biofilm was performed in nine strains of *C. albicans* and seven strains of *C. tropicalis* resistant to fluconazole and itraconazole, two strains of *C. tropicalis* resistant to fluconazole and six azole susceptible strains of each species. The mean optic density for *C. albicans* was 0.325 ± 0.286 , while for *C. tropicalis*, it was 0.786 ± 0.523 . Overall, *C. tropicalis* presented higher values of optic density (P<0.01), when compared to *C. albicans*. Based on these values, the strains of *C. tropicalis* were classified as strong biofilm producers (13/15) and moderate producers (2/15), while the strains of *C. albicans* were

classified as strong producers (5/15), moderate producers (5/15), weak producers (4/15) and non-producer (1/15).

Antifungal susceptibility test

The results obtained by the antifungal susceptibility test are presented in the Table 3. The obtained MICs varied from 0.03125 to 1; from 0.0625 to >64 and from 0.03125 to >16 µg/mL for AMB, FLC and ITC, respectively. Resistance to AMB was not observed, but 21 strains of *Candida* spp. were simultaneously resistant to fluconazole and itraconazole, which were 9 *C. albicans* (1 goat, 8 sheep) and 12 *C. tropicalis* from sheep. Resistance to fluconazole alone was observed in six strains of *C. tropicalis* (5 goat and 1 sheep), one strain of *C. albicans* (goat) and two *C. parapsilosis* complex (sheep), while resistance to itraconazole alone was observed in three strains of *C. tropicalis* (1 goat, 2 sheep). Overall, *C. tropicalis* from goats presented higher MICs than those from sheep ($P<0.001$).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study on the yeast microbiota of nasal, oral and rectal cavities of small ruminants, through which it was shown that yeasts compose the microbiota of the investigated anatomical sites of goats and sheep, with emphasis on the genus *Candida*.

There are studies on yeast isolation from several anatomical sites of small ruminants, however the physiological role of these microorganisms in the organic systems of these animals is still not known. *C. tropicalis*, for example, has been isolated from the rumen of goats (Abrão *et al.*, 2011), however the role of this yeast in the gastrointestinal tract of these animals is not fully understood. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* complex, *R. mucilaginosa*, *T. cutaneum* have also been reported in healthy sheep and goats (Hassan *et al.*, 2012). In our study, we isolated *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* complex,

C. famata, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* and *Trichosporon* spp. from different anatomical sites of goats and sheep.

In our study, the genus *Candida* was predominant and, among the isolates of this genus, a high frequency of *C. tropicalis* (42.5%) was observed, of which 73.5% originated from the nasal and oral cavities of goats. These animals were mostly Saanen with milking aptitude and were raised in intensive system, fed with elephant grass, by-products of breweries and commercial feed. As reported by Abrão *et al.* (2011), this yeast composes the microbiota of the rumen and, therefore, may also compose the oral microbiota of these animals due to the rumination process, resulting in the transportation of these microorganisms from the rumen to the oral cavity. Additionally, the manner through which goats acquire food and the intensive management system these animals were raised may have led to a higher isolation of *C. tropicalis* from the nasal cavity as well. Additionally, *C. tropicalis* may be found in the soil (Yang *et al.*, 2012), and, therefore, may have been carried by the feed provided to these animals, in particular the roughages, leading to the colonization of their digestive tract.

In this study, *C. albicans* was one of the most isolated species, found in oral and rectal cavities of goats and sheep and, therefore, considered as a part of the microbiota of these anatomical sites, reinforcing the idea that this yeast species has as ecological niche living animals, not environmental sources (Medeiros *et al.*, 2008).

The dissemination of yeasts from the digestive tract of some animals may represent a problem in human and veterinary medicine (Sidrim *et al.*, 2010). The passage from commensal microorganisms to pathogenic agents, under favorable host conditions, depends on several virulence factors (Costa *et al.*, 2009), which favor the installation of the microorganism and tissue invasion in the host (Yenisehirli *et al.*, 2010). Among the virulence factors, the hydrolytic enzymes stand out, since they act in the extracellular environment digesting phospholipids and proteins (phospholipases and proteases, respectively) present in

the cellular membranes of the host tissues, facilitating microorganism penetration and favoring their pathogenicity (Costa *et al.*, 2010). In addition, biofilms represent the type of microbial community predominant in nature and are important for the development and maintenance of infections, since they act as a shield for the pathogenic agents, protecting them from antimicrobial drugs and host defenses (Kuhn *et al.*, 2002).

Research on the phospholipases of yeast isolated from animals are scarce (Cafarchia *et al.*, 2008; Sidrim *et al.*, 2010; Brilhante *et al.*, 2011; 2013). According to Ibrahim *et al.* (1995), phospholipases are important virulence factors of *C. albicans*. In our study, 12/21 strains of *C. albicans* produced this enzyme, representing the *Candida* species with the highest positivity rate for phospholipase production, followed by 7/68 *C. tropicalis* and 1/12 *C. parapsilosis* complex.

Proteases are described in *C. albicans* and considered important virulence factors for this species, increasing their potential for host invasion (Monod *et al.*, 2002). These enzymes are also produced by *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis* species complex, *C. tropicalis* (Kantarcioglu & Yucel, 2002), *C. famata* and *C. guilliermondii* (Brilhante *et al.*, 2011). In our study, all seven isolated species of *Candida* produced this enzyme, but only 8/21 strains of *C. albicans* presented enzymatic activity, which contrasts with the literature that reports that most strains of this species produce proteases (Vidotto *et al.*, 2004, Akçaglar *et al.*, 2011; Brilhante *et al.*, 2011). The low number of protease-producing *C. albicans* may have been associated with the pH (4.9) of the medium used in our experiment, which differed from that of the medium used by Vidotto *et al.* (2004) (pH=3.5). On the other hand, among strains of *C. tropicalis*, 54/68 produced proteases, which corroborates previous reports (Zaugg *et al.*, 2001). Overall, with protease screening medium used in the present study, enzymatic activity was observed in 67.8% of the tested strains, which showed that the used medium was efficient for the detection of these enzymes.

Biofilm production is another important virulence factor of *Candida* species, especially *C. albicans* and *C. tropicalis*. This factor is important for the maintenance of the infections since it promotes antifungal resistance (Kuhn *et al.*, 2002; Al-Fattani & Douglas, 2006; La Fleur *et al.*, 2011). The literature demonstrates that *C. tropicalis* often presents higher biofilm production, when compared to *C. albicans* (Tumbarello *et al.*, 2007). In our study, we found similar results with 86% of the tested *C. tropicalis* strains classified as strong biofilm producers, whereas, 60% of *C. albicans* strains showed weak or moderate biofilm production. The high biofilm production by *C. tropicalis* may be associated to the predominantly environmental niche of this yeast species, mainly inhabiting soils (Yang *et al.*, 2012), as a strategy for self protection against environmental aggressors (Huq *et al.*, 2008).

Concerning the *in vitro* antifungal susceptibility, there were no AMB resistant isolates, similar to what was found for *Candida* strains from other healthy animals (Brito *et al.*, 2009; Sidrim *et al.*, 2010; Brilhante *et al.*, 2011, 2012, 2013). However, the occurrence of azole resistance was observed among three species of *Candida*, i. e. *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* complex. This observation is important since these three strains of *Candida* are commonly implicated as human and animal pathogens, representing the most common etiological agents for candidiasis in Latin America (Hinrichsen *et al.*, 2008). Additionally, these findings are relevant, since the investigated animals were healthy and did not have a history of antifungal treatment.

Resistance to azole derivatives has been reported among *C. albicans* and *C. tropicalis*, which usually is a consequence of changes in the gene sequences or their expression due to selective processes caused by previous exposure to these drugs that are commonly used in clinical practice or agriculture (Kanafani & Perfect, 2008; Brilhante *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Yang *et al.* (2012), for example, isolated from different soils, including farmlands, strains of *C. tropicalis* that presented reduced susceptibility to fluconazole. According to the

authors, the soils may be an important source of azole resistant *C. tropicalis* due to the overexposure to this azole antifungals used in agricultural practices. Therefore, the tested animals may have had contact with resistant strains or with the azole drugs through the ingestion of pastures treated with these antifungals. Thus, knowledge on products that are used to treat and control plagues in crops destined to animal feeding is important. In our study, most of the animals were fed elephant grass, corn meal or brewery by-products; however, the use of antifungals during the cultivation of these pastures is unknown.

CONCLUSION

This study showed the predominance of *Candida* spp. as a part of the microbiota of nasal, oral and rectal cavities of goats and sheep, including phospholipase and protease-secreting, biofilm-producing and azole resistant strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil; Processes 302574/2009-3, 481614/2011-7, 504189/2012-3) and the Coordination Office for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/PNPD 2103/2009, AE1-0052-00650100/11, Casadinho/PROCAD 552215/2011-2).

REFERENCES

Abrão, F.O., Freitas, C.E.S., Duarte, E.R., Gerassev, L.C., Barreto, S.M.P., Medeiros, A.O., Rosa, C.A. 2011. Leveduras no rúmen de caprinos e bovinos de corte criados em pastagem tropicais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 63, 526-529.

- Akçağlar, S., Ener, B., Tore, O. 2011. Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains: a comparison of spectrophotometry and plate methods. *Turkish Journal of Biology* 35, 559-567.
- Al-Fattani, M.A., Douglas, L.J. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* 55, 999-1008.
- Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Soares-Junior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2007. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal* 174, 147-153.
- Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2009. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Ciência Rural* 39, 2655-2664.
- Brilhante, R.S.N., Castelo-Branco, D.S.C.M., Soares, G.D.P., Astete-Medrano, D.J., Monteiro, A.J., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2010. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *Journal of Medical Microbiology* 59, 718-723.
- Brilhante, R.S.N., Paiva, M.A.N., Sampaio, C.M.S., Teixeira, C.E.C., Castelo-Branco, D.S.C.M., Leite, J.J.G., Moreira, C.A., Silva, L.P., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2011. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 76, 268-277.

- Brilhante, R.S.N., Castelo-Branco, D.S.C., Duarte, G.P.S., Paiva, N.A.M., Teixeira, C.E.C.; Zeferino, J.P.O., Monteiro, A.J., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2012. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. *Environmental Microbiology Reports* 4, 189-193.
- Brilhante, R.S.N., Alencar, L.P., Cordeiro, R.A., Castelo-Branco, D.S.C.M., Teixeira, C.E.C., Macedo, R.B., Lima, D.T., Paiva, M.A.N., Monteiro, A.J., Alves, N.D., Oliveira, M.F., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2013. Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. *Journal of Medical Microbiology* 62, 889-895.
- Cafarchia, C., Romito, C., Coccioli, C., Camarda, A., Otranto, D. 2008. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human diseases. *Medical Mycololgy* 46, 1–6.
- Cordeiro, R.A., Bittencourt, P.V., Brilhante, R.S.N., Teixeira, C.E.C., Castelo-Branco, D.S.C.M., Silva, S.T.C., Alencar, L.P., Souza, E.R.Y., Bandeira, T.J.P.G.; Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2013. Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Medical Mycololgy* 1–6.
- Costa, K.R.C., Ferreira, J.C., Komesu, M.C., Candido, R.C. 2009. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia* 167, 73-79.
- Costa, A.K.F., Sidrim, J.J.C., Cordeiro, R.A., Brilhante, R.S.N., Monteiro, A.J., Rocha, M.F.G. 2010. Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: A Focus on Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus* Strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia* 169, 207-213.
- CLSI 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A3, 3rd edn., Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards

- Institute. De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueiras, M.J. 2000. Atlas of Clinical Fungi. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmingscultures.
- Hassan, A.A., Hassan, M.A., Sayed El Ahl., R.M.H., Darwish, A.S. 2012. Prevalence of Yeast Infections in Small Ruminants with Particular References to their Treatment by some Natural Herbal Extracts. Bulletin of Environment, Pharmacology & Life Sciences 1, 2-22.
- Hinrichsen, S.L., Falcão, E., Vilella, T.A.S., Colombo, A.L., Nucci, M., Moura, L., Rêgo, L., Lira, C., Almeida, L. 2008. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41, 394-398.
- Huq, A., Whitehouse, C.A., Grim, C.J., Alam, M., Colwell, R.R. 2008. Biofilms in water, its role and impact in human disease Transmission. Current Opinion in Biotechnology 19, 244–247.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards Jr., J.E., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infection and Immunity 63, 1993-1998.
- Kanafani, Z.A., Perfect, J.R. 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clinical Infectious Diseases 46, 120-128.
- Kantarcioglu, A.S., Yucel, A. 2002. Phospholipase and proteases activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 45, 160–165.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A. 2002. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. Infection and Immunity 70, 878–888.
- La Fleur, M.D. 2011. *Candida albicans* Biofilms, Heterogeneity and Antifungal Drug Tolerance. The Open Mycology Journal 5, 21-28.

- Medeiros, A.O., Kohler, L.M., Hamdan, J.S., Missagia, B.S., Barbosa, F.A.R., Rosa, C.A. 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research* 42, 3921–3929.
- Monod, M., Capoccia, S., Le-chenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., Jousson, O. 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology* 292, 405 – 419.
- Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 72, 157–165.
- Pfaller, M. A. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *American Journal of Medicine* 125 (Suppl.), S3–S13.
- Ravi, S., Pierce, C., Witt, C., Wormley Jr., F.L. 2009. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans* Under Distinct Environmental Conditions. *Mycopathologia* 167, 307–314.
- Sidrim, J.J.C., Maia, D.C.B.S.C., Brilhante, R.S.N., Soares, G.D.P., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Rocha, M.F.G. 2010. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology* 145, 324-328.
- Spanamberg, A., Wunder, Jr, E.A., Pereira, D.I.B., Argenta, J., Sanches, E.M.C., Valente, P., Ferreiro, L. 2008. Diversity of yeasts from bovine. mastitis in Southern Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología* 25, 154-156.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40, 175–179.
- Tumbarello, M., Posteraro, B., Trecarichi, E.M., Fiori, B., Rossi, M., Porta, R., Donati, K.G., Sorda, M., Spanu, T., Fadda, G., Cauda, R., Sanguinetti, M. 2007. Biofilm Production by

Candida Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1843–1850.

Vidotto, V., Pontón, J., Aoki, S., Quindós, G., Mantoan, B., Pugliese, A., Ito Kuwa, S., Nakamura, K. 2004. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología* 21, 70-74.

Yang, Y.L., Lin, C.C., Chang, T.P., Lauderdale, T.L., Chen, H.T., Lee, C.F., Hsieh, C.W., Chen, P.C., Lo, H.J. 2012. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole. *PLoS ONE* 7(4): e34609. doi:10.1371/journal.pone.0034609

Yenişehirli, G., Bulut, Y., Tunçoglu, E. 2010. Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens. *Mikrobiyoloji Bulteni* 44, 71-77.

Zaugg, C., Borg-Von Zepelin, M., Reichard, U. Sanglard, D., Monod, M. 2001. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infection and Immunity* 69, 405-412.

Table 1. Frequency of yeasts isolated from the different collection sites of goats and sheep

Species	Goats			Sheep			Total
	Nasal	Oral	Rectal	Nasal	Oral	Rectal	
<i>Candida albicans</i>	-	7	2	-	9	3	21
<i>C.tropicalis</i>	25	21	4	2	12	4	68
<i>C. famata</i>	7	2	6	5	4	-	24
<i>C. parapsilosis</i> complex	1	3	3	2	4	2	15
<i>C. krusei</i>	4	3	4	1	1	-	13
<i>C. guilliermondii</i>	3	7	2	1	2	1	16
<i>C. glabrata</i>	-	-	1	1	1	-	3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	1	-	7	3	-	11
<i>R. mucilaginosa</i>	-	-	-	-	1	1	2
<i>R. minuta</i>	-	1	1	-	1	-	3
<i>Trichosporon</i> sp.	1	1	-	5	4	6	17
Total	41	46	23	24	42	17	193

Table 2. Production of phospholipases and proteases by *Candida* spp. from nasal, oral and rectal cavities of goats and sheep

<i>Candida</i> Species	n	Phospholipases			Proteases	
		Positive ($0,64 \leq P_z < 1$)	Strongly positive ($P < 0,64$)	Negative ($P_z = 1$)	Positive ($P_z < 1$)	Negative ($P_z = 1$)
<i>C. albicans</i>	21	5	7	9	8	13
<i>C. tropicalis</i>	68	5	3	60	54	14
<i>C. famata</i>	12	-	-	12	10	2
<i>C. parapsilosis</i> complex	12	-	1	11	8	4
<i>C. guilliermondii</i>	12	-	-	12	2	10
<i>C. krusei</i>	12	-	-	12	11	1
<i>C. glabrata</i>	3	-	-	3	2	1
Total	140	10	11	119	95	45

Table 3. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* species from nasal, oral and rectal cavities of goats and sheep.

<i>Candida</i> species	n	MIC (µg/mL)		
		Amphotericin B	Fluconazole	Itraconazole
<i>C. albicans</i>	21	0,03125 (1) ^a	0,5 (3)	0,03125 (1)
		0,0625 (2)	1 (4)	0,0625 (1)
		0,125 (2)	2 (2)	0,125 (4)
		0,25 (3)	4 (2)	0,25 (1)
		0,5 (11)	8 (1)*	0,5 (5)
		1 (2)	16 (3)*	1 (3)*
			>64 (6)*	>16 (6)*
<i>C. tropicalis</i>	68	0,0625 (1)	0,125 (4)	0,03125 (25)
		0,25 (13)	0,25 (1)	0,0625 (7)
		0,5 (29)	0,5 (10)	0,125 (8)
		1 (25)	1 (12)	0,25 (2)
			2 (10)	0,5 (4)
			4 (10)	1 (7)*
			8 (3)*	2 (1)*
			16 (2)*	4 (1)*
			32 (1)*	8 (1)*
			64 (1)*	16 (2)*
<i>C. famata</i>	12	0,03125 (2)	0,0625 (2)	0,03125 (4)
		0,0625 (2)	0,5 (6)	0,0625 (4)
		0,125 (4)	1 (2)	0,125 (3)
		0,25 (2)	2 (2)	0,5 (1)
		0,5 (2)		
<i>C. parapsilosis</i> complex	12	0,03125 (1)	0,25 (1)	0,03125 (1)
		0,0625 (2)	0,5 (4)	0,125 (3)
		0,125 (1)	1 (1)	0,25 (5)
		0,25 (2)	2 (3)	0,5 (3)
		0,5 (4)	4 (1)	
<i>C. guilliermondii</i>	12	1 (2)	8 (2)*	
		0,03125 (1)	0,5 (3)	0,03125 (2)
		0,0625 (2)	1 (4)	0,0625 (3)
		0,125 (2)	2 (2)	0,125 (6)
		0,25 (2)	4 (2)	0,25 (1)
<i>C. krusei</i>	12	0,5 (5)	8 (1)	
		0,0625 (1)	0,5 (3)	0,03125 (5)
		0,125 (4)	1 (1)	0,0625 (3)
		0,25 (1)	2 (3)	0,125 (3)
		0,5 (5)	4 (1)	0,25 (1)
<i>C. glabrata</i>	3	1 (1)	8 (2)	
			32 (2)	
		0,0625 (1)	0,0625 (1)	0,03125 (2)
		0,125 (1)	1 (1)	0,125 (1)
		0,5 (1)	2 (1)	

^a indicates the number of strains. * indicates antifungal resistance (FLC: ≥8 µg/mL; ITC: ≥1 µg/mL).

7. CONCLUSÕES

1. Leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas como parte da microbiota nasal, oral e retal de caprinos e ovinos saudáveis;
2. *C. tropicalis* foi a espécie mais isolada das cavidades nasal e oral de caprinos;
3. Há resistência primária a derivados azólicos em *Candida* spp., especificamente em *C. tropicalis* isoladas de caprinos e *C. albicans* isoladas de caprinos e de ovinos;
4. Secreção de fosfolipases foi detectada em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e do Complexo *C. parapsilosis*;
5. Todas as *Candida* spp. isoladas apresentaram produção de proteases;
6. Cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentaram produção de biofilme, sendo que a *C. tropicalis* apresentou maior produção.

8. PERSPECTIVAS

Fungos causadores de micoses são importantes patógenos emergentes na medicina veterinária e humana. Leveduras que fazem parte da microbiota de caprinos e ovinos podem eventualmente lhes causar infecções, afetando a produtividade das criações e aumentando os custos de produção nas criações. Assim, este estudo contribuiu para o conhecimento sobre a microbiota fúngica por leveduras dos tratos respiratório superior e digestório de caprinos e de ovinos. O conhecimento desta microbiota auxilia na compreensão da interação parasito-hospedeiro e seus possíveis distúrbios, portanto é um dado com relevância sanitária e de saúde pública. Ademais, o monitoramento do perfil de sensibilidade e produção fatores de virulência de cepas de leveduras de origem animal é escasso. Nesse estudo foi observado fenômeno resistência a derivados azólicos em cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* o que nos leva a refletir sobre a origem dessa resistência que pode ser consequência de uma pressão seletiva feita pelo homem no ambiente ou mesmo no animal. A observação de cepas de *Candida* spp. produtoras de fosfolipases, proteases e biofilme em caprinos e ovinos saudáveis nos permite sugerir que estes isolados tem potencial patogênico, podendo estabelecer, em circunstâncias favoráveis, uma infecção tanto no hospedeiro, como em seres humanos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, F. O.; BARRETO, S. M. P.; GERASSEV, L. C.; DUARTE, E. R. Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, p. 757-760, 2010.
- ABRÃO, F. O.; FREITAS, C. E. S.; DUARTE, E. R.; GERASSEV, L. C.; BARRETO, S. M. P.; MEDEIROS, A. O.; ROSA, C. A. Leveduras no rúmen de caprinos e bovinos de corte criados em pastagem tropicais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, p. 526-529, 2011.
- AKCAĞLAR, S.; ENER, B.; TORE, O. Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains: a comparison of spectrophotometry and plate methods. *Turkish Journal of Biology*, v.35, p. 559-567, 2011.
- ALBY, K.; BENNETT, R. J.; Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, v.20, p. 3178-3191, 2009.
- ALENCAR, S. P.; MOTA, R. A.; COELHO, M. C. O. C.; NASCIMENTO, S. A.; ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.11, p. 131-140, 2010.
- ALENCAR, L.P. *Leveduras e Geotrichum capitatum do trato digestivo e fezes de emas (Rhea americana) mantidas em cativeiro: identificação e sensibilidade antifúngica in vitro*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, p.999–1008, 2006.
- ANDRADE, J.S.L.; AZEVEDO, S.S.; TELES, J.A.A.; HIGINO, S.S.S.; AZEVEDO, E.O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p.116-120, 2012.
- BARÓ, T.; TORRES-RODRIGUES, J. M.; MENDONZA, M. H.; MORERA, Y; ALÍA, C. First Identification of Autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* Isolated from Goats with Predominantly Severe Pulmonary Disease in Spain. *Journal of clinical microbiology*, v. 36, p. 458–461, 1998.

BITTENCOURT, P.V. *Fungos do trato respiratório de equinos: um destaque para o isolamento de espécies de Candida não-albicans*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIVA, M.A.N.; SAMPAIO, C.M.S.; TEIXEIRA, C.E.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C. M.; LEITE, J.J.G; MOREIRA, C.A; SILVA, L.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. *FEMS microbiology ecology*, v. 76, p. 268-277, 2011.

BRILHANTE, R.S.N.; CASTELO-BRANCO, D. S. C.; DUARTE, G. P. S.; PAIVA, N. A. M.; TEIXEIRA, C.E.C.; ZEFERINO, J. P. O.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. *Environmental Microbiology Reports*, v. 4, p. 189-193, 2012.

BRILHANTE, R.S.N; ALENCAR, L.P.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.; TEIXEIRA, C.E.C.; MACEDO, R.B; LIMA, D.T.; PAIVA, M.A.N.; MONTEIRO, A.J.; ALVES, N.D.; OLIVEIRA, M.F.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, 2013.

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

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, p. 2655-2664, 2009.

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

CARLTON, W. W; Mc GAVIN, M. D. *Patologia veterinária especial de Thomson*. Tradução: Barros, Claudio S. L. de 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 672.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild

Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical Mycology*, Early Online: 1–6, 2013.

CORDEIRO, R.A.; BITTENCOURT, P.V.; BRILHANTE, R.S.N.; TEIXEIRA, C.E.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SILVA, S.T.C.; ALENCAR, L.P.; SOUZA, E.R.Y.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Medical Mycology*, 1–6, 2013.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. *CLSI Document M27-A3*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia*, v. 167, p. 73-79, 2009.

COSTA, A.R., LACERDA, C., FREITAS, F.R.D. A criação de ovinos e caprinos em Campos Sales – CE. *Cadernos de cultura e ciência*, v. 2, n. 2, 2010a.

COSTA, A. K. F.; SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: A Focus on Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus* Strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*, v. 169, p. 207-213, 2010b.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v.49, p.711-745, 2003.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, M. G.; TORRES, J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.7, p. 139-151, 2006.

CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. Capítulo 30. Editora:Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures, 2^a ed. Baarn, 2000.

DONLAN, R.M.. *Emerging Infectious Diseases Journal*. v.7, p. 277-281, 2001.

DUNNE, W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p. 155-166, 2003.

FILGUEIRA, T.M.B.; AHID, S.M.M.; SUASSUNA, A.C.D.; SOUZA, W.J.; FONSECA, Z.A.A.S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do Apodi. *Revista Verde*, v.4,p. 64 – 67, 2009.

GHANNOUM, M.A., 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, p.122-143, 2000.

GOMES, C.L.; CAVALCANTE, J.E.; CUNHA, F.A.; AMORIM, L.N.; MENEZES, E.A. Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com Candidúria em Iguatu-Ceará. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 42, p. 223-225, 2010.

GOULART, D. F.; FAVERO, L. A.; ALVES, R. S.; LIMA, T. A. S.; FILHO, V. M. B. C. A Cadeia produtiva da ovinocaprinocultura nas regiões central e oeste do Estado do Rio Grande do Norte: estrutura, gargalos e vantagens competitivas. In: 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/820.pdf>> Acesso em: 06 ago 2012.

GRAMINHA, C. V.; MARTINS, A. L. M.; FAIÃO, C. A.; BALSALOBRE, M. A. A. *Aditivos na Produção de Bovinos Confinados*. 2011. Disponível em < http://grupoapb.com.br/pdf/bovinos_confinados.pdf > Acesso em 19 ago 2012.

HASSAN, A. A.; MANAL, A. H.; RASHA, M. H. S. EL AHL.; DARWISH, A. S. Prevalence of Yeast Infections in Small in Ruminants with Particular References to their Treatment by some Natural Herbal Extracts. *Bulletin of Environment, Pharmacology & Life Sciences*, v. 1, p. 12-22, 2012.

HAWERS, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity*. v. 62, p. 915-921, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Censo agropecuário e Pesquisa Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/> Acesso em 28 jul 2013.

IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS JR., J. E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 1993-1998, 1995.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. il3-il8, 2008.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 120-128, 2008.

KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and proteases activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, v. 45, p. 160–165, 2002.

KOTHAVADE, R.J.; KURA, M.M.; VALAND, A.G.; PANTHAKI, M.H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, v.59, p.873–880, 2010.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 878-888, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. *Tratado de Micologia Médica - Lacaz*. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LA TOURETTE, P.B.; TAYLOR, D.; DIX, B.A.; CLEELAND, R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.31, p. 1502-1506, 2003.

MAIA, D.C.B.S.C. *Leveduras isoladas do trato gastrintestinal de calopsitas (Nymphicus hollandicus): determinação da microbiota e análise fenotípica*. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará.

MALA, M.S.; REGO, M.M.T.; TORRES, J.F.; SILVA, J.G.M.; JÚNIOR, A.A.C.; LIMA, C.A.C. *Alternativas para a caprinovinocultura na agricultura familiar*. Natal: Emparn, 2009.

MANE, A.; PAWALE, C.; GAIKWAD, S.; BEMBALKAR, S.; RISBUD, A.; Adherence to bucal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Medical Mycology*, v. 45, p. 2347- 2356, 2010.

MARTIN, S.A.; NISBET, D.J. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, v.75, p. 1736-1744, 1992.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.R.; ARAUJO, R.O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, suppl., p. 236-246, 2010a.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H. *Caprinos no Brasil*. INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira. Série técnica: Genética. 2010b.

MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 208-210, 2008.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LE-CHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 292, p. 405 – 419, 2002.

MONOD, M. Secreted Proteases from Dermatophytes. *Mycopathologia*, v. 166, p. 285–294, 2008.

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

NUNES, E.B.; MONTEIRO, J.C.M.S.; NUNES, N.B.; PAES, A.L.V. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.4, p. 23-30, 2011.

OLIVEIRA, L. I.; PRADO, J. S.; CUNHA, B. M.; FRANÇA, T. N.; ROCHA, L. F. O.; CARROCINO, R. L.; BRITO, M. F. Criptococose pulmonar associada a infecção sistêmica por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em cabra (*Capra hircus*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, p.1262-1265, 2011.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Microbiology*. v.28, p. 449-461, 2003.

PEREIRA, R. N.; PEROTIA, J. H.; DUNE, A. C. C.; FERREIRA LIMA, I. G.; ALESSI, A. C.; CARVALHO, A. M.; CANOLA, P. A.; CATTELAN, J. W.; CANOLA, J. C. Criptococose nasal em ovinos: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, suplemento 1, p. 18, 2005.

PRICE, M.F., WILKINSON, I.D., GENTRY, L.O.. Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 22, p. 201-207, 1982.

PUGH, D. G. *Clínica de ovinos e caprinos*. São Paulo: Roca, 2005.

ROSA, F.B.; CAPRIOLI, R.A.; SILVA, T.M.; GALIZA, G.J.N.; BARROS, C.S.L.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D. Doenças de caprinos diagnosticadas na região central no Rio Grande do Sul: 114 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p.199-204, 2013.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; JAYATILAKE, J. A. M. S.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes of *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 583-593, 2005.

SANTIN, R.; MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M. O. ; LELLING, J. S.; MARTINS, A. A.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. Diagnóstico de Micoses em Pequenos Animais da Cidade de Pelotas-RS e Região. In: XVI CIC / IX ENPOS, 2007, Pelotas. *Anais...* XVI CIC / IX ENPOS, 2007. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/cic/2007/cd/pdf/CA/CA_01547.pdf> Acesso em: 06 ago 2012.

SIDRIM, J.J.C.; MAIA, D.C.B.S.C.; BRILHANTE, R.S.N.; SOARES, G.D.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G.. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): *In vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology*, v. 145, p. 324-328, 2010.

SILVA, S. T. G.; SOUZA, J. C. A.; IZABEL, M. A.; RIET-CORREA, F.; PORTELA, R. A.; DANTAS, A. F.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B. Criptococose em Ovino: relato de caso. IN: *Anais...* VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, Belo Horizonte, MG. Disponível em <http://www.vet.ufmg.br/cursos> Acesso em 22 jun. 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEVEDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*. v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

SPANAMBERG, A.; SANHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causadas por leveduras. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.1, 2009.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, v.40, p.175–179, 2000.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; MENDONZA, M. H.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; SEGURA-ROCA, G. Cryptococcosis by *Cryptococcus gattii* in immunocompetent goats in Spain and review of the literature. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 245-253, 2006.

VIDOTTO, V.; PONTÓN, J.; AOKI, S.; QUINDÓS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO KUWA, S.; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología* v.21, p.70-24, 2004.

VIEIRA, R.G., COUTINHO, S.D.A.. Phenotypical characterization of *Candida* spp. Isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, p.452-456, 2009.

WALLACE, R.J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. *Journal Animal Science*, Champaign, v. 72, p. 2992-3003, 1994.

WROBEL, L., WHITTINGTON, J. K., PUJOL, C.; OH, S. H., RUIZ, M. O., PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., SOLL, D.R., HOYER, L.L.. Molecular phylogenetic analysis of a geographically and temporally matched set of *Candida albicans* isolates from Humans and Nonmigratory Wildlife in Central Illinois. *Eukaryotic Cell*, v.7, p.1475–1486, 2008.

YANG, Y-L.; LIN, C-C.; CHANG, T-P.; LAUDERDALE, T-L.; CHEN, H-T.; LEE, C-F.; HSIEH, C-W.; CHEN, P-C.; LO, H-J. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole. 2012.

YENİŞEHİRLİ, G.; BULUT, Y.; TUNÇOĞLU, E.; Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens. *Mikrobiyoloji Bulteni*, v. 44, p.71-77, 2010.

ZENG, X.; HOU, X.; WANG, Z.; JIANG, L.; XIONG, C; ZHOU, M.; CHEN, Q. Carriage rate and virulence attributes of oral *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Mycoses*, v. 52, p. 161-165, 2008.

ZOBELL, C.E. The influence of solid surface on the physiological activities of bacteria in sea water. *Journal of Bacteriology*. v.33, p. 86, 2003.