

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

DÉBORA CASTELO BRANCO DE SOUZA COLLARES MAIA

**LEVEDURAS ISOLADAS DO TRATO GASTRINTESTINAL DE
CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*): DETERMINAÇÃO DA
MICROBIOTA E ANÁLISE FENOTÍPICA**

FORTALEZA

2009

DÉBORA CASTELO BRANCO DE SOUZA COLLARES MAIA

LEVEDURAS ISOLADAS DO TRATO GASTRINTESTINAL DE
CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*): DETERMINAÇÃO DA
MICROBIOTA E ANÁLISE FENOTÍPICA

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 carnívoros, herbívoros, onívoros e aves.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

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

FORTALEZA

2009

DÉBORA CASTELO BRANCO DE SOUZA COLLARES MAIA

LEVEDURAS ISOLADAS DO TRATO GASTRINTESTINAL DE
CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*): DETERMINAÇÃO DA
MICROBIOTA E ANÁLISE FENOTÍPICA

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: 08/12/2009

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

Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Examinadora

Profa. Dra. Adriana de Queiroz Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Aos meus pais, com muito amor.

“Keep swimming...”

Dore (Walt Disney’s Finding Nemo)

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Professor Marcos Fábio Gadelha Rocha pela orientação e pelos ensinamentos, pelo dom de ser um mestre.

À Professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela orientação, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor José Júlio Costa Sidrim, pelos alicerces do Centro Especializado em Micologia Médica.

À Professora Rossana Aguiar Cordeiro, pelos ensinamentos.

Ao Professor André Jalles Monteiro, pela sua capacidade estatística.

À Terezinha de Jesus, ao Daniel Teixeira Lima e à Monalisa Cunha, por todo o suporte proporcionado para a realização de nossas pesquisas.

À equipe do CEMM, pela convivência divertida e prazerosa.

Ao Guilherme Duarte Peixoto Soares, pelo companheirismo e por toda a ajuda e disposição para execução do projeto.

A Deus, pelo ser e pelo estar, pela vida abençoada que me foi concedida e pelas pessoas que amo.

Aos meus pais, José Eugenio Collares Maia e Elizabeth Castelo Branco de Souza, pela vida, amor incondicional, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus avós, Luiz Lage Maia, Eurydice Collares Maia, Mário Lopes de Souza e Maria Fátima Castelo Branco de Souza, pelo amor, apoio e pelas incríveis memórias dos tempos passados juntos.

Ao Fernando Silva Vieira da Fonseca, meu padrasto e amigo, pela amizade e pelo apoio.

Ao meu irmão, Carlos Eduardo Castelo Branco de Souza Collares Maia, pela convivência e pelo companheirismo.

À minha madrinha e tia, Regina Castelo Branco de Souza, pelo amor, amizade e pelas risadas.

Ao Marcio Gomes de Alencar Araripe, pelo amor, amizade, cumplicidade, companheirismo, em suma, por tornar a vida mais prazerosa e simples.

À minha família, especialmente aos meus primos, por todo o tempo passado juntos, por toda a amizade, bagunça e brincadeira

Às famílias Vieira da Fonseca e Gomes de Alencar Araripe pela amizade e pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos de infância, especialmente à Angélica Barreto Gonçalves Barreira, minha melhor amiga, companheira para todas as horas.

Aos meus amigos de faculdade, com carinho especial para Camila Louise Ackermann, Joelma Moura Alvarez, Vítor Luz Carvalho, Fernanda Ribeiro Remedios, Tereza D'Ávila de Freitas Aguiar e Natália Pereira Paiva Freitas.

Aos animais, razão da minha profissão, por inspirarem paz e por tornarem a vida tão divertida

Aos meus amores caninos que marcaram minha vida, como exemplos de lealdade, amor e companheirismo. Petrus, Talita, Jeff, Dryska, Yasmin, Athena, Joy Maria, Scooby, Magali e Pandora, muito obrigada!

RESUMO

As calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) representam a segunda espécie de psitacíforme mais criada no mundo como animal de estimação, sendo, comumente, mantidas em íntimo contato com humanos. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar a microbiota por leveduras do trato gastrointestinal de calopsitas e estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* e avaliar a produção de fosfolipase para os isolados de *Candida* spp. Para tanto, foram avaliadas 60 calopsitas, da cidade de Fortaleza. A colheita de material da cavidade oral e da cloaca foi realizada com auxílio de swabs e a do ingluvío se deu por meio da lavagem com solução salina estéril. As fezes foram coletadas do ambiente com auxílio de espátulas. O material foi semeado em ágar YEPD (extrato de levedura peptona dextrose) acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L) e ágar semente de níger. A identificação das espécies baseou-se nas características micromorfológicas e bioquímicas. Ademais, 39 isolados de *C. albicans*; 12 de *C. tropicalis*; 07 de *C. parapsilosis* e 01 de *C. krusei* foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo, frente a anfotericina B, itraconazol e fluconazol, segundo metodologia padronizada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (documento M27-A2), e ao teste de produção de fosfolipase, em ágar gema de ovo. O teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado para analisar as distribuições de frequência, dentre as categorias estudadas. Observou-se o crescimento de leveduras em 65% das aves, considerando pelo menos um sítio anatômico, e 64,28% das amostras de fezes. A cavidade oral (53,33%) e o ingluvío (58,33%) foram os sítios com maior prevalência e maior número de isolados. Obtiveram-se 120 isolados, pertencentes a treze espécies, sendo *Candida albicans* (32,5%) a mais prevalente, seguida de *C. tropicalis* (20%) e *Trichosporon asteroides* (12,5%). Todos os isolados testados foram sensíveis a anfotericina B (CIM=0,25 a 1 µg/mL). Para itraconazol e fluconazol as CIMs foram de 0,03125 a ≥16 µg/mL e 0,5 a ≥64 µg/mL, respectivamente. Quatorze (35,89%) e quatro (10,26%) isolados de *C. albicans* mostraram-se resistentes ao itraconazol e ao fluconazol, respectivamente. Quanto à produção de fosfolipase, todos os isolados de *C. albicans* foram positivos, enquanto que somente 40% dos isolados de *Candida* não-*albicans* apresentaram atividade enzimática. Em suma, as calopsitas albergam leveduras potencialmente patogênicas no trato gastrointestinal, pertencentes à microbiota, com ênfase para *C. albicans*, considerando-se o fenômeno de resistência aos azólicos testados, apresentado por alguns isolados, e a elevada produção de fosfolipase.

Palavras-chave: *Nymphicus hollandicus*. Microbiota por leveduras. *Candida* spp. Fosfolipase. Sensibilidade a antifúngicos.

ABSTRACT

Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) are the world's second most popular psittacine pet bird and are commonly kept in close contact with human beings. This work aims at the characterization of gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels and determination of the antifungal susceptibility profile and evaluation of phospholipase production for *Candida* spp. For such, 60 cockatiels, from the city of Fortaleza, were assessed. Specimen collection from oral cavity and cloaca was performed with swabs, and from crop it was performed through lavage with sterile saline solution. Stools were collected from the environment with plastic spatula. The samples were cultured on YEPD (yeast extract peptone dextrose) agar, supplemented with chloramphenicol (0.5 g/L), and *Guizotia abyssinica* agar. Species identification was based on micromorphological and biochemical characteristics. Additionally, amphotericin B, itraconazole and fluconazole were tested against 39 isolates of *C. albicans*; 12 *C. tropicalis*; seven *C. parapsilosis* and one *C. krusei*, through broth microdilution test, according to the methodology proposed by Clinical Laboratory Standards Institute (document M27-A2). These same isolates were also tested for phospholipase production, on egg yolk agar. Pearson's chi-square test was used to analyze frequency distribution among the studied categories. Yeast growth was observed for 65% of the birds, considering at least one anatomical site, and 64.28% of stool samples. Oral cavity (53.33%) and crop (58.33%) were the sites with the highest prevalence and highest number of isolates. Overall, 120 isolates, belonging to 13 species, were obtained. *Candida albicans* (32.5%) was the most prevalent species, followed by *C. tropicalis* (20%) and *Trichosporon asteroides* (12.5%). All tested isolates were susceptible to amphotericin B (MICs=0.25 to 1 µg/mL). MICs for itraconazole and fluconazole were 0.03125 to ≥16 µg/mL and 0.5 to ≥64 µg/mL, respectively, and resistance was observed in 14 (35.89%) and four (10.26%) *C. albicans* isolates, respectively. As for phospholipase production, all *C. albicans* isolates were positive, while only 40% of the non-*albicans Candida* species presented enzymatic activity. Briefly, cockatiels harbor potentially pathogenic yeasts in their gastrointestinal tract, with emphasis on *C. albicans*, considering the occurrence of azole resistance for some isolates, and the high phospholipase activity presented.

Keywords: *Nymphicus hollandicus*. Yeast microbiota. *Candida* spp. Phospholipase. Antifungal susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: a) Isolamento primário de leveduras a partir das fezes de calopsitas. Observam-se colônias características de *Candida* spp. (seta preta), *Cryptococcus* spp. (seta azul) e *Rhodotorula* spp. (seta vermelha); b) Isolamento primário de leveduras, a partir de swab de cloaca de calopsitas. Observam-se várias colônias de *Trichosporon* spp. 13

Figura 2: Microcultivo de *C. albicans* em ágar fubá acrescido de Tween 80. Observa-se a presença de clamidoconídio (seta). 14

Figura 3: Microcultivo de *C. krusei*, em ágar fubá acrescido de Tween 80. Observam-se blastoconídios achatados, paralelos ao eixo central da pseudo-hifa (seta). 14

Figura 4: Microcultivo em lâmina de *T. ovoides*, em ágar malte 2%. Observam-se hifas, artroconídios longos e retangulares e apressórios (setas)..... 15

Figura 5: a) Prova de assimilação de nitrogênio para *Candida* spp. Observa-se a formação de halo onde ocorreu o crescimento fúngico, indicando assimilação de peptona (seta). b) Prova de assimilação carboidratos para *Rhodotorula* spp. Nota-se a formação de halos rosados, indicando a assimilação de três carboidratos (setas). 16

Figura 6: Crescimento de *Candida* spp. em meio cromogênico. A coloração verde é indicativa de *C. albicans*, a azul de *C. tropicalis* e a lilás de *Candida* spp. Observa-se a presença de colônias mistas (seta). 16

Figura 7: Avaliação da produção de fosfolipase por cepas de *C. albicans*, em meio ágar gema de ovo. Observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca, indicativa da produção da enzima. A linha vermelha representa o diâmetro da colônia e a azul o diâmetro total. 21

CAPÍTULO 1

Figure 1: Distribution of yeasts isolated from oral cavity, crop, cloaca and stools from 60 cockatiels 50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table I: Clinical score of the analyzed cockatiels and the observed CFU counts. 51

Table II: Species of yeasts isolated from different collection sites from 60 cockatiels 52

CAPÍTULO 2

Table 1: Minimal inhibitory concentration of amphotericin B, itraconazole and fluconazole against 59 isolates of *Candida* spp. from gastrointestinal tract of cockatiels. 73

Table 2: Phospholipase activity of 59 isolates of *Candida* spp. from gastrointestinal tract of cockatiels. 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
CFU	Colony-forming unit
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
HIV	Human immunodeficiency virus
MIC	Minimal inhibitory concentration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Pz	Atividade de fosfolipase
YEPD	yeast extract peptone dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Um breve histórico sobre Calopsita	3
2.2 Leveduras como parte da microbiota gastrointestinal de aves	4
2.3 Potencial patogênico de leveduras isoladas de aves.....	6
• <i>Candida</i> spp.	6
• Complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	9
• <i>Trichosporon</i> spp.	11
• <i>Rhodotorula</i> spp.....	12
2.4 Identificação fenotípica das espécies de leveduras	12
2.5 Teste de sensibilidade a antifúngicos	17
2.6 Secreção de fosfolipases como fator de virulência de <i>Candida</i> spp.	19
2.7 Potencial zoonótico	24
3 JUSTIFICATIVA.....	26
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	27
5 OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVO GERAL.....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6 CAPÍTULO 1.....	29
7 CAPÍTULO 2.....	53
8. CONCLUSÕES	75
9. PERSPECTIVAS.....	76
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

A calopsita (*Nymphicus hollandicus*) é uma ave de origem australiana, pertencente à ordem *Psittaciforme*, à família *Psittacidae* e à subfamília *Cacatuinae*, representando a menor espécie de cacatua existente. Atualmente, é a segunda espécie de psitaciforme mais criada no mundo, como ave de estimação, e, desde 1998, foi classificada, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), como pertencente à fauna doméstica.

Em Fortaleza, Ceará, tem se observado um crescente aumento na procura por essa espécie aviária como animal de estimação, sendo cada vez mais comuns em lojas de animais, bem como nas residências. Para atender as exigências do mercado *pet*, quanto à oferta de aves mansas, que aceitam a manipulação, comumente, são criadas artificialmente e, após o empenamento, são mantidas soltas nas casas, havendo um contato íntimo entre homem e animal.

No entanto, por serem aves bastante sensíveis e por serem, muitas vezes, mantidas sob condições inadequadas de manejo, freqüentemente, são acometidas por infecções fúngicas, principalmente, por *Candida* spp.

Sabe-se que as leveduras são componentes da microbiota do trato gastrointestinal das aves, principalmente as do gênero *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. A composição da microbiota pode variar de acordo com a espécie aviária estudada e não foram encontrados, na literatura, trabalhos que caracterizem a microbiota de calopsitas.

É bastante relatado no meio científico o papel das aves de vida livre ou de cativeiro como reservatórios e carreadoras de leveduras potencialmente patogênicas para o homem e para outros animais. Essas aves teriam um importante papel na contaminação ambiental e na manutenção desses agentes fúngicos no ambiente, devido à presença de compostos nutritivos para os fungos, nas fezes.

Por último, há relatos do desenvolvimento de candidíase e de criptococose, tanto em humanos imunocomprometidos, como em imunocompetentes, após a exposição a excretas aviárias. Portanto, considerando a proximidade da relação entre calopsitas e pessoas, torna-se importante caracterizar a microbiota dessas aves e avaliá-la quanto à presença de leveduras potencialmente patogênicas para os seres humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Um breve histórico sobre Calopsita

A calopsita (*Nymphicus hollandicus*) é uma ave originária da Austrália, que pertence à ordem *Psittaciforme* e à família *Psittacidae*, subfamília *Cacatuinae* (Sistema Integrado de Informação Taxonômica), sendo a menor cacatua existente. Foi inicialmente descrita pelo escritor e naturalista escocês Robert Kerr, em 1792, como *Psittacus hollandicus*. Em 1832, Wagler propôs a classificação da espécie em um novo gênero, *Nymphicus*, em homenagem às ninfas da mitologia. O nome científico dessa espécie significa pequenas ninfas da Nova Holanda, nome dado à Austrália, na época (VILAMAZONIA, 2008).

Apresentam, em média, 30 a 33 cm de comprimento, 45 cm de envergadura e o peso varia de 80 a 150 gramas. Habitam regiões áridas e semi-áridas da Austrália, próximas a fontes de água, e possuem hábitos nômades, acompanhando o ciclo das chuvas, em busca de alimentos (HYDE, et al., 2006; MATHIAS, 2008). Na natureza, alimentam-se, principalmente, de sementes, sendo a semente de sorgo a mais comumente ingerida. Possuem o hábito de se alimentar no solo, em bandos, cujo tamanho médio é de 27 aves (JONES, 1987).

Em 1838, John Gould, ornitólogo inglês, visitou a Austrália objetivando conhecer a fauna local e realizar ilustrações de aves. Ao retornar à Inglaterra, em 1840, Gould levou consigo 800 espécimes de aves e ninhos e ovos de mais de 70 espécies distintas, quando, incidentalmente, descobriu o periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*). Acredita-se que esse pesquisador tenha sido a primeira pessoa a levar calopsitas para fora da Austrália, contribuindo para a divulgação da espécie. Em 1848, publicou o livro *The Birds of Australia*, o qual foi o responsável pela divulgação das espécies de aves australianas (HETHERINGTON).

Por volta de 1884, as calopsitas já se encontravam bem estabelecidas nos aviários europeus. Entretanto, a disseminação dessa ave ocorreu após o surgimento da primeira mutação de cor, na Califórnia, em 1949 (MATHIAS, 2008). Posteriormente, outros padrões de cores foram sendo fixados e a espécie foi se tornando cada vez mais popular, representando, atualmente, a segunda espécie de psitaciforme mais popular no mundo, como animal de estimação, ficando atrás, somente, dos periquitos australianos (AUSTRALIAN MUSEUM, 2006).

A partir de 1970, a espécie começou a ser introduzida no Brasil (MATHIAS, 2008). De acordo com o Anexo 1 da Portaria nº 93, de 07 de julho de 1998, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a espécie *Nymphicus*

hollandicus, incluindo suas mutações, é considerada como pertencente à fauna doméstica, em todo o território nacional.

2.2 Leveduras como parte da microbiota gastrintestinal de aves

De acordo com de Hoog et al., 2000, levedura é um termo descritivo para qualquer fungo que se reproduz por brotamento, cuja unidade funcional é o blastoconídio. As espécies denominadas de leveduras se encontram classificadas nas classes *Hemiascomycetes*, da divisão *Ascomycota*, e *Hymenomycetes* e *Urediniomycetes*, da divisão *Basidiomycota*.

Superficialmente, são definidas como organismos unicelulares, brancos ou avermelhados. A formação de cadeias celulares coesas (pseudomicélio) é comum, inclusive, algumas espécies apresentam, estritamente, talos hifais, sem células em brotamento, produzindo artroconídios. Essas espécies são tratadas como leveduras por serem filogeneticamente semelhantes a uma das classes supracitadas (DE HOOG et al., 2000).

A maioria das leveduras clinicamente relevantes se reproduz por processos vegetativos, cujos principais mecanismos são o brotamento celular, a fissão celular e a divisão binária (DE HOOG et al., 2000).

As principais espécies de leveduras encontradas na microbiota dos diversos sistemas orgânicos das aves pertencem aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, (CRAGG; CLAYTON, 1971; KOCAN; HASENCLEVER, 1972; MANCIANTI et al., 2001; MELVILLE et al., 2004; GRÜNDER et al., 2005; CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2006b; GARCIA et al., 2007), *Malassezia* (GRÜNDER et al., 2005), *Cryptococcus*, *Trichosporon* (CRAGG; CLAYTON, 1971; GRÜNDER et al., 2005; CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2006b; GARCIA et al., 2007) e *Rhodotorula* (CRAGG & CLAYTON, 1971; MANCIANTI et al., 2001; MELVILLE et al., 2004; CAFARCHIA et al., 2006; GARCIA et al., 2007).

Dentre os gêneros supracitados, *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* são encontrados, freqüentemente, no trato gastrintestinal ou nas fezes das aves (CRAGG; CLAYTON, 1971; KOCAN; HASENCLEVER, 1972; MANCIANTI et al., 2001; MELVILLE et al., 2004; CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2006b).

Cragg e Clayton, 1971, isolaram, a partir da cultura de fezes frescas de gaivotas (*Larus occidentalis*), leveduras dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*. Dentre as espécies de *Candida* spp., obtiveram isolados de *C. albicans*, em 21,7% das amostras, *C. guilliermondii* (4,2%), *C. krusei* (1,2%) e *C. glabrata* (0,6%). A partir da cultura de fezes dessecadas, isolaram-se seis espécies de *Candida* spp., sendo *C. parapsilosis* (2,4%) e *C. albicans* (1,6%) as mais prevalentes.

Kocan e Hasenclever, 1972, isolaram leveduras dos gêneros *Candida* e *Saccharomyces* em 56,3% das aves, a partir de swabs de cavidade oral de 247 columbiformes, pertencentes a sete espécies distintas. As espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* e *C. guilliermondii*.

Em um estudo sobre a ocorrência de leveduras em fezes de psitacídeos em cativeiro, 49,2% das amostras foram positivas quanto à presença de fungos, abrangendo 27 espécies diferentes, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Obteve-se uma prevalência de 62% para *Candida* spp., e as espécies mais encontradas foram *C. pelliculosa* (24%), seguida por *C. famata* (18,4%). Apenas 1,3% dos isolados era representado por *C. albicans* (MANCIANTI et al., 2001).

Melville et al., 2004, em um estudo sobre a microbiota presente na cloaca e na cavidade oral de avestruzes hígdos, obtiveram 8% e 50% de amostras positivas para leveduras na cloaca e na cavidade oral, respectivamente. Da cloaca, foram isolados os gêneros *Candida* e *Rhodotorula* e, da cavidade oral, foram isolados os gêneros *Candida*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*.

Cafarchia et al., 2006a, após a realização de swabs de cloaca em 421 aves silvestres migratórias européias, pertencentes a sete espécies distintas, isolaram leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*, em 15,7% dos espécimes. A espécie mais isolada foi *R. mucilaginosa* (28,2%), seguida por *Cryptococcus albidus* (18,4%) e por *Candida albicans* (9,2%). Dentre as sete espécies de *Candida* spp. isoladas, *C. albicans* foi a que apresentou o maior número de isolados, seguida por *C. guilliermondii* (6,1%) e *C. tropicalis* (6,1%).

Em um outro estudo com 182 aves de rapina européias de 18 espécies distintas, Cafarchia et al., 2006b, isolaram *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Rhodotorula* spp., por meio da realização de swabs de cloaca, em 18 animais (9,9%). A espécie mais isolada foi *R. mucilaginosa*, representando 4,4% do total de aves, seguida por *C. neoformans* (2,2%). Cinco espécies de *Candida* spp. foram isoladas, em 2,7% das aves, sendo elas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. incospicua*, *C. famata* e *C. pelliculosa*.

Foram analisadas, também, 32 amostras de fezes, pertencentes a 18 espécies de aves de rapina européias, sendo possível o isolamento de leveduras em 43,7% das amostras. As duas espécies mais isoladas foram *R. mucilaginosa* e *C. neoformans*, seguidas por *C. albicans*. Ademais, foram isolados também *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. tropicalis* e *T. cutaneum* (CAFARCHIA et al., 2006b).

Ainda no mesmo estudo, 60 rapinantes de seis espécies distintas foram necropsiados e amostras foram colhidas, com o auxílio de swabs, de quatro segmentos do trato gastrointestinal:

inglúvio, pró-ventrículo, ventrículo e cloaca. Foram isoladas leveduras dos gêneros *Candida* e/ou *Rhodotorula*, em 25% das aves (CAFARCHIA et al., 2006b).

Do inglúvio, foram isoladas *C. albicans*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. Do pró-ventrículo, obteve-se, somente, *R. mucilaginosa* e, do ventrículo, não foram isoladas leveduras. Da cloaca, isolaram-se *C. albicans*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *R. mucilaginosa*. A espécie com o maior número de isolados foi *C. albicans* (44,4%) e os sítios anatômicos que apresentaram um maior número de isolados foram inglúvio e cloaca. Acredita-se que a distribuição das leveduras no trato gastrointestinal possa ser influenciada por características fisiológicas dos diferentes segmentos, como pH e temperatura (CAFARCHIA et al., 2006b).

Kocijan et al., 2009, analisaram cinco amostras de conteúdo do inglúvio e dez amostras de fezes de filhotes de grifo (*Gyps fulvus*), capturados do ninho para pesagem e acompanhamento do crescimento. A partir desse material, foram isoladas *Candida* spp. de quatro amostras de conteúdo do inglúvio e *Candida* spp. e *R. mucilaginosa* de nove e de uma amostra de fezes, respectivamente.

É possível observar uma grande variedade na composição da microbiota, entre as várias espécies de aves estudadas, a qual é influenciada por fatores biológicos espécie-específicos, como ecologia, dieta, comportamento e habitat (CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2006b). No entanto, apesar das variações, pode-se constatar que *Candida* spp. encontra-se amplamente distribuída, no trato gastrointestinal das aves, como parte da microbiota.

2.3 Potencial patogênico de leveduras isoladas de aves

Dentre as leveduras, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp. e *Saccharomyces* spp. podem provocar doenças cutâneas ou sistêmicas no homem e em outros animais (CAFARCHIA et al., 2006a), apesar destes gêneros fazerem parte da biota do trato gastrointestinal, da pele ou do aparelho urinário (MANCIANTI, 2001; CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2008).

A seguir, serão apresentados os principais gêneros de leveduras isolados de casos clínicos e as principais características das doenças provocadas, em aves e em seres humanos.

- *Candida* spp.

Candida spp. é considerada habitante comum do trato gastrointestinal das aves, sendo importante patógeno para filhotes e para indivíduos imunossuprimidos, devido à presença de enfermidades virais, de subnutrição, de fatores estressantes, dentre outras causas (MORETTI

et al., 2000; VELASCO, 2000; SAMOUR; NALDO, 2002; KLAPHAKE; CLANCY, 2005; GELLIS, 2006; GARCIA et al., 2007; OSORIO et al., 2007).

Na maioria dos casos, a candidíase tem origem endógena, em indivíduos predispostos ao crescimento excessivo dos microorganismos da biota (MORETTI et al., 2000; SAMOUR; NALDO, 2002; KLAPHAKE; CLANCY, 2005). No entanto, foi observado que a doença pode ser transmitida por meio de fômites e de sondas oro-esofágicas contaminadas (MORETTI et al., 2000; SAMOUR; NALDO, 2002). A espécie mais comumente implicada é a *C. albicans*, mas outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. rugosa* têm sido isoladas (MORETTI et al., 2000; VELASCO, 2000; SAMOUR; NALDO, 2002; GELLIS S., 2006; GARCIA et al., 2007).

Os psitacíformes, como calopsitas, periquitos australianos e cacatuas (*Cacatuas* spp.) são altamente suscetíveis a infecções por esses microorganismos, sendo o trato gastrointestinal superior o sistema mais afetado, em particular orofaringe, inglúvio e esôfago (MORETTI et al., 2000; VELASCO, 2000; GELLIS, 2006).

A micose no inglúvio de aves pode se desenvolver como uma infecção primária ou secundária, na maioria dos casos, devido à presença de *C. albicans*, de *C. tropicalis* e de *C. krusei*. O inglúvio é suscetível a infecções por espécies de *Candida*, por ser um órgão saculiforme, contendo vários nutrientes necessários para o crescimento fúngico (KANO et al., 2001).

Tsai et al., 1992, encontraram uma incidência de 15,4% de candidíase, em 241 psitacíformes e passeríformes que foram a óbito, em duas semanas de quarentena, após a importação para o Japão. Trinta e sete aves apresentavam lesões por *Candida* spp., em vários órgãos, principalmente, na cavidade nasal, no inglúvio, no esôfago, no pró-ventrículo e no ventrículo. A região vestibular da cavidade nasal foi, freqüentemente, acometida pela levedura, observando-se alterações hiperqueratóticas neste sítio anatômico, bem como em outras mucosas, como inglúvio, ventrículo e cloaca. Os autores relataram que a cavidade nasal representou um importante sítio de entrada e de multiplicação para os microorganismos.

Em 2000, Moretti et al. relataram a ocorrência de ingluvite e de pró-ventriculite necrosante, associada à presença de *Candida* spp. em nove, de 20 perus (*Meleagris gallopavo*) necropsiados. Desses animais, quatro apresentavam infecções isoladas por *C. rugosa* e cinco apresentavam infecções mistas. Das 20 aves necropsiadas, isolou-se *C. rugosa*, em todas as aves, a partir de swabs de papo, de pró-ventrículo, de esôfago e de sacos aéreos. Em 12 exemplares, *C. rugosa* estava associada a *C. albicans* e a uma das seguintes espécies: *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon pullulans* ou *C. famata*. Os autores

argumentaram que a idade dos animais (seis semanas) e a presença de infestações parasitárias concomitantes (coccidiose) foram fatores fundamentais para o estabelecimento da doença.

Kano et al., 2001, diagnosticaram, por histopatologia e imunohistoquímica, a ocorrência de ingluvite hiperqueratótica, em uma calopsita de dois meses, associada a *Candida* spp.. A espécie envolvida, *C. parapsilosis*, foi identificada por meio de técnicas moleculares.

Samour e Naldo, 2002, relataram que, em três anos, dos 3760 rapinantes levados ao Falcon Medical Research Hospital, na Arábia Saudita, 11 (0,3%) apresentavam candidíase, exibindo perda de apetite, regurgitação e perda de peso progressiva. *C. albicans* foi identificada como o único agente envolvido.

Scullion e Scullion, 2007, em um levantamento em nove pombos correio acometidos por *young bird sickness*, constataram a presença de candidíase oral, em um indivíduo; de ingluvite, em sete; de esofagite, em seis, e de enterite, em três exemplares. *Candida* spp. foi apontada como um dos agentes causais de tais lesões, associada ou não à infecções parasitárias (tricomoniase, coccidiose, ascaridiose) e/ou bacterianas.

Garcia et al., 2007, após a realização de culturas de swabs traqueais de aves, oriundas de um centro de reabilitação na Espanha, obtiveram uma prevalência de 65,21% para esse gênero fúngico. No entanto, não foi possível comprovar a presença de enfermidade, associada às colônias positivas. A espécie *C. albicans* foi a mais isolada, seguida pela *C. parapsilosis*, espécie que vem sendo isolada, mais frequentemente, nos casos de candidíase clínica, em homens e em várias outras espécies animais (VELASCO, 2000; GARCIA et al., 2007).

Osorio et al., 2007, relataram a ocorrência de candidíase, por *C. albicans*, na crista de galos, mantidos em dois galpões diferentes, com morbidade de 10% e de 2%, em cada galpão. As lesões caracterizavam-se pela presença de áreas esbranquiçadas, focais ou difusas, com aspecto escamoso ou crostoso. Subjacentes às crostas, observavam-se áreas de inflamação tecidual aguda.

Vieira e Acqua-Coutinho, 2009, observaram a ocorrência de ingluvite em 18 de 40 filhotes de papagaio (6 *Amazona amazonica* e 34 *A. aestiva*) apreendidos pela polícia ambiental. Após a realização de swabs de inglúvio nas 40 aves, observaram o crescimento de *Candida* spp. em 23 indivíduos (57,5%), dos quais 13 apresentavam sinais clínicos da doença. No total, foram obtidos 25 isolados, pertencentes a cinco espécies: *C. humicola* (28%), *C. parapsilosis* (24%), *C. guilliermondii* (20%), *C. famata* (20%) e *C. albicans* (8%).

Em 1995, foi publicada uma lista, contendo várias espécies de leveduras, consideradas patógenos emergentes, naquele período. Dentre as 25 espécies citadas, 20 pertenciam ao

gênero *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. pelliculosa*, dentre outras (HAZEN, 1995).

Em seres humanos, as espécies mais frequentemente implicadas em quadros clínicos são *C. albicans*, predominante em todo o mundo, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, na América Latina, e *C. glabrata* nos Estados Unidos da América (PALACIO; VILLAR; ALHAMBRA, 2009), sendo as três primeiras as mais frequentemente isoladas de infecções em aves (VELASCO, 2000; SAMOUR; NALDO, 2002). Em seres humanos, as manifestações clínicas apresentam grande diversidade, podendo ser divididas em três grandes grupos: candidíase cutâneo mucosa, candidíase sistêmica ou visceral e candidíase alérgica (SIDRIM; ROCHA, 2004).

- Complexo *Cryptococcus neoformans*

A espécie *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da criptococose, uma enfermidade oportunista, que comumente se manifesta na forma de meningo-encefalite, principalmente em pacientes imunocomprometidos (TAY et al., 2005; ABEGG et al., 2006; SILVA et al., 2006; LUGARINI et al., 2008). Atualmente, a criptococose é uma das micoses sistêmicas mais comuns, no mundo, representando, no Brasil, 6% de todas as infecções, em pacientes com AIDS (LUGARINI et al., 2008).

Atualmente, denomina-se de complexo *Cryptococcus neoformans* as duas espécies patógenas mais importantes do gênero, *C. neoformans*, que possui duas variedades (*C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans*), e *C. gatti*. (ABEGG et al., 2006; LUGARINI et al., 2008; ROSARIO et al., 2008). A nova classificação de *C. gatti* como uma segunda espécie do complexo, baseou-se em diferenças na morfologia, na estrutura antigênica, no perfil de virulência, na epidemiologia da doença provocada, na ecologia e na distribuição geográfica (LUGARINI et al., 2008).

C. neoformans var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* têm sido isolados, em todo o mundo, mostrando preferência por solos contaminados com fezes de pombos (*Columba livia*) e de outras aves, as quais representam um importante nicho ecológico para o microorganismo, devido às elevadas concentrações de creatinina, que favorecem o seu crescimento (CHEE; LEE, 2005; LUGARINI et al., 2008; ROSARIO et al., 2008). Adicionalmente, também há relatos do isolamento de *C. neoformans* diretamente do papo e da cloaca de pombos (ROSARIO, 2008).

Devido à falta de evidências de transmissão direta indivíduo-indivíduo, sustenta-se a hipótese de que a infecção seja adquirida de fontes meio-ambientais, pela inalação de propágulos (FILÍÚ et al., 2002; LUGARINI et al., 2008; ROSARIO et al., 2008), que

apresentam dimensões compatíveis para que haja deposição alveolar (LUGARINI et al., 2008; ROSARIO et al., 2008).

Acreditava-se que as aves eram naturalmente resistentes à infecção, devido à elevada temperatura corporal das mesmas. No entanto, não só o agente tem sido isolado de fezes de aves, na ausência de sinais clínicos da doença, como também casos de acometimento sistêmico são descritos na literatura (VELASCO, 2000; ABEGG et al., 2006).

Raso et al., 2004, relataram a ocorrência de criptococose disseminada em sete psitacídeos, pertencentes a cinco espécies distintas (*Chamosyna papou*, *Lorius lory*, *Trichoglossus goldiei*, *Psittacula krameri*, *Psittacus erithacus*), oriundos de um criatório particular do Estado de São Paulo. Em cinco indivíduos, a doença se caracterizou pela ocorrência de incoordenação, paralisia progressiva e dificuldade de vôo, enquanto que as outras duas aves apresentaram lesões cutâneas e comprometimento respiratório. O exame histopatológico evidenciou a presença de blastoconídios em vários tecidos e o agente etiológico foi isolado de nódulo nasal, do fígado e das fezes de um animal, sendo identificado como *C. gattii*, sorotipo B.

A presença de *C. neoformans* tem sido relatada em excrementos de várias espécies de aves, pertencentes às ordens psitaciformes, columbiformes, passeriformes e falconiformes (CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2006b).

Filiú et al., 2002, por meio da cultura de 20 amostras de fezes dessecadas de aves, de origem variada, em Campo Grande (MS), obtiveram dez amostras positivas para *C. neoformans* var. *neoformans*, das quais seis eram de psitaciformes, sendo duas de calopsitas.

Em um estudo com 59 espécies de aves de 12 ordens diferentes, alocadas em 55 gaiolas, no zoológico de Sapucaia do Sul (RS), 18,18% das amostras de fezes dessecadas foram positivas quanto à presença de *Cryptococcus* spp. Foram obtidos 38 isolados, dos quais cinco (13%) eram *C. gatti* e 33 (87%) eram *C. neoformans* var. *grubii*. Todas as amostras positivas eram oriundas de gaiolas contendo psitaciformes, incluindo uma calopsita, o qual foi positiva para *C. neoformans* var. *grubii* (ABEGG et al., 2006).

Cafarchia et al., 2006, por meio da cultura de material da cloaca de 182 rapinantes europeus, pertencentes a 18 espécies, e de fezes, oriundas de 32 recintos, onde as aves eram mantidas, constatou a presença de *C. neoformans* em 2,2% das aves e em 12,5% das amostras fecais.

No estado do Paraná, foi desenvolvida uma pesquisa com o intuito de isolar *C. neoformans* a partir de fezes dessecadas de psitaciformes e de passeriformes mantidos em lojas de animais, na cidade de Curitiba, e no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) – PUCPR/IBAMA, na cidade de Tijucas do Sul, próxima à capital. Das 141

amostras analisadas, 34 (24,11%) amostras de passeriformes e duas (1,42%) amostras de psitacíformes foram positivas. Nesse estudo foi isolado, somente, *C. neoformans* var. *grubii* (LUGARINI et al., 2008).

Há relatos que sugerem o desenvolvimento de criptococose humana, após a exposição à excreta de aves, em indivíduos imunocomprometidos que possuíam uma cacatua (NOSANCHUK et al., 2000) e uma calopsita (SHRESTHA et al., 2004) de estimação e em um indivíduo imunocompetente que possuía uma pega-rabuda (*Pica pica*) (LAGROU et al., 2005).

Em seres humanos, a criptococose é, mais comumente, caracterizada pela ocorrência de meningite, uma vez que o agente apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, mas pode acometer também o trato respiratório (VELASCO, 2000, CÔRREA et al., 2002).

- *Trichosporon* spp.

As espécies de *Trichosporon* são habitantes do solo e colonizadores comuns da pele e do trato gastrointestinal de seres humanos (MAVES; HALE, 2006). Comumente, ocasionam a micose superficial estrita, denominada de *pie*dra branca. No entanto, desde o primeiro relato de caso de infecção pulmonar por *Trichosporon* spp., em 1970 (MAVES; HALE, 2006; NETSVYETAYEVA et al., 2008), são relatados casos esporádicos de infecção sistêmica (FAGUNDES-JÚNIOR et al., 2008). A infecção disseminada é rara, porém potencialmente fatal, estando associada à imunossupressão (MEYER et al., 2002).

As duas espécies mais comumente implicadas, em casos de infecções humanas, são *T. inkin* e *T. asahii*. A ocorrência de *pie*dra branca e de outras infecções superficiais, como dermatomicoses, onicomicoses e otomicoses, está associada ao *T. inkin* (MAVES; HALE, 2006). A espécie *T. asahii* é a mais comumente isolada de infecções invasivas, denominadas de tricosporonoses (MAVES, 2006; FAGUNDES-JÚNIOR et al., 2008; NETSVYETAYEVA et al., 2008), que apresentam taxas de mortalidade variando de 80 a 100%, dependendo da velocidade com a qual o agente etiológico é identificado (NETSVYETAYEVA et al., 2008).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de tricosporonose são: doenças hematológicas, hemocromatose, uso de imunossupressores, corticoterapia, deficiência na função dos granulócitos, síndrome da imunodeficiência adquirida, queimaduras extensas, uso de cateteres venosos e cirurgia cardíaca valvar (MAVES; HALE, 2006; FAGUNDES-JÚNIOR et al., 2008).

Gartrell et al., 2005, relataram a ocorrência de dermatite eosinofílica, relacionada à presença de *T. asahii*, em calopsita, caracterizada pela presença de crostas e de áreas de alopecia na face, nas membranas patagiais, na superfície ventral das asas e na região superior

dos membros inferiores. Foi considerada como fator predisponente a ocorrência de hipovitaminose A, devido à dieta desequilibrada da ave.

- *Rhodotorula* spp.

As espécies de *Rhodotorula* encontram-se amplamente distribuídas na natureza e são, comumente, isoladas de fontes e de produtos ambientais. Anteriormente, era considerado um gênero não-patogênico, todavia, durante as duas últimas décadas, surgiu como agente oportunista, particularmente em pacientes imunossuprimidos (PERNIOLA et al., 2006; TUON; COSTA, 2008).

As infecções humanas mais comumente relatadas na literatura são fungemia associada a cateteres, endocardite, peritonite, meningite e endoftalmite. Em um levantamento literário sobre infecções por *Rhodotorula* spp., observou-se que 40% dos quadros de infecção ocorreram associados à imunossupressão. Outros fatores predisponentes observados foram as neoplasias, as doenças hematológicas e os transplantes (TUON; COSTA, 2008).

A espécie mais comumente isolada dos casos de fungemia foi *R. mucilaginosa*, seguida por *R. glutinis*. Foram relatados dois casos de endoftalmite, cujo agente etiológico era *R. minuta* (TUON; COSTA, 2008). Perniola et al., 2006, relataram a ocorrência de um surto de infecção por *R. mucilaginosa* em uma unidade de tratamento intensivo neonatal, na Itália. Todos os neonatos acometidos apresentavam trombocitopenia e, em 50%, foi observada a ocorrência concomitante de neutropenia.

Em aves, são poucos os relatos de infecção por esse gênero. Aruo, 1980, relatou dois surtos de dermatite necrosante, por *Rhodotorula* spp., em galinhas poedeiras, em Uganda. Beemer et al., 1970, relataram a ocorrência de uma epidemia de dermatite, atingindo a pele do dorso e dos membros inferiores, de frangos, associada ao isolamento de *R. mucilaginosa*. Os mesmos sinais clínicos e lesões foram produzidos, por meio da colocação de grandes quantidades do fungo, sobre a pele, previamente depenada, em aves sadias.

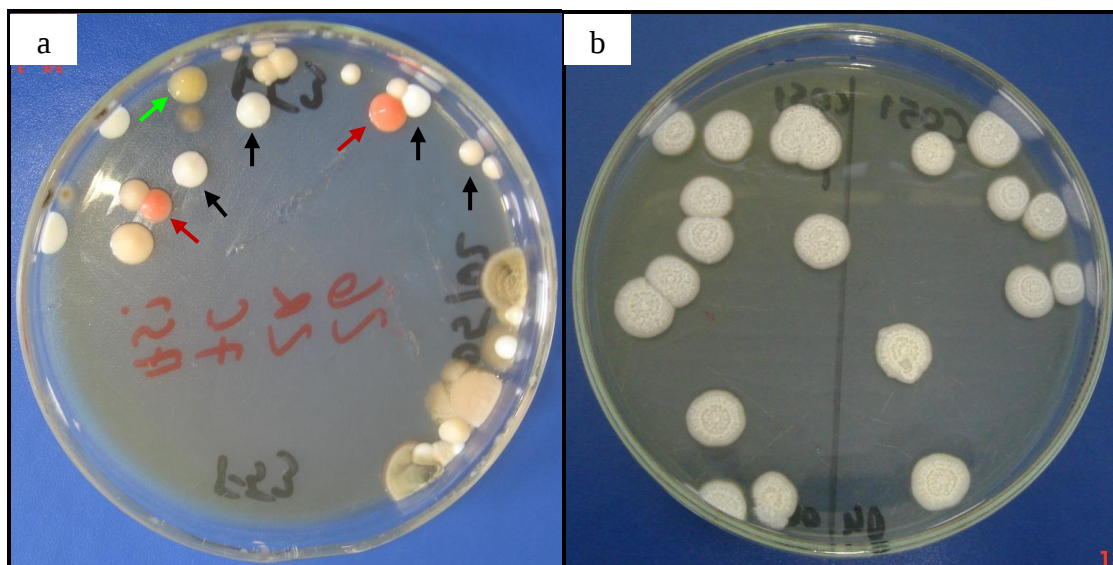
2.4 Identificação fenotípica das espécies de leveduras

Os quatro gêneros de leveduras descritos acima apresentam colônias distintas o que permite, muitas vezes, a determinação do gênero, com base na macroscopia. *Candida* spp., no geral, apresenta colônias lisas, úmidas ou secas, de coloração branca ou creme; *Cryptococcus* spp. forma colônias úmidas, mucóides de coloração creme, marrom ou avermelhada, dependendo do meio onde cresce e da espécie isolada; *Trichosporon* spp. apresenta colônias

secas, rugosas de coloração branca a creme e *Rhodotorula* spp. forma colônias úmidas ou secas, de coloração rosa a laranja (**FIG. 1**) (DE HOOG et al., 2000).

Entretanto, a identificação das espécies requer a realização de testes fenotípicos, abrangendo características bioquímicas e micromorfológicas. Inicialmente, a realização da prova da urease em meio uréia de Christensen, que permite a detecção colorimétrica da enzima, determina à qual divisão pertence o microorganismo, sendo a divisão *Ascomycota* (*Candida* spp. e *Saccharomyces* spp.) urease negativa e a *Basidiomycota* (*Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp.) urease positiva (DE HOOG et al., 2000).

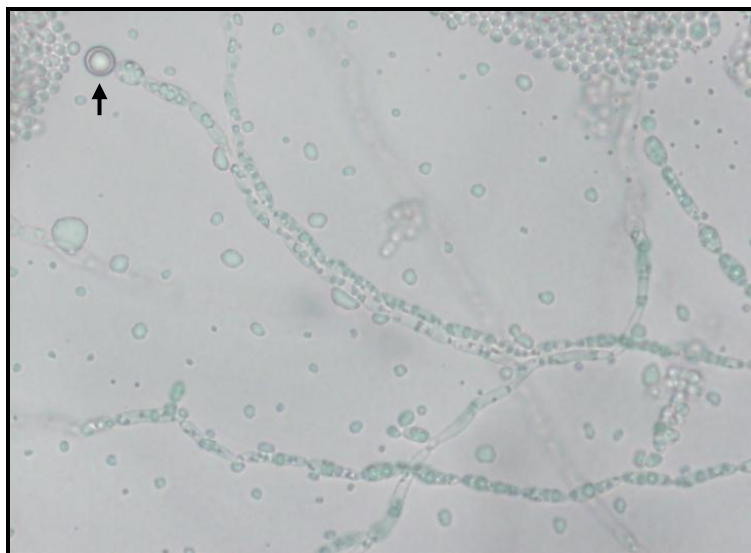
Posteriormente, são realizados testes micromorfológicos, como microcultivos em placa, para *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Rhodotorula* spp., e em lâmina, para *Trichosporon* spp., utilizando ágar arroz ou ágar fubá acrescido de Tween 80, para os dois primeiros gêneros, ou ágar extrato de malte a 2%, para os dois últimos (DE HOOG et al., 2000). Para muitas espécies de *Candida* spp. e de *Trichosporon* spp., a avaliação micromorfológica permite a identificação definitiva, uma vez que formam estruturas específicas (**FIG. 2-4**), como hifas e pseudohifas, dispostas em padrões característicos para cada espécie (MILAN; ZAROR, 2004; DE HOOG et al., 2000; GUÉHO et al., 1993). Contudo, tanto para *Cryptococcus* spp., quanto para *Rhodotorula* spp. as provas bioquímicas são essenciais para a identificação definitiva, uma vez que não formam hifas nem pseudohifas, quando submetidos a testes micromorfológicos (DE HOOG et al., 2000; GARCÍA-MARTOS et al., 2004).



Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

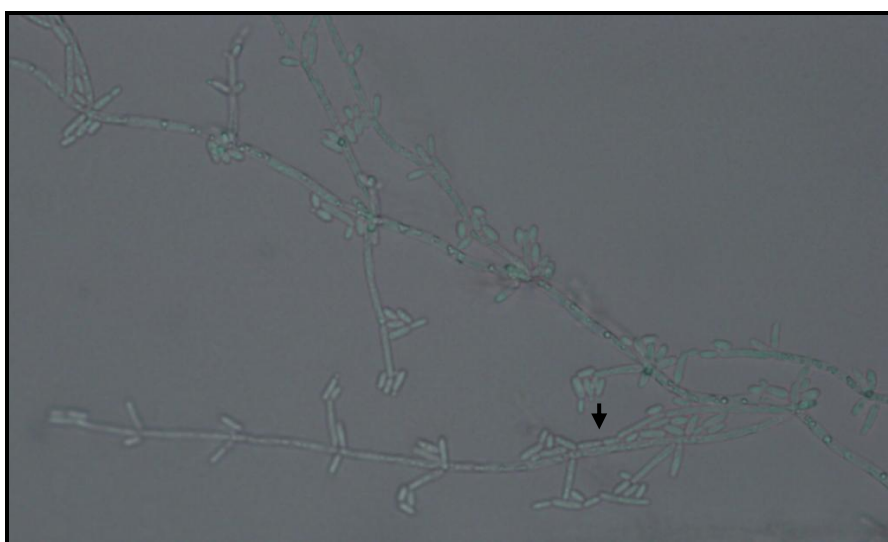
Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Figura 1: a) Isolamento primário de leveduras, em meio YEPD, a partir das fezes de calopsitas. Observam-se colônias características de *Candida* spp. (seta preta), *Cryptococcus* spp. (seta verde) e *Rhodotorula* spp. (seta vermelha); b) Isolamento primário de leveduras, em meio YEPD, a partir de swab de cloaca de calopsitas. Observam-se várias colônias de *Trichosporon* spp.



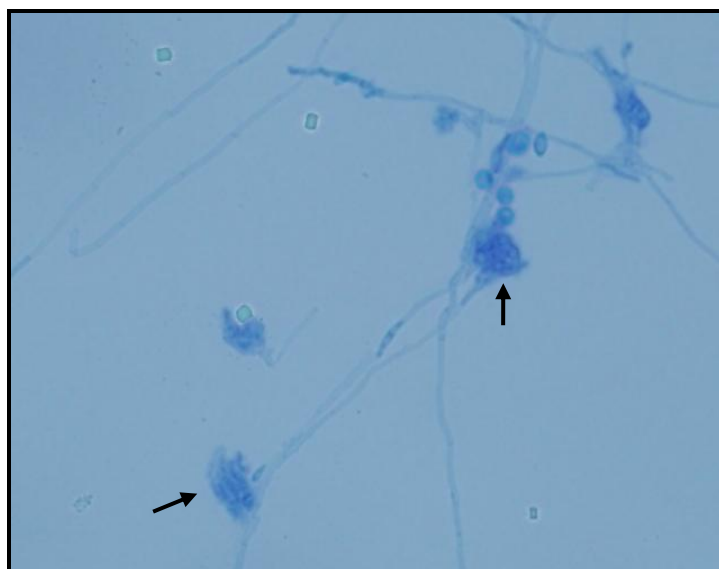
Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Figura 2: Microcultivo de *C. albicans* em ágar fubá acrescido de Tween 80. Observa-se a presença de clamidoconídio (seta).



Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Figura 3: Microcultivo de *C. krusei*, em ágar fubá acrescido de Tween 80. Observam-se blastoconídios achatados, paralelos ao eixo central da pseudo-hifa (seta).



Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

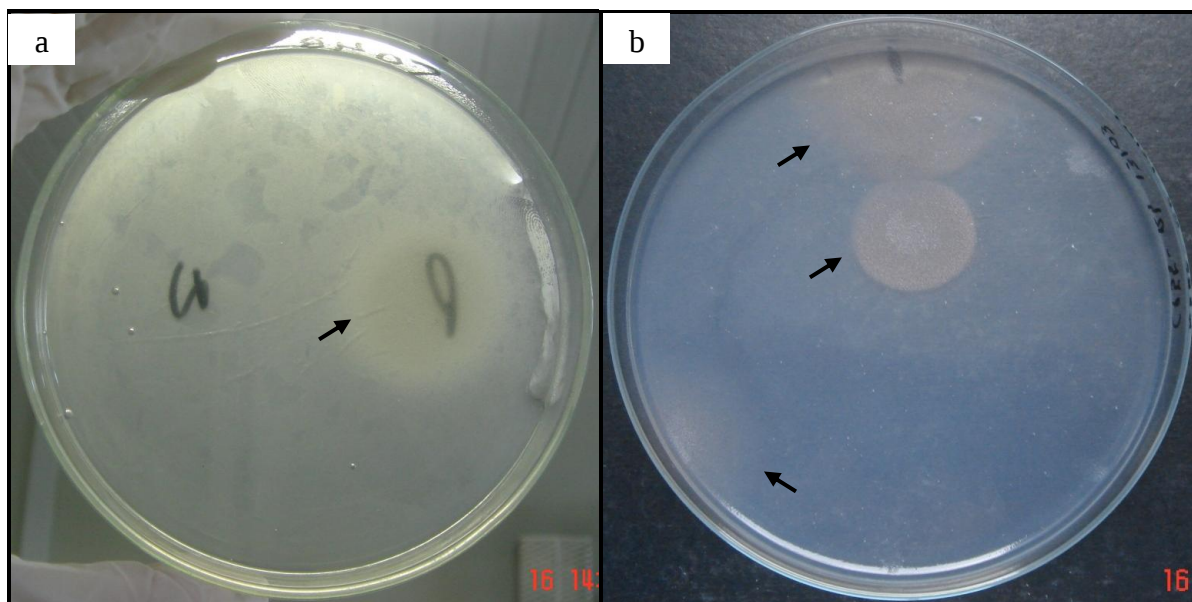
Figura 4: Microcultivo em lâmina de *T. ovoides*, em ágar malte 2%. Observam-se hifas, arthroconídios longos e retangulares e apressórios (setas).

Quanto às provas bioquímicas, as cepas de *Candida* spp. são submetidas às provas de assimilação e de fermentação de carboidratos e de assimilação de nitrogênio (**FIG. 5**) (BRITO et al., 2009). Por outro lado, *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp. e *Rhodotorula* spp. são submetidos somente aos testes de assimilação de carboidratos e de nitrogênio, uma vez que não apresentam características fermentadoras (GUÉHO et al., 1993; DE HOOG et al., 2000; GARCÍA-MARTOS et al., 2004).

As características de crescimento sob temperaturas distintas também podem ser utilizadas como uma ferramenta adicional para a identificação de algumas espécies de leveduras (GUÉHO et al., 1993; DE HOOG et al., 2000; GARCÍA-MARTOS et al., 2004). Ademais, alguns testes específicos podem ser realizados, como o crescimento em meios cromogênicos (**FIG. 6**) para *Candida* spp., com o objetivo de identificar colônias mistas e de realizar um diagnóstico presuntivo rápido (QUINDÓS et al., 2001) e em meios contendo concentrações distintas de cicloheximida, para *Candida* spp. e *Trichosporon* spp. (GUÉHO et al., 1993; DE HOOG et al., 2000) ou precursores para síntese de melanina, como o ágar semente de níger, para a identificação de *C. neoformans* e de *C. gattii* (DE HOOG et al., 2000; MILAN; ZAROR, 2004).

Adicionalmente, para diferenciar *C. neoformans* var. *neoformans* da var. *grubii* e de *C. gattii*, pode-se realizar a quimiotipagem das cepas, a qual envolve cultivos em meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). A variedade *neoformans* é sensível à glicina presente no meio, não havendo o crescimento da mesma. Portanto, a não alteração da cor do

meio, permanecendo esverdeado, é indicativa da variedade *neoformans* (DE HOOG et al., 2000; MILAN; ZAROR, 2004).



Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Figura 5: a) Prova de assimilação de nitrogênio para *Candida* spp. Observa-se a formação de halo onde ocorreu o crescimento fúngico, indicando assimilação de peptona (seta). b) Prova de assimilação carboidratos para *Rhodotorula* spp. Nota-se a formação de halos rosados, indicando a assimilação de três carboidratos (setas).



Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Figura 6: Crescimento de *Candida* spp. em meio cromogênico. A coloração verde é indicativa de *C. albicans*, a azul de *C. tropicalis* e a lilás de *Candida* spp. Observa-se a presença de colônias mistas (seta).

2.5 Teste de sensibilidade a antifúngicos

A necessidade de desenvolver testes precisos de sensibilidade a antifúngicos surgiu com a epidemia da AIDS, no início da década de 1980, quando se observou a relação entre a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e a ocorrência de candidíase orofaríngea, muitas vezes irresponsiva às drogas antifúngicas empregadas (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004; JOHNSON, 2008).

Como discutido no tópico anterior, a incidência de infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado, sobretudo, as candidíases invasoras (PALACIO; VILLAR; ALHAMBRA, 2009), incriminadas por 60% dos óbitos por infecções hospitalares (TAMURA et al., 2007). Estudos tem mostrado que a incidência de candidemia na Europa e nos Estados Unidos varia de 0,17 a 0,76 e de 0,28 a 0,96 a cada 1000 admissões, respectivamente, e a letalidade pode alcançar os 50% (MATTA et al., 2007).

Dessa forma, a instituição rápida de um plano terapêutico efetivo é crucial para a sobrevivência do paciente. Portanto, o conhecimento do perfil de sensibilidade a antifúngicos dos isolados fúngicos de uma determinada região é de grande importância para o estabelecimento de condutas terapêuticas e profiláticas adequadas.

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 apresentados 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 por desenvolver e padronizar uma metodologia reprodutível e exeqüível para laboratórios de rotina (NCCLS, 2002).

Em 1992, foi publicada a Norma M27-P, que padronizava o teste de macrodiluição em caldo, especificando o meio sintético a ser utilizado, o tamanho e a preparação do inóculo, a temperatura e o período de incubação e as diluições utilizadas. Posteriormente, em 1995, foi publicada a Norma M27-T, a qual continha as faixas de referência de CIM para os agentes antifúngicos disponíveis, frente a duas cepas controle de qualidade e padronizava a técnica de microdiluição em caldo. Em 1997, a Norma M27-A foi publicada, especificando os pontos de corte para os antifúngicos disponíveis e, em 2002, a Norma M27-A2 padronizou as faixas de referência de CIM 24 e 48 horas, para drogas previamente estabelecidas e recém lançadas (NCCLS, 2002).

O teste de microdiluição em caldo é realizado em placas acrílicas estéreis, com múltiplos poços (96 poços em formato de U) e consiste na exposição de um inóculo definido

de um determinado microorganismo a concentrações conhecidas das drogas testadas, sendo possível observar o efeito das mesmas sobre o crescimento fúngico. A leitura final determina a menor concentração da droga, capaz de inibir o crescimento do microorganismo, denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (NCCLS, 2002).

O objetivo final dos testes de sensibilidade é prever a resposta dos pacientes à terapia a ser instituída. No entanto, muitos fatores, além do perfil de sensibilidade *in vitro*, influenciam a resposta clínica, como o sítio de infecção, o status imunológico do hospedeiro, a farmacocinética da droga e a adesão do paciente à terapia. Portanto, o estabelecimento da correlação clínica direta entre os valores de CIM e o desfecho terapêutico ainda é limitado na terapia antifúngica (REX; PFALLER, 2002; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004).

Por outro lado, assim como para os testes de sensibilidade a antibacterianos, a regra 90-60 também parece ser útil para a avaliação da sensibilidade a antifúngicos, principalmente para os isolados de *Candida* spp., frente aos derivados azólicos. Tal regra preconiza que 90% das infecções causadas por microorganismos que apresentam sensibilidade *in vitro* e 60% das infecções causadas por microorganismos que apresentam resistência *in vitro* respondem bem à quimioterapia antimicrobiana *in vivo* (REX; PFALLER, 2002; KANAFANI; PERFECT, 2008). Assim, a realização de testes de sensibilidade torna-se importante, uma vez que pode orientar a instituição da terapia antifúngica mais adequada, direcionando o paciente aos 90% de sucesso terapêutico (REX; PFALLER, 2002).

Apesar da correlação entre o sucesso terapêutico e os resultados de sensibilidade *in vitro* ainda não ter sido completamente elucidada, a realização desses testes proporciona importantes conhecimentos epidemiológicos, os quais contribuem para a instituição de um protocolo terapêutico efetivo. O conhecimento das espécies mais prevalentes em uma determinada região e a caracterização desses microorganismos, incluindo o perfil de sensibilidade a drogas, auxilia na seleção empírica de agentes antifúngicos adequados. Ademais, algumas espécies de *Candida* spp., como *C. krusei* e *C. glabrata*, são, sabidamente, mais resistentes a determinadas drogas, como fluconazol e anfotericina B, e, se tais espécies forem prevalentes, o emprego dos antifúngicos aos quais são resistentes não deve ser priorizado (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004).

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). A prevalência de *C. albicans* resistente a esse grupo de drogas é menos comum em pacientes com candidíase vaginal e candidemia. 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% em *C. parapsilosis* e de 1,4-6,6% em *C. tropicalis*. No entanto, *C. glabrata*, a segunda espécie mais prevalente em infecções fúngicas sistêmicas nos Estados Unidos, apresenta crescente resistência ao fluconazol, cuja taxa de resistência aumentou de 7 para 12%, entre os anos de 2001 e de 2004 (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Apesar de a resistência de *Candida* spp., principalmente *C. albicans*, à anfotericina B ser rara, relatos recentes sugerem que *C. krusei* e *C. glabrata* sejam menos sensíveis à droga, quando comparadas a outras espécies de levedura, por apresentarem valores elevados de CIM. Ademais, é frequentemente observada a resistência intrínseca a poliênicos em cepas de *C. lusitanae* (PFALLER; DIEKEMA, 2007; JOHNSON, 2008; KANAFANI; PERFECT, 2008) e há relatos pontuais de resistência em *C. guilliermondii* e em *C. rugosa* (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

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, não havendo relatos na literatura com isolados de origem aviária. Brito et al. 2009, isolaram *Candida* spp. da região perineal, da vagina, do prepúcio e da cavidade oral de cães hígidos e observaram, pela técnica de microdiluição em caldo, que todos os isolados eram sensíveis a anfotericina B e que os dois isolados de *C. albicans* e três dos quatro isolados de *C. tropicalis* eram resistentes a fluconazol, cetoconazol e itraconazol.

2.6 Secreção de fosfolipases como fator de virulência de *Candida* spp.

A capacidade das leveduras passarem de microorganismos comensais a agentes patogênicos, sob condições hospedeiras favoráveis, depende de vários fatores de virulência (COSTA et al., 2009), os quais contribuem para a patogenicidade dos microorganismos (ZENG et al., 2008). Dentre estes fatores, podem-se destacar a produção de enzimas hidrolíticas, como fosfolipases e aspartil proteinase, a habilidade de aderir a células epiteliais e endoteliais e a ocorrência de alterações fenotípicas e de modulação antigênica, em decorrência da formação de pseudohifas (IBRAHIM et al., 1995; GHANNOUM, 2000; OMBRELLA; RACCA; RAMOS, 2008; ZENG et al., 2008; VIEIRA; ACQUA-COUTINHO, 2009).

As fosfolipases fazem parte de um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam uma ou mais ligações éster nos glicerofosfolipídios. Apesar de todas terem os fosfolipídios como substrato, cada uma tem a atividade de clivar uma ligação éster específica. Assim, letras são utilizadas para diferenciar as fosfolipases, indicando a ligação alvo específica na molécula de fosfolipídio (GHANNOUM, 2000).

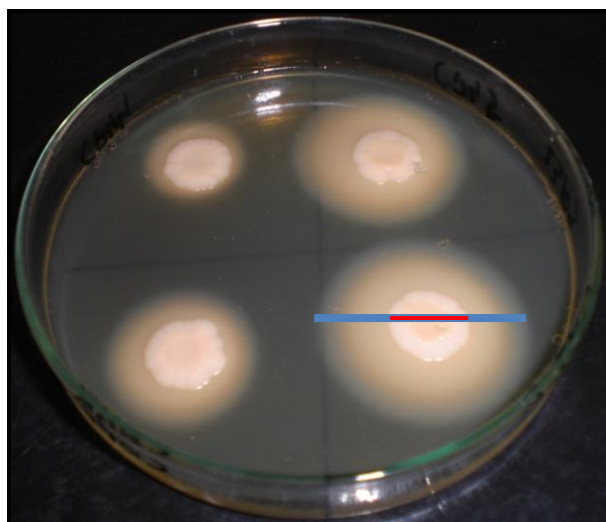
A secreção de fosfolipases por *C. albicans* foi inicialmente relatada por Costa et al., e Werner, ao final da década de 1960, ao observarem o crescimento desse microorganismo em meio sólido contendo gema de ovo ou lecitina. Posteriormente, Pugh e Cawson, em 1975, por meio de um método citoquímico, baseado em lecitinas, constataram que a maior atividade de fosfolipase se concentra na extremidade da hifa em crescimento, o que garante a essa estrutura a capacidade de invadir células e tecidos (GHANNOUM, 2000).

Em 1982, Price et al. descreveram um método em placa para detectar a atividade de fosfolipase em *C. albicans*. Tal método consiste na semeadura das cepas em meio ágar Sabouraud dextrose, acrescido de gema de ovo, a qual é rica em fosfolipídios. Quando os isolados são positivos, observa-se a formação de uma zona de precipitação densa, ao redor da colônia, provavelmente, devido à formação de complexos de cálcio com os ácidos graxos, liberados em decorrência da ação enzimática sobre os fosfolipídios do meio (GHANNOUM, 2000).

Dessa forma, a atividade de fosfolipase (Pz) é definida como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total, formado pela colônia e pela zona de precipitação (**FIG. 8**) (GHANNOUM, 2000). Quando Pz é igual a um ($Pz = 1$), não há produção de fosfolipase extracelular. Por outro lado, 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 (VIEIRA; ACQUA-COUTINHO, 2009).

Devido à facilidade de execução, a utilização do agar gema de ovo tornou-se o método tradicional de triagem de cepas de *Candida* spp. e de *C. neoformans*, quanto à atividade de fosfolipase (GHANNOUM, 2000), sendo o método utilizado por diversos pesquisadores (VIDOTTO et al., 1999; FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005; VIDOTTO et al., 2004; VIDOTTO et al., 2005; CAFARCHIA et al., 2008; OMBRELLA; RACCA; RAMOS, 2008; ZENG et al., 2008; COSTA et al., 2009, VIEIRA; ACQUA-COUTINHO, 2009).

No entanto, uma vez que a gema de ovo contém substrato tanto para fosfolipases, quanto para lipases, essa técnica não é específica, devendo ser utilizada somente para triagem inicial (GHANNOUM, 2000; COSTA et al., 2009). Ademais, tal metodologia não é adequada para triar cepas que apresentam baixa produção dessa enzima, sendo necessária a confirmação por meio de outros métodos, como ensaios colorimétricos e radiométricos específicos (GHANNOUM, 2000).



Fonte: CEMM, 2009 - Foto realizada pela autora

Figura 7: Avaliação da produção de fosfolipase por cepas de *C. albicans*, em meio ágar gema de ovo. Observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca, indicativa da produção da enzima. A linha vermelha representa o diâmetro da colônia e a azul o diâmetro total.

Os principais constituintes químicos das membranas celulares são fosfolipídios e proteínas, portanto, enzimas capazes de hidrolisar essas moléculas, como as fosfolipases e as proteinases, estão provavelmente envolvidas nos processos de ruptura de membrana, durante a invasão da célula hospedeira (GHANNOUM, 2000). As fosfolipases promovem a virulência por ocasionarem lise das células hospedeiras ou alterações nas características de superfície das mesmas, facilitando os processos de aderência e de penetração (IBRAHIM et al., 1995; SAMARANAYAKE et al., 2005). Adicionalmente, as fosfolipases A₂ e C podem remover antígenos processados da superfície das células apresentadoras de antígenos (IBRAHIM et al., 1995).

As fosfolipases extracelulares já foram implicadas como fatores de virulência de vários organismos, como *Clostridium perfringens*, *Rickettsia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, dentre outros. O tipo de fosfolipase implicada na virulência varia de acordo com o organismo. *C. perfringens*, por exemplo, secreta fosfolipase C, enquanto que *T. gondii* secreta fosfolipase A₂ (IBRAHIM et al., 1995; GHANNOUM, 2000).

Já foi demonstrado que *C. albicans* produz fosfolipase B, a qual é codificada pelos genes *PLB1* e *PLB2*. No entanto, o primeiro aparenta ser o mais importante fator contribuinte para a atividade de tal enzima. A deleção do gene *PLB1* da cepa CAI-4 de *C. albicans* demonstrou atenuação completa ou parcial da virulência em camundongos e uma redução significativa na atividade de fosfolipase, quando comparada a cepa parental selvagem. Adicionalmente, a reintrodução do gene *PLB1* em cepas mutantes, nas quais esse gene havia sido deletado, restabeleceu os níveis de virulência, semelhantes àqueles observados para a

cepa parental, em modelos de candidíase oral-intragástrica e disseminada, em camundongos jovens (SAMARANAYAKE et al., 2005).

Barrett-Bee et al., em 1985, foram os primeiros a avaliar o papel da fosfolipase extracelular na virulência de *C. albicans*, em modelos murinos de candidíase. Os pesquisadores observaram uma correlação entre atividade de fosfolipase e dois parâmetros potenciais de patogenicidade. Assim, as cepas que se aderiam mais fortemente às células epiteliais bucais e eram as mais patogênicas para camundongos apresentavam uma maior produção de fosfolipase.

Ibrahim et al., 1995, observaram que as cepas de *C. albicans* isoladas do sangue apresentavam maior atividade de fosfolipase extracelular e maior taxa de germinação, quando comparadas às cepas comensais. Ademais, observaram que somente as cepas com elevada atividade de fosfolipase extracelular eram invasivas em modelos de candidíase em camundongos jovens e que a produção de fosfolipase, dentre os fatores de virulência avaliados, foi o único com valor preditivo de mortalidade.

Atualmente, sabe-se que a elevada atividade de fosfolipase está correlacionada a outros atributos de virulência, como ao aumento na capacidade de aderência às células epiteliais e da taxa de 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).

Tem-se observado que a produção de fosfolipase por *C. albicans* isoladas de seres humanos varia de acordo com o sítio de isolamento e com o estado de saúde do hospedeiro (SAMARANAYAKE et al., 2005). Durante muito tempo, acreditou-se que somente essa espécie era capaz de produzir fosfolipase. No entanto, em 1998, Clancy et al. demonstraram a produção da enzima por outras espécies de *Candida* spp., apesar de secretarem quantidades significativamente menores, quando comparadas a *C. albicans* (GHANNOUM, 2000).

Ibrahim et al., 1995, observaram que cepas isoladas da cavidade oral de voluntários sadios ($P_z = 0,93$), quando comparadas àquelas obtidas de pacientes com candidemia ($P_z = 0,77$), apresentavam uma menor produção de fosfolipase.

Vidotto et al., 1999, ao comparar cepas isoladas da cavidade oral ($P_z = 0,64 \pm 0,14$), dos tratos digestório ($P_z = 0,78 \pm 0,19$), respiratório ($P_z = 0,78 \pm 0,14$) e urinário ($P_z = 0,85 \pm 0,16$), da vagina ($P_z = 0,73 \pm 0,13$), das unhas e da pele ($P_z = 0,76 \pm 0,19$) de pacientes HIV positivos, observaram que aquelas oriundas da cavidade oral e do trato urinário apresentavam a maior e a menor produção de fosfolipase, respectivamente.

Basu et al., 2003, compararam a produção de fosfolipase de isolados de *C. albicans*, oriundos do trato respiratório ($P_z = 0,88$ a $0,95$), do sangue ($P_z = 0,64$), da vagina ($P_z = 0,82$ a

0,86), da pele ($P_z = 0,92$) e da urina ($P_z = 0,84$ a $0,89$) de pacientes hospitalizados e da cavidade oral de indivíduos hígidos ($P_z = 0,92$ a $0,95$). Observaram que 48,7% dos isolados clínicos produziam fosfolipase, enquanto que, somente, 3,33% dos isolados de indivíduos sadios produziam a enzima e que o isolado sanguíneo apresentava a maior produção de fosfolipase, seguido pelos isolados vaginais e urinários.

Vidotto et al., 2004, observaram a produção de fosfolipase por todos os isolados de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* testados, oriundos da cavidade oral de pacientes HIV positivos, não observando diferenças significativas entre eles. Por outro lado, Fotedar e Al-Hedaithy, 2005, observaram que todos os isolados de *C. albicans*, oriundos do sangue, da vagina, da urina, do trato respiratório, da cavidade oral e da pele de pacientes HIV negativos produziam fosfolipase, enquanto que nenhum isolado de *C. dubliniensis* produzia a enzima. Também foi observado que o sangue e o trato respiratório foram os sítios com a maior proporção de isolados com elevada atividade enzimática ($P_z = 0,37$ a $0,5$).

Oksuz et al., 2007, isolaram *Candida* spp. da cavidade oral, dos tratos respiratório e urogenital, da pele e das fezes de adultos hígidos e observaram que 53,08% dos isolados de *C. albicans* produziam fosfolipase extracelular, dos quais 30/43 apresentavam baixa atividade enzimática ($P_z > 0,7$). Por outro lado, sete (17,07%) cepas de *Candida* spp. apresentavam produção de fosfolipase, sendo uma *C. tropicalis*, uma *C. kefyr*, duas *C. famata*, uma *C. parapsilosis* e duas *C. spharicae*.

Zeng et al., 2008, observaram que todos os isolados de *C. albicans* oriundos da cavidade oral de indivíduos hígidos ($P_z = 0,52$) e de pacientes com líquen plano oral ($P_z = 0,42$), produziam fosfolipase e que os isolados provenientes dos indivíduos sadios apresentavam uma menor atividade enzimática.

Costa et al., 2009, isolaram *C. albicans* e *C. tropicalis* de pacientes com sinais clínicos de candidose oral e de indivíduos hígidos e observaram que todos os isolados de *C. albicans* produziam fosfolipase, enquanto que nenhum isolado de *C. tropicalis* produzia essa enzima. O grupo de pacientes com candidose apresentava uma maior proporção de cepas com alta atividade enzimática, quando comparado ao grupo de indivíduos sadios, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa.

Poucos trabalhos relatam a produção de fosfolipase por leveduras de origem aviária. Cafarchia et al., 2008, avaliaram a capacidade de produção de fosfolipase de 13 espécies de leveduras previamente isoladas da cloaca de rapinantes, de aves migratórias e de passeriformes e de fezes de rapinantes colhidas dos recintos. Das leveduras isoladas da cloaca e das fezes, 48,1% e 73,3% apresentavam produção de fosfolipase, respectivamente. Dentre as espécies de *Candida* spp., *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*,

C. pelliculosa e *C. tropicalis* apresentavam atividade da enzima. No geral, os isolados obtidos da cloaca apresentaram produção de fosfolipase estatisticamente inferior àquela das leveduras obtidas por meio da cultura de fezes.

Vieira e Acqua-Coutinho, 2009, avaliaram a atividade de fosfolipase de 25 isolados de *Candida* spp., oriundos do ingluvírio de filhotes de papagaios (*A. aestiva* e *A. amazonica*) com e sem sinais clínicos de ingluvite. Dentre os isolados, 17 (68%) produziam a enzima, sendo uma *C. albicans* (Pz = 0,54), três *C. famata* (Pz = 0,60 a 0,79), cinco *C. guilliermondii* (Pz = 0,50 a 0,79), quatro *C. humicola* (Pz = 0,42 a 0,71) e quatro *C. parapsilosis* (Pz = 0,5 a 0,86).

É interessante observar que não só a proporção dos isolados de origem humana capaz de secretar fosfolipase foi semelhante àquela dos isolados de origem aviária, como também os valores de atividade enzimática relatados foram semelhantes para os isolados de ambas as procedências.

2.7 Potencial zoonótico

Nos últimos 20 anos, a incidência de infecções humanas causadas por leveduras, principalmente *C. neoformans* e *Candida* spp., têm aumentado, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com câncer (CAFARCHIA et al., 2006b; CAFARCHIA et al., 2008), bem como em humanos expostos a excrementos de aves (CAFARCHIA et al., 2008).

Os fungos surgiram como agentes etiológicos importantes, nas doenças humanas, por poderem ocasionar infecções profundas e invasivas, cujos índices de morbidade e de mortalidade são elevados. Conseqüentemente, as micoses profundas representam um importante problema para a saúde pública. Nos Estados Unidos, de 1980 a 1997, houve um aumento brusco, de 1.557 para 6.534, no número de mortes, por causas múltiplas, devido ao aumento na incidência das micoses invasivas. A maioria dessas mortes relacionadas à infecção fúngica foi associada a *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Muitos fatores têm contribuído para o aumento da incidência das micoses. O fator mais importante é o crescimento contínuo da população que apresenta imunocomprometimento, devido à perda de integridade das barreiras cutâneas e mucosas; às alterações no número e na função dos neutrófilos e na imunidade mediada por célula, às disfunções metabólicas e aos extremos de idade. Outros fatores que têm contribuído, ainda mais, para a elevação dos riscos de infecção por fungos oportunistas foram: o aumento na realização de transplantes e no uso de antibióticos de largo espectro e de drogas de terapia citotóxicas. Adicionalmente, com o aumento da movimentação das pessoas idosas, que estão

cada vez mais independentes, a exposição ambiental a uma variedade de fungos patógenos endêmicos torna-se mais comum, o que pode contribuir para o aumento no risco de contração de doenças micóticas (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

As aves, de vida livre ou de cativeiro, apresentam um importante papel, como reservatórios e como carreadoras de várias espécies de microorganismos, incluindo leveduras, contribuindo para a contaminação ambiental e, possivelmente, para a infecção humana (MANCIANTI et al., 2002; CAFARCHIA et al., 2006a; CAFARCHIA et al., 2006b; KOCIJAN et al., 2009). Sabe-se que as aves albergam leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*, no trato gastrointestinal, podendo eliminá-las no ambiente, sendo responsáveis pela disseminação das mesmas. Uma vez que essas leveduras estão aptas a produzir fosfolipase, elas podem ser consideradas potencialmente patogênicas para o homem e para outros animais (CAFARCHIA et al., 2008).

Nas aves, o estresse e a imunossupressão também estão, na maioria dos casos, relacionados à ocorrência de doenças fúngicas (GARCIA et al., 2007; VELASCO, 2000). Na presença da doença clínica, os microorganismos são eliminados em grande quantidade, o que pode aumentar os riscos de contaminação ambiental. Dessa forma, a ocorrência de imunossupressão clínica pode representar um risco, não só para o paciente, como também para os contactantes humanos, uma vez que pode haver o desenvolvimento de doenças com potencial zoonótico relevante e a maior taxa de eliminação de microorganismos potencialmente patogênicos, no ambiente.

Considerando os relatos de criptococose e de candidíase humanas, descritos em pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos expostos a excreta de aves, é necessário o estabelecimento de recomendações específicas para redução do risco de infecção por esses microorganismos. De fato, indivíduos imunossuprimidos devem ser alertados quanto aos riscos potenciais de conviver em ambientes habitados por pombos e outras aves (CAFARCHIA et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA

A popularidade da calopsita como animal de estimação tem aumentado bastante, no Brasil, e por serem aves bastante interativas, são mantidas em íntimo contato com seres humanos. Clinicamente, sabe-se que essa espécie é bastante suscetível a infecções fúngicas, principalmente, por *Candida* spp. No entanto, não foram encontrados trabalhos, na literatura, envolvendo a caracterização da microbiota por leveduras, em calopsitas. Considerando que as aves podem albergar leveduras potencialmente patogênicas para os humanos, a caracterização da microbiota por leveduras, nessa espécie aviária, pode contribuir, não só para a obtenção de dados biológicos sobre a espécie, como também para a saúde pública, uma vez que será possível estabelecer a importância das calopsitas como carreadoras de leveduras patogênicas e como fonte de infecção por fungos, em seres humanos.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. A calopsita (*Nymphicus hollandicus*) apresenta como parte da microbiota do trato gastrointestinal diversas espécies de leveduras potencialmente patogênicas para os seres humanos.
2. Ocorre o fenômeno de resistência a antifúngicos em leveduras isoladas do trato gastrointestinal de calopsitas.
3. As leveduras isoladas do trato gastrointestinal de calopsitas são capazes de produzir e secretar fosfolipase.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Isolar leveduras do trato gastrintestinal de calopsitas visando à caracterização da microbiota e à compreensão parcial do potencial patogênico dos isolados de *Candida* spp.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar e quantificar as leveduras presentes na cavidade oral, no ingluvío, na cloaca e nas fezes de calopsitas;
- 2) Estabelecer uma relação entre o estado clínico das calopsitas e contagem de unidades formadoras de colônia para as leveduras isoladas;
- 3) Destacar as leveduras com potencial zoonótico e estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* para *Candida* spp.;
- 4) Avaliar a produção da enzima fosfolipase pelas leveduras do gênero *Candida*.

6 CAPÍTULO 1

Caracterização da microbiota por leveduras do trato gastrintestinal de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): um risco potencial para a saúde humana

Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health

Periódico: Journal of Medical Microbiology (submetido em novembro de 2009)

Resumo

Sabe-se que as aves albergam, no trato gastrointestinal, leveduras potencialmente patogênicas para seres humanos, atuando como carreadoras e disseminadoras desses microorganismos. As calopsitas são o segundo mais popular psitacídeo do mundo, como ave de estimação, mas não foram encontrados dados que caracterizem a sua microbiota gastrointestinal. Assim, o presente trabalho objetiva caracterizar a microbiota gastrointestinal por leveduras de calopsitas e avaliar a relevância dessas aves como carreadoras de leveduras potencialmente patogênicas. Sessenta calopsitas, oriundas de 15 locais diferentes foram avaliadas. Foi realizada uma avaliação clínica detalhada de cada ave e foram colhidas amostras da cavidade oral, do papo e da cloaca. As fezes foram coletadas das gaiolas onde as aves eram mantidas. Os microorganismos isolados foram identificados com base nas características morfológicas e bioquímicas. Leveduras foram isoladas de pelo menos um sítio anatômico de 65% das aves e 64,28% das amostras de fezes. A cavidade oral e o papo foram os sítios anatômicos com maior prevalência e maior número de isolados. Obtiveram-se 120 isolados, pertencentes a 13 espécies. As espécies mais isoladas foram *Candida albicans*, com 39 (32,5%) isolados, seguida de *C. tropicalis* (20%), *Trichosporon asteroides* (12,5%), *C. famata* (10%), dentre outras. Colônias mistas foram isoladas de 23,33% das aves e *C. albicans* foi raramente encontrada em associação com outras espécies ($P < 0,05$). Os resultados do trabalho demonstram que as calopsitas albergam leveduras patogênicas ao longo do trato gastrointestinal e nas fezes e estão propensas a disseminá-las no ambiente.

Palavras-chave: *Nymphicus hollandicus*. Microbiota gastrointestinal por leveduras. *Candida* spp. Potencial zoonótico.

**Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels
(*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health**

R. S. N. Brilhante^{2*}, D. S. C. M. Castelo-Branco¹, G. D. P. Soares¹, A. J.
Monteiro³, R. A. Cordeiro², J. J. C. Sidrim², M. F. G. Rocha^{1, 2}

¹School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Science,
State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700. CEP: 60.740-903, Fortaleza-CE,
Brazil.

²Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Rua Coronel
Nunes de Melo, s/n, Rodolfo Teófilo. CEP: 60430270, Fortaleza-CE, Brazil.

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

Running title: Cockatiel's gastrointestinal microbiota

Subject category: Veterinary Microbiology

Summary

Cockatiels are the world's second most popular psittacine pet bird and no data characterizing their gastrointestinal microbiota have been found. Thus, this work aims at the characterization of yeast gastrointestinal microbiota of cockatiels and at the evaluation of their relevance as carriers of potentially pathogenic yeasts. Sixty cockatiels, from 15 different premises, were assessed. A thorough clinical examination was performed with each bird and samples were collected from oral cavity, crop and cloaca. The stools were collected from cages where birds were kept. The isolated cultures were identified according to morphological and biochemical characteristics. Yeasts were isolated from at least one anatomical site of 65% of the birds and 64.28% of the stool samples. Oral cavity (53.33%) and crop (58.33%) were the anatomical sites with the highest prevalence and the highest number of yeast isolates. Overall, 120 yeast isolates, belonging to 13 species, were obtained. The most frequently isolated species were *Candida albicans*, with 39 (32.5%) isolates, followed by *C. tropicalis* (20%), *Trichosporon asteroides* (12.5%), *C. famata* (10%) and others. Mixed yeast colonies were isolated from 23.33% of the birds and *C. albicans* was seldom found in association with other species ($P < 0.05$). The results of this work demonstrate that cockatiels harbor potentially pathogenic yeasts throughout their gastrointestinal tract and in stools and are prone to disseminating them in the environment.

Keywords: *Nymphicus hollandicus*/ yeast gastrointestinal microbiota/ *Candida* spp./ zoonotic potential.

1. Introduction

The cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) is a bird originated from Australia that belongs to the family *Psittacidae* and it represents the world's smallest species of cockatoo (Integrated Taxonomic Information System). Currently, it is the world's second most popular psittacine pet bird¹.

It is known that yeasts are normal components of the gastrointestinal microbiota of birds, especially *Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp. and *Cryptococcus* spp. (Cragg & Clayton, 1971; Mancianti *et al.*, 2001; Melville *et al.*, 2004; Cafarchia *et al.*, 2006b). The microbiota may vary according to the bird species (Cafarchia *et al.*, 2006a) and no data on the characterization of cockatiel's gastrointestinal microbiota has been found.

It is also known the role of captive and free-ranging birds as carriers and spreaders of potentially pathogenic yeasts for human beings, which contributes to environmental contamination and, possibly, to human and animal infection (Mancianti *et al.*, 2001; Cafarchia *et al.*, 2006a; Cafarchia *et al.*, 2006b).

This is a very important aspect, considering cockatiel's increasing popularity as a pet bird and the close relationship between human beings and their pets, which may expose people to potential pathogens that may belong to cockatiel's normal microbiota. Children, elderly and immunocompromised individuals are at a greater risk of developing diseases, after exposure to pathogenic yeasts (Cafarchia *et al.*, 2006a).

¹Birds in Backyards, COCKATIEL (*Nymphicus hollandicus*), in: Bird Finder [on line] (2006). <http://birdsinyards.net/finder/display.cfm?id=49> [consulted 24 october 2009].

Among the 25 species of emerging pathogen yeasts, 20 were *Candida* spp. (Hazen, 1995). In human beings, the most frequently isolated *Candida* species from clinical manifestations are *C. albicans*, predominant worldwide, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, in Latin America, and *C. glabrata*, in the United States (Palacio *et al.*, 2009). The first three species are the same commonly found in bird infections (Velasco, 2000; Samour & Naldo, 2002).

Thus, due to the lack of knowledge on the role of cockatiels as carriers of pathogenic yeasts, the present study aims at the isolation of yeasts from the gastrointestinal tract, in order to characterize the microbiota of cockatiels and evaluate their relevance as carriers of such microorganisms.

2. Methods

2.1. Animals

Sixty apparently healthy cockatiels (*N. hollandicus*), from 15 different places (five households, four breeders and six pet stores) in the city of Fortaleza, Ceará, Brazil, were assessed for the development of this research. Thirty eight were adults and 22 were young (2 – 8 months of age). The gender was not reliably identified for any of the individuals. This research was submitted and approved (protocol number 02/09) by the Ethics Committee of Animal Research of the Federal University of Ceará.

2.2. Sample collection

Samples were collected from three anatomical sites (oral cavity, crop and cloaca) and from droppings. Sterile cotton swabs were used to obtain samples from oral cavity and cloaca. The swabs were inserted into the anatomical site and were rotated. Then, they were placed into sterile glass slants, containing 1 mL of sterile saline (NaCl 0.9%), keeping the cotton extremity in contact with the solution, until processing, within 12 hours.

In order to obtain crop content samples, a crop lavage was performed by injecting 3 mL of sterile saline (NaCl 0.9%) into this anatomical site, through a siliconized P.V.C. size 12 urethral catheter, attached to a 5 mL syringe. First, the catheter was introduced into the crop, through which the saline solution was injected. Then, it was gently massaged and the solution was aspirated back into the syringe (Richardson, 2006). Afterwards, the catheter was removed, its final extremity was sealed and the content obtained through the lavage was used for mycological processing.

Stool samples were collected from the environment where the birds were maintained. When birds were kept in collective cages, a pool of at least one gram of feces was collected. The samples were collected with a plastic spatula, previously disinfected by alcohol 70%, and were kept in sterile Petri dishes, until processing, within 12 hours (Filiú *et al.*, 2002).

2.3. Clinical Status

Prior to specimen collection, cockatiels were physically restrained, as described for small sized psittacines (Harrison & Ritchie, 1993), and were individually evaluated, as follows. The body score was given based on the muscular mass over the sternum. The eyes were observed and any sign of swelling and redness were considered an alteration. When examining the oral cavity, mucosal and choanal lesions, mucosal erythema and the presence of mucus or discharge were considered abnormal. For the nares, plugs or discharge were sought and for the lungs and air sacs the animals were thoroughly auscultated and the presence of abnormal respiratory sounds was taken into account.

Individual records were written, containing all the obtained data and each animal was scored based on the features mentioned above, losing one point for each altered one of them. The maximum score was 5, when no clinical alterations were observed, and the minimum was 0, when at least one alteration was observed for each evaluated feature (e.g. score 0: one clinical alteration for each of the five evaluated features; score 1: four altered features; score 2: three altered features; score 3: two altered features; score 4: one altered feature; score 5: no clinical alterations).

2.4. Microbiological Processing

2.4.1. Isolation

All samples were taken to Specialized Medical Mycology Center (CEMM) from Federal University of Ceará, in Fortaleza, Ceará, Brazil, where they were processed and the microorganisms were properly identified.

For each collection site, two culture media were used for primary isolation: YEPD agar (yeast extract peptone dextrose) with chloramphenicol (0.5 g/L) and birdseed (*Guizotia abyssinica*) agar. Samples obtained from oral cavity and cloaca were cultured onto both media, with the cotton swab used for collection. From the suspension obtained from the crop lavage, 100 µL were cultured onto both media.

The feces collected were ground in sterile Petri dishes and, approximately, one gram was added to a saline solution (NaCl 0.9%), containing chloramphenicol (0.4 g/L). The suspension was homogenized in a vortex, for three minutes, and it was left to decant for 30 minutes, at 25 °C. Afterwards, aliquots of 100 µL from the supernatant of each sample were cultured onto both media (Filiú *et al.*, 2002).

Petri dishes containing the cultured media were incubated at 25 °C, for 10 days, and were observed daily. The colony-forming units (CFU) were counted, for each Petri dish, after 48 hours of growth.

2.4.2. Identification

Initially, for each positive sample, colonies were observed microscopically after Gram staining. Then, colonies were subcultured into slants containing YEPD agar and tests were performed for identification at species level. Identification was

based on microscopic morphology and biochemical parameters (urea hydrolysis and sugar assimilation), as described by Brito *et al.* (2009).

For *Candida* spp., the colonies were initially grown on chromogenic media (HiCrome Candida Differential Agar, HiMedia, Mumbai, India) for identification of mixed colonies. Afterwards, individual colonies were subcultured into slants containing YEPD agar and Christensen's urea agar and, after 24 to 48h, the microorganisms were grown onto cornmeal Tween-80 agar in order to perform a morphologic analysis. A sugar assimilation test was also performed for each isolate and the results were interpreted according to De Hoog *et al.* (2000).

Trichosporon species were, initially, identified macroscopically. Then, a little piece of the colony was observed microscopically on glass slides, after being stained with cotton blue lactophenol. Afterwards, the microorganisms were subcultured into slants containing YEPD agar and Christensen's urea agar and, 24 to 48h later, slide cultures on 2% malt extract agar were made for morphologic evaluation. Finally, a sugar assimilation test was performed for each isolate. The obtained results were interpreted according to Guého *et al.* (1993).

For *Rhodotorula* spp., colonies were initially identified based on their color. Then, the microorganism was subcultured into slants containing YEPD agar and Christensen's urea agar and, after 24 to 48h, it was grown onto 2% malt extract agar for morphologic evaluation. Sugar assimilation tests were performed for each isolate and they were crucial for species identification. The results were interpreted according to De Hoog *et al.* (2000).

Cryptococcus spp. isolates were initially grown onto cornmeal Tween-80 agar and onto Christensen's urea agar for microscopic and biochemical evaluation, which suggested the genus. Afterwards, an automated analysis was performed using VITEK 2 (bioMérieux®, USA) in order to determine the species.

2.5 Statistical Analysis

Data were analyzed by descriptive variable analysis. Variance analysis and Pearson Chi-square tests were used to analyze clinical scores and frequency distribution among the studied categories, respectively. The smallest significance level was $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

Clinical Scores

Out of the examined cockatiels, two (3.33%) presented a clinical score of 0, four (6.67%) presented score 1; 11 (18.33%) score 2, 16 (26.67%) score 3, 17 (28.33%) score 4 and ten (16.67%) score 5. A high percentage of birds presenting high CFU count (> 50 CFU) was observed in clinical score groups 0 ($n=2$) and 1 ($n=2$) (Table I). No statistical differences were observed between clinical scores and age, CFU counts, diet of the birds or isolated yeast species.

The majority of the analyzed birds presented a satisfactory clinical status. However, the six birds that presented low clinical scores (≤ 1) presented high prevalence with high CFU counts. Such finding is probably related to the occurrence of immune impairment due to the overall condition of the bird, which

is considered a risk factor for the development of candidiasis (Vieira & Acqua-Coutinho, 2009).

Prevalence

Thirty nine (65%) out of 60 cockatiels were positive for yeast growth, considering all three evaluated anatomical sites, which was higher than the prevalence (25%) obtained from the gastrointestinal tract of necropsied raptors (Cafarchia *et al.*, 2006b) Thirteen (59.1%) out of 22 young birds and 26 (68.42%) out of 38 adult birds were positive for yeast growth, presenting no statistical differences.

When comparing specific sites individually, in this research, the prevalence of yeast for oral cavity was 53.33% (32/60), higher than the ones observed for four wild columbid species (14 - 24%) (Kocan & Hasenclever, 1972), similar to that for ostriches (50%) (Melville *et al.*, 2004) and white crowned pigeons (56%) and lower than the ones found for two columbid species, including feral pigeons (95 and 100%) (Kocan & Hasenclever, 1972).

The prevalence found for crop was 58.33% (35/60), similar to the result obtained in a study with baby Amazon parrots (*Amazona aestiva* and *A. amazonica*), during which *Candida* spp. was isolated from 57.5% of the analyzed birds (Vieira & Acqua-Coutinho, 2009). The tested parrots, however, were nestlings, apprehended from illegal trade, submitted to poor management conditions, and 45% of them presented clinical signs of ingluvitis, making them

more prone to the isolation of *Candida* spp. In spite of that, the apparently healthy cockatiels still presented a higher prevalence of yeasts isolated from crop.

Cloaca presented a prevalence of 23.33% (14/60), higher than the ones observed for ostriches (8%) (Melville *et al.*, 2004), migratory birds (15.7%) (Cafarchia *et al.*, 2006a) and raptors (9.9%) (Cafarchia *et al.*, 2006b). In addition, out of the analyzed stool samples, 64.28% (9/14) were positive for yeast growth, which was higher than the prevalence observed by others (Mancianti *et al.*, 2001; Cafarchia *et al.*, 2006b), who isolated yeast from 49.2% and 43.7% out of the analyzed psittacine and raptors stool samples, respectively.

Ten birds presented yeasts in only one anatomical site, six of them in oral cavity, three in crop and one in cloaca. Isolates were obtained simultaneously from oral cavity and crop of 16 cockatiels, from crop and cloaca of three birds and from all three anatomical sites of 10 individuals. Interestingly, a relationship of dependence was observed for the distribution of yeasts throughout the anatomical sites, which means that it was more likely to recover yeasts from more than one anatomical site than from only one (Table II).

Isolated Yeast Species

Overall, 120 isolates, belonging to four genera and 13 species, were obtained (Table II). Forty one (34.17%), 44 (36.67%), 19 (15.83%) and 16 (13.33%) isolates were obtained from oral cavity, crop, cloaca and stools, respectively (Figure 1).

Candida spp. was the most frequently isolated genus and *C. albicans* the most frequently isolated species from the gastrointestinal tract, with 39 isolates (32.5%), as described in some works (Kocan & Hasenclever, 1972; Moretti *et al.*, 2000; Mancianti *et al.*, 2001; Samour & Naldo, 2002; Garcia *et al.*, 2007).

C. tropicalis was the second most isolated species (20%), followed by *Trichosporon asteroides* (12.5%), *C. famata* (10%), *Rhodotorula mucilaginosa* (8.34%), *C. parapsilosis* (6.67%) and *C. glabrata* (4.17%). *C. albicans* was the most commonly isolated species from oral cavity, crop and cloaca, while *C. tropicalis* was the most commonly isolated one from stools (Table II).

Oral cavity (53.33%) and crop (58.33%) were the anatomical sites with the highest prevalence and the highest number of yeast isolates, 41 and 44, respectively, and crop was the site from where the highest number of species was isolated (n=9), followed by cloaca (n=8) and oral cavity (n=7) and stools (n=7).

Even though yeasts are considered commensal organisms and are part of the normal biota, they are capable of causing disease whenever an impairment of the immune system is established. In the past years, after the worldwide increase in the number of immunocompromised individuals, the incidence of opportunistic mycosis, caused primarily by yeasts, has increased (Pfaller & Diekema, 2007). *Candida* spp. and *Cr. neoformans* are the most common microorganisms involved in human yeast infections (Cafarchia *et al.*, 2006b; Cafarchia *et al.*, 2008). *Trichosporon* spp. and *Rhodotorula* spp. are not as commonly reported as infecting agents, but recently they have been more frequently implicated in

systemic infections, especially in neutropenic patients (Ribeiro *et al.*, 2008; Tuón & Costa, 2008).

The results of our research show that cockatiels may act as carriers of potentially zoonotic yeasts, as demonstrated by the isolation of *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp. and *Rhodotorula* spp.

Growth of Mixed Colonies

From 14 (23.33%) birds it was possible to isolate more than one yeast species from at least one collection site. Eight samples from oral cavity, ten from crop, four from cloaca and four from stools presented mixed yeast species. Out of these birds, seven presented mixed colonies in two or more different sites.

Interestingly, it was observed that out of 39 isolates of *C. albicans*, only five (12.82%; $P < 0.05$) were associated with other yeast species: three (7.69%) were associated with either *C. famata* or *C. glabrata* and two (5.13%) were found in coexistence with *Trichosporon* spp. On the other hand, out of 24 isolates of *C. tropicalis*, 17 (70.83%; $P < 0.05$) were associated with other species: eight (33.33%) were isolated from mixed *Candida* spp. colonies (*C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), four (16.67%) were found to be coexisting with *Candida* spp., *Trichosporon* spp. and/or *Rhodotorula* spp. and five (20.83%) were found associated with *Trichosporon* spp. and/or *Rhodotorula* spp. For *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. famata* four (50%), three (60%) and 11 (91.67%; $P < 0.05$) isolates were recovered associated with other species, respectively. Based on these

observations, it seems like *C. albicans* is more likely to grow as the only species within the same site.

The maximum of three different species was recovered from the same site, particularly from oral cavity and crop. Two oral cavities presented three species of *Candida* spp., simultaneously, such as *C. famata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* and *C. famata*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*.

The presence of two species of yeasts in six raptors (10%) was observed, out of which three presented *C. famata* and *R. mucilaginosa* in cloaca and the other three presented *C. famata* and *C. parapsilosis* in crop (Cafarchia *et al.*, 2006b). Mixed *Candida* spp. infections in the crop of two (5%) Amazon parrots were also observed, presenting *C. guilliermondii* in coexistence with *C. parapsilosis* or *C. humicola* (Vieira & Acqua-Coutinho, 2009).

From stool samples, 4/14 (28.57%) resulted in mixed yeast colonies, which was often observed in a study with psittacine droppings (Mancianti *et al.*, 2001), but the authors did not specify the species involved. In our study, from one of the stool samples, four different species were recovered (two *Candida* spp., one *Rhodotorula* spp. and one *Trichosporon* spp.).

In this research and in the others mentioned above, *C. albicans* was seldom seen in association with other yeast species. Considering that it is a normal inhabitant of the avian gastrointestinal tract, we hypothesize that this species might be capable of inhibiting mucosal colonization by other yeast species, especially *Candida* spp. Besides, *C. albicans* was isolated from 20 individuals, out of which seven presented high CFU counts, in any of the evaluated sites, and

from these birds, only this species was recovered, suggesting its capacity to overcome microbial competition.

Dietary Effect

C. albicans was the only species recovered from all three anatomical sites of six out of seven analyzed cockatiels that fed exclusively on extruded bird food ($P < 0.05$). It is important to consider that the extruded food offered to the cockatiels contains prebiotics, which might have influenced the isolation of this yeast species. Besides, it was also observed that 57.14% of these birds presented high CFU counts, a high percentage, when compared to the cockatiels fed on mixed diets (5.55%) and those fed on all-seed diets (17.14%). However, the number of birds exclusively on extruded diet was small, which makes it difficult to statistically analyze what was observed.

Final Considerations

Even though other yeast species were recovered from cockatiels, special attention must be given to *Candida* spp., once it represented 74.17% of the isolates (89/120) and it has been suggested that animals should be considered as potential sources of *Candida* spp. infections for humans, especially for immunocompromised individuals (Edelmann *et al.*, 2005). Additionally, phenomenon of azole resistance to itraconazole and fluconazole was respectively observed in 35.89% and 10.26% of *C. albicans* isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels, during a parallel study (data not shown).

The results of this work demonstrate that cockatiels harbor potentially pathogenic yeasts throughout their gastrointestinal tract and in stools and are prone to disseminating them in the environment. Therefore, it is the veterinary clinician's responsibility to warn owners that their pet might represent a hazard to human health, especially to immunocompromised individuals, children and elderly.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (National Scientific and Technological Research Council - process 473881/2008-0).

References

- Brito, E. H. S., Fontenelle, R. O. S., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J. C. & Rocha M. F. G. (2009).** The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *Vet J* **182**, 320-326.
- Cafarchia, C., Camarda, A., Romito, D., Campolo, M., Quaglia, N. C., Tullio, D. & Otranto, D. (2006a).** Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia* **161**, 229-234.
- Cafarchia, C., Romito, D., Iatta, R., Camarda, A., Montagna, M. T. & Otranto, D. (2006b).** Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Med Mycol* **44**, 485-492.

Cafarchia, C., Romito, C., Coccioli, C., Camarda, A. & Otranto, D. (2008).

Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human diseases. *Med Mycol* **46**, 1-6.

Cragg, J. & Clayton, Y. M. (1971). Bacterial and fungal flora of seagull droppings in Jersey. *J Clin Pathol* **24**, 317-319.

De Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J. & Figueiras, M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmislcultures, Baarn.

Edelmann, A., Krüger, M. & Schmid, J. (2005). Genetic Relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **43**, 6164-6166.

Filiú, W. F. O., Wanke, B., Agüenas, S. M., Vilela, V. O., Macedo, R. C. L. & Lazera, M. (2002). Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **35**, 591-595.

Garcia, M. E., Lanzarot, V. L., Rodas, V. L., Costas, E. & Blanco, J. L. (2007). Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. *Vet Med* **52**, 464-470.

Guého, E., Improvisi, L., De Hoog, G. S. & Dupont, B. (1993). *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses* **37**, 3-10.

Harrison, G. J. & Ritchie, B. W. (1994). Making distinctions in the physical examination. In *Avian medicine: principles and application*, pp. 144-175. Edited

by B. W. Ritchie, G. J. Harrison & L. R. Harrison. Delray Beach, FL: HBD International.

Hazen, K. Z. (1995). New and emerging yeasts pathogens. *Clin Microbiol Rev* **8**, 462-478.

Kocan, M. R. & Hasenclever, H. F. (1972). Normal yeast flora of the upper digestive tract of some wild columbids. *J Wildl Dis* **8**, 365-368.

Mancianti, F., Nardoni, S. & Ceccherelli, R. (2001). Occurrence of yeasts in psittacine droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia* **153**, 121-124.

Melville, P. A., Cogliati, B., Mangiaterra, M. B. B. C. D., Peres, M. R, Moura, S. C. A., Matsuda, L., Kim, A. & Benites, N. R. (2004). Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. *Cienc Rural* **34**, 1871-1876.

Moretti, A., Fioretti, D. P., Boncio, L., Pasquali, P. & Del Rossi, E. (2000). Isolation of *Candida rugosa* from turkeys. *J Vet Med* **47**, 433-439.

Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis, a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163.

Palacio, A., Villar, J. & Alhambra, A. (2009). Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol* **26**, 2-7.

Ribeiro, M. A., Alastruey-Izquierdo, A., Gomez-Lopez, A., Rodriguez-Tudela, J. L. & Cuenca-Estrella, M. (2008). Molecular identification and susceptibility

testing of *Trichosporon* isolates from Brazilian hospital. *Rev Iberoam Micol* **25**, 221-225.

Richardson, J. A. (2006). Implication of toxic substances in clinical disorders. In *Clinical Avian Medicine*, pp. 711-720. Edited by G. J. Harrison & T. L. Lightfoot. Palm Beach, FL: Spix Publishing.

Samour, J. H. & Naldo, J. L. (2002). Diagnosis and therapeutic management of candidiasis in falcons in Saudi Arabia. *J Avian Med Surg* **16**, 129-132.

Tuón, F. F. & Costa, S. F. (2008). *Rhodotorula* infection: a systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol* **25**, 135-140.

Velasco, M. C. (2000). Candidiasis and cryptococcosis in birds. *Semin Avian Exot Pet Med* **9**, 75-81.

Vieira, R. G. & Acqua-Coutinho, S. D. (2009). Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). *Pesqui Vet Bras* **29**, 452-456.

Figure 1: Distribution of yeasts isolated from oral cavity, crop, cloaca and stools from 60 cockatiels

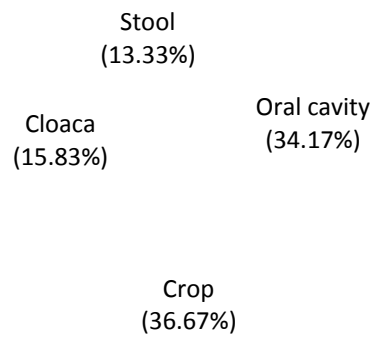


Table I: Clinical score of the analyzed cockatiels and the observed CFU counts.

Clinical Score	Low CFU Count		High CFU Count		Negative		Total
	n	%	n	%	n	%	
0	-	-	2	100	-	-	2
1	-	-	2	50	2	50	4
2	7	63.63	1	9.09	3	27.27	11
3	10	62.5	2	12.5	4	25	16
4	9	52.94	2	11.77	6	35.29	17
5	2	20	2	20	6	60	10
Total	28	46.67	11	18.33	21	35	60

Table II: Species of yeasts isolated from different collection sites from 60 cockatiels

Yeast Species	Collection Site									
	Oral Cavity		Crop		Cloaca		Stool		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	16	39.02	15	34.09	7	36.84	1	6.25	39	32.5
<i>C. famata</i>	7	17.07	3	6.82	-	-	2	12.5	12	10
<i>C. glabrata</i>	1	2.44	2	4.55	1	5.26	1	6.25	5	4.17
<i>C. krusei</i>	-	-	1	2.27	-	-	-	-	1	0.83
<i>C. parapsilosis</i>	3	7.32	4	9.09	-	-	1	6.25	8	6.67
<i>C. tropicalis</i>	9	21.95	8	18.18	-	-	7	43.75	24	20
<i>Cr. albidus</i>	-	-	2	4.55	-	-	-	-	2	1.67
<i>Cr. laurentii</i>	-	-	-	-	1	5.26	-	-	1	0.83
<i>T. asteroides</i>	3	7.32	5	11.36	5	26.32	2	12.5	15	12.5
<i>T. inkin</i>	-	-	-	-	1	5.26	-	-	1	0.83
<i>T. ovoides</i>	-	-	-	-	1	5.26	-	-	1	0.83
<i>R. minuta</i>	-	-	-	-	1	5.26	-	-	1	0.83
<i>R. mucilaginosa</i>	2	4.88	4	9.09	2	10.54	2	12.5	10	8.34
Total	41	100	44	100	19	100	16	100	120	100

7 CAPÍTULO 2

Espécies de *Candida* isoladas do trato gastrointestinal de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): Perfil de sensibilidade a antifúngicos e atividade de fosfolipase *in vitro*

Candida species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): *In vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase activity

Resumo

Nos últimos anos, a incidência de infecções causadas por leveduras, principalmente candidíase, tem aumentado, particularmente, entre indivíduos imunocomprometidos. Sabe-se que as aves, incluindo calopsitas, albergam no trato gastrointestinal leveduras potencialmente patogênicas para seres humanos. Assim, esse trabalho objetivou determinar a sensibilidade antifúngica e a atividade de fosfolipase *in vitro* de *Candida* spp., isoladas do trato gastrointestinal e das fezes de calopsitas. Sessenta calopsitas foram avaliadas e amostras foram colhidas da cavidade oral, do papo e da cloaca e as fezes foram coletadas das gaiolas. As espécies de leveduras foram identificadas com base nas características morfológicas e bioquímicas. Ademais, 39 *C. albicans*; 12 *C. tropicalis*; sete *C. parapsilosis* e uma *C. krusei* foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo, frente a anfotericina B, itraconazol e fluconazol, segundo metodologia padronizada pelo CLSI, e ao teste de produção de fosfolipase, em ágar gema de ovo. As CIMs para anfotericina B, itraconazol e fluconazol foram de 0,25 a 1 µg/mL, 0,03125 a ≥16 µg/mL e 0,5 a ≥64 µg/mL, respectivamente, e resistência ao itraconazol e ao fluconazol foi observada em 14 (35,89%) e quatro (10,26%) isolados de *C. albicans*, respectivamente. Todas as *C. albicans* foram positivas para a produção de fosfolipase, das quais 74,36% apresentaram elevada atividade enzimática. Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, 40% produziram fosfolipase e somente um isolado (5%) apresentou elevada atividade enzimática. Os resultados demonstram que as calopsitas podem representar um risco para a saúde humana, como fontes de infecção para cepas resistentes de *C. albicans*, especialmente para indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos.

Veterinary Microbiology - Original Research Paper

***Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels
(*Nymphicus hollandicus*): *In vitro* antifungal susceptibility profile and
phospholipase activity**

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante², Débora Castelo Branco de Souza Collares
Maia¹, Guilherme Duarte Peixoto Soares¹, José Júlio Costa Sidrim², Rossana
Aguiar Cordeiro², André Jalles Monteiro³, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1, 2}

¹School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Science,
State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700. CEP: 60.740-903, Fortaleza-CE,
Brazil.

²Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Rua Coronel
Nunes de Melo, s/n, Rodolfo Teófilo. CEP: 60430270, Fortaleza-CE, Brazil.

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

Abstract

Over the past years, the incidence of yeast infections, especially candidiasis, has increased. It is known that birds, including cockatiels, harbor potentially pathogenic yeasts to human beings in their gastrointestinal tract. Thus, this work aims at the determination of the *in vitro* antifungal susceptibility and phospholipase activity of *Candida* spp. isolated from the gastrointestinal tract and stools of cockatiels. Sixty cockatiels were assessed and samples were collected from oral cavity, crop and cloaca and stools were collected from cages where birds were kept. Yeast species were identified according to morphological and biochemical characteristics. Amphotericin B, itraconazole and fluconazole were tested against 39 *C. albicans*; 12 *C. tropicalis*; seven *C. parapsilosis* and one *C. krusei*, through broth microdilution test. These same isolates were also tested for phospholipase production, on egg yolk agar. For amphotericin B, itraconazole and fluconazole, MICs were 0.25 to 1 µg/mL, 0.03125 to ≥16 µg/mL and 0.5 to ≥64 µg/mL, respectively, and resistance to itraconazole and fluconazole was observed in 14 (35.89%) and four (10.26%) *C. albicans* isolates, respectively. All *C. albicans* were positive for phospholipase production, out of which 74.36% presented high enzymatic activity. Among non-*albicans Candida* species, 40% produced phospholipase. The results show that cockatiels might represent a hazard to human health, as sources of infections caused by resistant *Candida* spp., especially to immunocompromised individuals, children and elderly.

Keywords: *Nymphicus hollandicus*; *Candida* spp.; Antimicrobial susceptibility; Phospholipase activity; Zoonotic potential

1. Introduction

Yeasts are normal components of the gastrointestinal microbiota of birds, especially *Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp. and *Cryptococcus* spp. (Cragg & Clayton, 1971; Kocan & Hasenclever, 1972; Mancianti et al., 2001; Melville et al., 2004; Cafarchia et al., 2006a; Cafarchia et al., 2006b). However, they are also capable of causing disease, whenever an impairment of the immune system is established (Pfaller & Diekema, 2007).

In the past years, after the worldwide increase in the number of immunocompromised individuals, the incidence of opportunistic mycosis, caused primarily by yeasts, has increased (Pfaller & Diekema, 2007). *Candida* spp. and *Cr. neoformans* are the most common microorganisms involved in human yeast infections (Cafarchia et al., 2006b; Cafarchia et al., 2008).

It is widely known the role of captive and free-ranging birds as carriers and spreaders of potentially pathogenic yeasts for human beings, which contributes to the environmental contamination and, possibly, to human and animal infection (Mancianti et al., 2002; Cafarchia et al., 2006a; Cafarchia et al., 2006b).

This is a very important aspect, considering cockatiel's (*Nymphicus hollandicus*) increasing popularity as a pet bird and the close relationship between human beings and their pets, which may expose people to potential pathogens that may belong to cockatiel's normal microbiota. Children, elderly and immunocompromised individuals are at a greater risk of developing diseases, after exposure to pathogenic yeasts (Cafarchia et al., 2006a).

In human beings, the most frequently isolated *Candida* species from clinical manifestations are *C. albicans*, predominant worldwide, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, in Latin America, and *C. glabrata*, in the United States (Palacio et al., 2009). The first three species are the same commonly found in bird infections (Velasco, 2000; Samour & Naldo, 2002).

Surveillance programs of antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. isolates from human infections are frequently performed in many countries and they are very important, once they guide the establishment of adequate therapeutic protocols and help the validation process of licensed, newly introduced antifungal agents, through comparative analysis with well established drugs, such as fluconazole (Pfaller & Diekema, 2007). However, surveillance of yeasts isolated from animals is rare and a few data on antifungal susceptibility profile is available.

The ability of yeasts to change from commensal to pathogen depends on several virulence factors, including the production of hydrolytic enzymes, such as phospholipases (Costa et al., 2009). These heterogeneous enzymes are capable of breaking one or more ester linkages within glycerophospholipids (Ghannoum, 2000). High phospholipase production is correlated with increased adherence ability, higher mortality rate in animal models and host cell membrane damage (Samaranayake et al., 2005).

Considering that animals can represent a source of *Candida* spp. infections for humans (Edelmann et al., 2005), it would be of great medical importance to know the antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. isolated from cockatiels, as well as to evaluate their pathogenic potential. Therefore, this work aims at the

determination of the *in vitro* antifungal susceptibility profile and the phospholipase activity of *Candida* spp. isolated from the gastrointestinal tract and stools of cockatiels.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Sixty apparently healthy cockatiels (*N. hollandicus*), from 15 different places (five households, four breeders and six pet stores) in the city of Fortaleza, Ceará, Brazil, were clinically assessed for the development of this research. Thirty eight were adults and 22 were young (2 – 8 months of age). The gender was not reliably identified for any of the individuals. This research was submitted and approved (protocol number 02/09) by the Ethics Committee of Animal Research of the Federal University of Ceará.

2.2. Sample collection

Samples were collected from three anatomical sites (oral cavity, crop and cloaca) and from droppings. Sterile cotton swabs were used to obtain samples from oral cavity and cloaca. The swabs were inserted into the anatomical site and were rotated. Then, they were placed into sterile glass slants, containing 1 mL of sterile saline (NaCl 0.9%), keeping the cotton extremity in contact with the solution, until processing, within 12 hours.

In order to obtain crop content samples, a crop lavage was performed by injecting 3 mL of sterile saline (NaCl 0.9%) into this anatomical site, through a

siliconized P.V.C. size 12 urethral catheter, attached to a 5 mL syringe. First, the catheter was introduced into the crop, through which the saline solution was injected. Then, it was gently massaged and the solution was aspirated back into the syringe (Richardson, 2006). Afterwards, the catheter was removed, its final extremity was sealed and the content obtained through the lavage was used for mycological processing.

Stool samples were collected from the environment where the birds were maintained. When birds were kept in collective cages, a pool of at least one gram of feces was collected. The samples were collected with a plastic spatula, previously disinfected by alcohol 70%, and were kept in sterile Petri dishes, until processing, within 12 hours (Filiú et al., 2002).

2.3. Microbiological Processing

2.3.1. Isolation

All samples were taken to Specialized Medical Mycology Center (CEMM) from Federal University of Ceará, in Fortaleza, Ceará, Brazil, where they were processed and the microorganisms were properly identified.

For each collection site, two culture media were used for primary isolation: YEPD agar (yeast extract peptone dextrose) with chloramphenicol (0.5 g/L) and birdseed (*Guizotia abyssinica*) agar. Samples obtained from oral cavity and cloaca were cultured onto both media, with the cotton swab used for collection. From the suspension obtained from the crop lavage, 100 µL were cultured onto both media.

The feces collected were ground in sterile Petri dishes and, approximately, one gram was added to a saline solution (NaCl 0.9%), containing chloramphenicol (0.4 g/L). The suspension was homogenized in a vortex, for three minutes, and it was left to decant for 30 minutes, at 25 °C. Afterwards, aliquots of 100 µL from the supernatant of each sample were cultured onto both media (Filiú et al., 2002).

Petri dishes containing the cultured media were incubated at 25 °C, for 10 days, and were observed daily. The colony-forming units were counted, from each Petri dish, after 48 hours of growth.

2.3.2. Identification

Initially, for each positive sample, colonies were observed microscopically after Gram staining. Then, colonies were subcultured into slants containing YEPD agar and tests were performed for identification at species level. Identification was based on microscopic morphology and biochemical parameters (urea hydrolysis and sugar assimilation), as described by Brito et al., 2009.

Candida spp. was, initially, grown on chromogenic media (HiCrome Candida Differential Agar, HiMedia, Mumbai, India) for identification of mixed colonies. Afterwards, individual colonies were subcultured into slants containing YEPD agar and Christensen's urea agar and, after 24 to 48h, the microorganisms were grown onto cornmeal Tween-80 agar in order to perform a morphologic analysis. A sugar assimilation test was also performed for each isolates. The results were interpreted according to De Hoog et al., 2000.

2.4 Antifungal Susceptibility Testing

Fifty-nine isolates of *Candida* spp. were tested: 39 *C. albicans* (16 from oral cavity, 15 from crop, seven from cloaca and one from stools); 12 *C. tropicalis* (five from oral cavity, three from crop and four from stools); seven *C. parapsilosis*, (three from oral cavity and four from crop) and one *C. krusei* from crop. The MIC for these microorganisms was determined by a broth microdilution method as described by Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2002) and Brito et al., 2009. As quality control for each test performed, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were included. The criteria for resistance and sensitivity were established according to CLSI (2002). Isolates with MICs >1 , ≥ 1 and ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ were considered resistant to amphotericin B, itraconazole and fluconazole, respectively.

Inocula of all the assayed isolates were prepared from one day-old cultures grown on potato dextrose agar at 37 °C. Sterile 0.9% saline (5 mL) was added to sterile glass slants and a sample of the colony was added to the saline solution, adjusting its concentration to 0.5 on McFarland Scale (CLSI, 2002). Afterwards, inocula were diluted 1:100 and then 1:20, in RPMI 1640 medium, with L-glutamine (HiMedia, Mumbai, India), buffered to pH 7 with 0.165M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). The final concentration of the inocula was $0.5 - 2.5 \times 10^3$ cells/mL (CLSI, 2002; Brito et al., 2009).

Final concentrations of drugs (amphotericin B, itraconazole and fluconazole) were obtained according to CLSI (2002) and Brito et al., 2009. All drugs were diluted as described above and resuspended in RPMI 1640 (HiMedia, Mumbai, India). The concentration range tested for amphotericin B and

itraconazole was 0.03125-16 µg/mL and for fluconazole was 0.125-64 µg/mL (Brito et al., 2009).

Susceptibility testing was performed on 96-well microdilution trays that were prepared according to Brito et al., 2009 and they were incubated at 37 °C, for 48 hours. For each isolate drug-free and yeast-free controls were included and all the isolates were tested in duplicate. For the azole derivatives, the MIC was defined as the lowest drug concentration inhibiting 80% of growth, when compared to the growth control well, and for amphotericin B the MIC was the lowest concentration at which no growth was observed (CLSI, 2002; Brito et al., 2009).

2.5 Phospholipase Production

The same isolates that were tested for antifungal susceptibility were screened for phospholipase activity. The test was performed according to Price et al., 1982, with some modifications. Briefly, the medium used was 2% agar Sabouraud Dextrose, supplemented with 1 mol/L sodium chloride, 0.05 mol/L calcium chloride and 8% sterile egg yolk emulsion, which was at a concentration of 30%. The emulsion was heated up to 40 °C and incorporated into the sterile medium, after it reached a temperature of 50 °C. Then, the medium was poured into 90 mm Petri dishes, forming a 4 mm film. Yeast inocula were prepared in sterile saline with a final concentration of 4 on McFarland scale. Five-millimeter sterilized filter paper disks were placed onto the agar and 5 µL of each inoculum were added on top of them. The plates were incubated at 35 °C, for seven days.

Phospholipase activity (Pz) was determined by calculating the ratio between the diameter of the fungal colony and the total diameter, including the colony and the precipitation zone. Thus, when $Pz = 1$, the isolate is phospholipase negative; when $1 > Pz \geq 0.64$ the isolate is positive for phospholipase activity; and when $Pz < 0.64$, the isolate is strongly positive for this enzyme.

2.6 Statistical Analysis

Data were analyzed by descriptive variable analysis. Variance analysis, T test and Levene's test were used to analyze phospholipase activity among different isolates, considering their species, isolation site and host's clinical status, with $P < 0.05$ as the smallest significance level. In order to analyze the existence of correlation among MICs for different drugs, phospholipase activity and birds' clinical status, Pearson or Spearman's correlation tests were used, considering $P < 0.01$ the smallest significance level.

3. Results

In terms of *in vitro* antifungal susceptibility testing, MIC values for all the isolates of *Candida* spp. are described in Table 1. For *C. albicans* the MIC for amphotericin B ranged from 0.25 to 1 $\mu\text{g/mL}$. For itraconazole, the MIC ranged from 0.03125 to ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ and fourteen isolates presented MICs ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$. For fluconazole, MICs ranged from 0.25 to ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ and four isolates presented MICs ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$. A positive correlation was observed between MICs for itraconazole and fluconazole ($P < 0.01$)

For the non-*albicans Candida* species the MIC for amphotericin B ranged from 0.25 to 1 µg/mL. The MIC for itraconazole and fluconazole ranged from 0.03125 to 0.25 µg/mL and 0.5 to 32 µg/mL, respectively (Table 3).

Phospholipase activity of the 59 isolates submitted to antifungal susceptibility test is demonstrated in Table 2. All *C. albicans* isolates were positive for phospholipase activity, with Pz values ranging from 0.35 to 0.82, 0.36 to 0.72 and 0.36 to 0.83 from oral cavity, crop and cloaca, respectively. 74.36% of the isolates presented a strong enzymatic activity ($P_z < 0.64$), with the highest proportion observed for those isolates from oral cavity (13/16; 81.25%), followed by cloaca (6/7; 71.43%) and crop (10/15; 66.67%), though no statistical differences were observed, considering different isolation sites.

As for the non-*albicans Candida* species, 40% were positive for phospholipase production: 6/12 *C. tropicalis*, 1/7 *C. parapsilosis* and one *C. krusei*. Only one (5%) of these isolates, *C. tropicalis* isolated from stools, presented a strong enzymatic activity ($P_z = 0.53$). Overall, P_z for non-*albicans Candida* species ranged from 0.69 to 1. Phospholipase activity was statistically different ($P < 0.05$), when comparing *C. albicans* with non-*albicans Candida* species.

4. Discussion

There are several researches with surveillance of antifungal susceptibility profiles for fungi isolated from human beings. However, researches with yeasts isolated from animals are scarce and no reports have been found for yeasts from

birds. Thus, the discussion of our findings is based on scientific works with *Candida* spp. isolated from other sources, such as human beings and dogs.

In this study, all tested *Candida* spp., including *C. krusei*, were susceptible to amphotericin B, similar to what was observed by other authors who worked with *Candida* spp. isolated from diseased humans (Matta et al., 2007; Rautemaa et al., 2008) and from healthy dogs (Brito et al., 2009). In fact, resistance to this drug, among *Candida* spp., is quite rare, being currently observed in some *C. krusei* and *C. glabrata* strains (Pfaller & Diekema, 2007; Johnson, 2008; Kanafani & Perfect, 2008).

All of the isolates of *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* were susceptible to both, itraconazole and fluconazole. On the other hand, fourteen (35.89%) and four (10.26%) isolates of *C. albicans* were resistant to itraconazole and fluconazole, respectively, a high percentage when compared to those reported for *Candida* spp. from different anatomical sites of diseased humans (Matta et al., 2007; Basma et al., 2008; Costa et al., 2009). Out of them, three were resistant to both itraconazole and fluconazole.

Even though, resistance to both azole derivatives was not frequently seen, the occurrence of resistance to one of the drugs was commonly associated with a decreased susceptibility to the other, as observed by Rautemaa et al., 2008. Five out of 14 itraconazole resistant isolates presented a dose-dependent susceptibility to fluconazole.

Phospholipase activity (Pz) values observed in our study were similar to those observed in other researches with yeasts isolated from birds (Cafarchia et al.,

2008; Vieira & Acqua-Coutinho, 2009) and humans (Fotedar & Al-Hedaithy, 2005; Zeng et al., 2008).

For many years, it was believed that only *C. albicans* was able to produce phospholipase, however, now, it is known that other species of *Candida* also produce this enzyme, usually in smaller amounts (Ghannoum, 2000), as demonstrated by our research.

It was observed that all *C. albicans* and 40% (8/20) of non-*albicans* *Candida* species were positive for phospholipase activity, diverging from what was observed by Cafarchia et al., 2008, and Vieira; Acqua-Coutinho, 2009, who found lower percentage of phospholipase producing *C. albicans*, 80% and 50%, respectively, and higher percentage of non-*albicans* *Candida* species positive for enzymatic activity, 54.54% and 64%, respectively.

The production of phospholipase by *C. albicans*, in human beings, varies according to the isolation site and to the host's health status (Samaranayake et al., 2005). Variability among Pz values was observed by Cafarchia et al., 2008, when comparing phospholipase production of isolates from cloaca and stools. However, no reports correlate phospholipase production with the health status of birds from which yeasts were isolated. In our study, no significant differences were observed between phospholipase activity and isolation site or host's clinical status.

For *C. albicans*, the highest percentage of strongly positive isolates was observed in oral cavity (13/16, 81.25%), followed by cloaca (5/7, 71.43%) and crop (10/15, 66.67%). It is interesting to emphasize that even though all the birds sampled were apparently healthy, they carried a high percentage of strongly

positive *C. albicans* (74.36%), higher than the percentage observed for isolates from healthy human beings (30.23%) (Oksuz, et al., 2007) and similar to that from oral candidosis in humans (73%) (Costa et al., 2009).

5. Conclusion

Considering that animals can act as potential sources of *Candida* spp. infections for human beings, a special attention must be given to cockatiels, once it is here shown their role as carriers and spreaders of phospholipase producing yeasts in their gastrointestinal tract and stools. Not only these microorganisms are potentially pathogenic for humans, but they also present phenomenon of azole resistance. Therefore, owners and caretakers should be aware that these birds might represent a hazard to human health, as sources of infections caused by resistant *Candida* spp., especially to immunocompromised individuals, children and elderly.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (National Scientific and Technological Research Council - process 473881/2008-0).

References

Basma, R., Barada, G., Ojaimi, N., Khalaf, R.A., 2008. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. *Mycoses*, 52, 141-148.

Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J.; Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2009. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. Vet. J., 182, 320-326.

Cafarchia, C., Camarda, A., Romito, D., Campolo, M., Quaglia, N.C., Tullio, D., Otranto, D., 2006a. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. Mycopathologia, 161, 229-234.

Cafarchia, C., Romito, D., Iatta, R., Camarda, A., Montagna, M.T., Otranto, D., 2006b. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. Med. Mycol., 44, 485-492.

Cafarchia, C., Romito, C., Coccioli, C., Camarda, A., Otranto, D., 2008. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human diseases. Med. Mycol.. 46, 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.

Cragg, J., Clayton, Y.M., 1971. Bacterial and fungal flora of seagull droppings in Jersey. J. Clin. Pathol., 24, 317-319.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueiras M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmislcultures, Baarn, pp. 130 – 143, 156 – 160, 164 – 174.

- Edelmann, A., Krüger, M., Schmid, J., 2005. Genetic Relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol., 43, 6164-6166.
- Filiú, W.F.O., Wanke, B., Agüenas, S.M., Vilela, V.O., Macedo, R.C.L., Lazera, M., 2002. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 35, 591-595.
- Fotedar, R., Al-Hedaithy, S.S.A., 2005. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. Mycoses, 48, p. 62-67.
- Ghannoum, M.A., 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev., 13, 122-143.
- Johnson, E.M., 2008. Issues in antifungal susceptibility testing. J. Antimicrob. Chemother., 61, il3-il8.
- Kanafani, Z.A., Perfect, J.R., 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin. Infect. Dis., 46, 120-128.
- Kocan, M.R., Hasenclever, H.F., 1972. Normal yeast flora of the upper digestive tract of some wild columbids. J. Wildl. Dis., 8, 365-368.
- Mancianti, F., Nardoni, S., Ceccherelli, R., 2001. Occurrence of yeasts in psittacine droppings from captive birds in Italy. Mycopathologia, 153, 121-124.
- Matta, D.A., Almeida, L.P., Machado, A.M., Azevedo, A.C., Kusano, E.J.U., Travassos, N.F., Salomão, R., Colombo, A.L., 2007. Antifungal susceptibility of

1000 bloodstream *Candida* isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 57, 399-404.

Melville, P.A., Cogliati, B., Mangiaterra, M.B.B.C.D., Peres, M.R, Moura, S.C.A., Matsuda, L., Kim, A., Benites, N.R., 2004. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. *Cienc. Rural*, 34, 1871-1876.

Pfaller, M.A, Diekema, D.J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis, a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 133-163.

National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. NCCLS, document M27-A2.

Oksuz, S., Sahin, I., Yildirim, M., Gulcan, A., Yavuz, T., Kaya, D., Koc, A.N., 2007. Phospholipase and proteinase activity in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60, 280-283.

Palacio, A., Villar, J., Alhambra, A, 2009. Epidemiología de las candidiasis invasoras em población pediátrica y adulta. *Rev. Iberoam. Micol.*, 26, 2-7.

Price, M.F., Wilkinson, I.D., Gentry, L.O., 1982. Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 22, 201-207.

Rautemaa, R., Richardson, M., Pfaller, M.A., Perheentupa, J., Saxén, H., 2008. Activity of amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, micafungin,

posaconazole, and voriconazole against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from APECED patients on long-term azole treatment of chronic mucocutaneous candidiasis. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 62, 182-185.

Richardson, J.A., 2006. Implication of toxic substances in clinical disorders. In: Harrison, G.J., Lightfoot, T.L (Eds), *Clinical Avian Medicine*, Spix Publishing, Palm Beach, pp. 711 – 720.

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., 2005. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes of *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Med. Microbiol.*, 54, 583-593.

Samour, J.H., Naldo, J.L., 2002. Diagnosis and therapeutic management of candidiasis in falcons in Saudi Arabia. *J. Avian Med. Surg.*, 16, 129-132.

Velasco, M.C., 2000. Candidiasis and cryptococcosis in birds. *Semin. Avian Exot. Pet Med.*, 9, 75-81.

Vieira, R.G., Acqua-Coutinho, S.D., 2009. Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). *Pesqui. Vet. Bras.*, 29, 452-456.

Zeng, X., Hou, X., Wang, Z., Jiang, L., Xiong, C, Zhou, M., Chen, Q., 2008. Carriage rate and virulence attributes of oral *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Mycoses*, 52, 161-165.

Table 1: Minimal inhibitory concentration of amphotericin B, itraconazole and fluconazole against 59 isolates of *Candida* spp. from gastrointestinal tract of cockatiels.

<i>Candida</i> spp.	n	MIC (µg/mL)		
		Amphotericin B	Itraconazole	Fluconazole
<i>C. albicans</i>	39	0.25 (6) ^a	0.03125 (3)	0.25 (2)
		0.5 (23)	0.0625 (8)	1 (9)
		1 (10)	0.125 (8)	2 (8)
			0.25 (5)	4 (3)
			0.5 (1)	8 (5)
			1 (1)	16 (5)
			2 (3)	32 (3)
			8 (1)	≥64 (4)
			≥16 (9)	
<i>C. tropicalis</i>	12	0.25 (2)	0.03125 (2)	0.5 (2)
		0.5 (6)	0.0625 (2)	1 (7)
		1 (4)	0.125 (6)	2 (1)
			0.25 (2)	8 (2)
<i>C. parapsilosis</i>	7	0,5 (3)	0.0625 (2)	1 (3)
		1 (4)	0.125 (5)	2 (4)
<i>C. krusei</i>	1	1	0.125	32
<i>C. krusei</i> ATCC	1	2	0.125	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	1	2	0.03125	2

^a Represents the number of isolates that presented the indicated MIC

Table 2: Phospholipase activity of 59 isolates of *Candida* spp. from gastrointestinal tract of cockatiels.

Species	n	Phospholipase Activity			
		Oral Cavity	Crop	Cloaca	Stools
<i>C. albicans</i>	39	1>Pz≥0.64 (3) ^a <0.64 (13)	1>Pz≥0.64 (5) <0.64 (10)	1>Pz≥0.64 (2) <0.64 (5)	- 0.51
<i>C. tropicalis</i>	12	1 (2) 1>Pz≥0.64 (3)	1 (1) 1>Pz≥0.64 (2)	- -	1 (3) <0.64 (1)
<i>C. parapsilosis</i>	7	1 (2) 1>Pz≥0.64 (1)	1 (4)	- -	- -
<i>C. krusei</i>	1	-	0.94	-	-

^a Represents the number of isolates that presented the indicated phospholipase activity

8. CONCLUSÕES

1. As leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de calopsitas, merecendo destaque o gênero *Candida* por ter sido isolado de um grande número de indivíduos. Leveduras foram isoladas de 65% (39/60) das aves testadas, considerando pelo menos um sítio anatômico avaliado, e de 64,28% (9/14) das amostras de fezes obtidas. Ao todo foram obtidos 120 isolados, dos quais 89 (74,17%) eram *Candida* spp. Nenhuma correlação foi observada entre o estado clínico das aves e a contagem de unidades formadoras de colônias. Com base no exposto, torna-se evidente o papel dessa espécie animal como carreadora e disseminadora de leveduras potencialmente zoonóticas, uma vez que os gêneros supracitados estão frequentemente associados a infecções humanas, sobretudo, *Candida* e *Cryptococcus*.

2. O fenômeno de resistência primária frente ao itraconazol e fluconazol está presente em *Candida albicans* isoladas do trato gastrointestinal de calopsitas, o que pode representar um risco a indivíduos imunocomprometidos que têm contato com essas aves e/ou suas excretas, uma vez que essas drogas são as mais amplamente utilizadas no tratamento e na profilaxia contra infecções de mucosas, causadas por esse microorganismo.

3. As *Candida* spp. oriundas do trato gastrointestinal de calopsitas são capazes de produzir a enzima fosfolipase, sobretudo, *C. albicans*, que apresentou atividade enzimática em todos isolados, ratificando assim o potencial patogênico desta leveduras.

9. PERSPECTIVAS

1. O conhecimento da microbiota do trato gastrointestinal é de grande importância biológica e zootécnica, por auxiliar na compreensão da dinâmica microbiana, o que é essencial para a prevenção de distúrbios gastrintestinais, elaboração de dietas adequadas e otimização dos sistemas de criação. Este trabalho foi pioneiro para a espécie estudada e forneceu dados importantes sobre a composição da microbiota. No entanto, não ficou claro o efeito de diferentes dietas e do estado clínico do animal sobre o isolamento de diferentes espécies de leveduras. Portanto, torna-se necessária a realização de mais estudos visando à análise dessas variáveis para a elaboração de protocolos de manejo para a criação profissional e amadora dessas aves em cativeiro, com intuito de promover a saúde e o bem-estar animal, bem como otimizar a criação.

2. O monitoramento do perfil de sensibilidade de cepas de *Candida* spp. de origem animal é bastante escasso, sendo limitado o número de trabalhos nessa área. Este trabalho constatou a ocorrência do fenômeno de resistência primária a derivados azólicos em cepas de *C. albicans*. Considerando que os animais representam possíveis fontes de infecção para seres humanos, torna-se necessária a realização de estudos genéticos para compreender os mecanismos desse fenômeno.

3. O conhecimento e a compreensão dos fatores de virulência de um microorganismo contribuem tanto para a prevenção das doenças, como também para a elaboração de novas alternativas terapêuticas que visam à supressão desses fatores. Isolados de *Candida* spp. oriundos de calopsitas foram avaliados somente quanto à produção de fosfolipase, o que permitiu compreender parcialmente o potencial patogênico dessas leveduras. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para avaliar a expressão de outros fatores de virulência, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, para que se possa conhecer o risco real de infecções interespecíficas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* isolated from excreta of psittaciformes in a Southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, v. 161, p. 83-91, 2006.

ARUO, S. K. Necrotizing cutaneous rhodotorulosis in chickens in Uganda. *Avian Diseases*, v. 24, n. 4, p. 1038-1043, out-dez. 1980.

BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y. WILSON, R. G.; RYLEY, J. F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of General Microbiology*, v. 131, p. 1217-1221, 1985.

BASU, S.; GUGNANI, H. C.; JOSHI, S.; GUPTA, N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 30, p. 137-140.

BEEMER, A. M.; SCHNEERSON-PORAT, S.; KUTTIN, E. S. *Rhodotorula mucilaginosa* dermatitis on feathered parts of chickens: an epizootic on a poultry farm. *Avian Diseases*, v. 14, n. 2, p. 234-239, mai. 1970.

BIRDS IN BACKYARDS. COCKATIEL (*Nymphicus hollandicus*). Desenvolvido por Australian Museum, 2006. Apresenta informações sobre as aves nativas da Austrália. Disponível em: <<http://www.birdsinbackyards.net/bird/49>>. Acesso em: 27 out. 2009.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The Veterinary Journal*, v. 182, n. 2, p. 320-326, nov. 2009.

CAFARCHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N. C.; TULLIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia*, v. 161, p. 229-234, 2006a.

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

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, mar. 2008.

CHEE, H. Y.; LEE, K. B.; Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *The Journal of Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 469-472, out. 2005.

CÔRREA, M. P. S. C.; SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M.; IRION, K.; LONDERO, A. T. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in central nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 44, n. 5, p. 283-287, set-out. 2002.

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.

CRAGG, J.; CLAYTON, Y. M. Bacterial and fungal flora of seagull droppings in Jersey. *Journal of Clinical Pathology*, v. 24, p. 317-319, 1971.

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. p. 130 – 143, 156 – 160, 164 – 174.

FAGUNDES-JÚNIOR, A. A. P.; CARVALHO, R. T.; FOCACCIA, R.; FERNANDEZ, J. G.; ARAÚJO, H. B. N.; STRABELLI, T. M. V.; KOPEL, L.; LAGE, S. G. Emergência de infecção por *Trichosporon asahii* em pacientes portadores de insuficiência cardíaca em unidade de terapia intensiva cardiológica: relato de caso e revisão da literatura. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 20, n. 1, jan-mar. 2008.

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZERA, M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 6, p. 591-595, nov-dez, 2002.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, v. 48, p. 62-67, 2005.

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

GARCÍA-MARTOS, P.; GARCÍA-AGUDO, L.; RUIZ-ARAGÓN; SALDARREAGA, A.; MARÍN, P. Asimilación de carbohidratos por cepas de *Rhodotorula glutinis* de origen clínico y ambiental. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 90-92, 2004.

GARTRELL, B. D.; ROGERS, L.; ALLEY, M. R. Eosinophilic dermatitis associated with *Trichosporon asahii* in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Journal of Avian and Surgery*, v. 19, n.1, p. 25-29, 2005.

GELLIS, S. Evaluating and treating the gastrointestinal system. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. *Clinical Avian Medicine*. Palm Beach, Flórida: Spix Publishing, 2006. cap.14, p. 411 – 440.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p.122-143, 2000.

GUÉHO, E.; IMPROVISI, L.; DE HOOG, G. S.; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*, v. 37, p. 3-10, 1993.

GRÜNDER, S.; MAYSER, P.; REDMANN, T.; KALETA, E. F. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. *Mycoses*, v. 48, p. 114-119, 2005.

HAZEN, K. Z. New and emerging yeasts pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 4, p. 462-478, out. 1995.

HETHERINGTON, M. John Gould's birds of Australia. *National Library of Australia*. Disponível em: <http://www.nla.gov.au/collect/treasures/apr_treasure.html>. Acesso em: 15 jul. 2008.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 48, p.153-160, 2004.

HYDE, G.; VICTORIA, E. The cockatiel- an overview. *Avicultural Society of Australia*, Australia, 2006. Disponível em: <<http://www.birds.org.au/cgi-bin/articles.pl?Cockatiel>>. Acesso em: 15 jul. 2008.

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, n. 5, p. 1993-1998, mai. 1995.

JONES, D. Feeding ecology of cockatiel, *Nymphicus hollandicus*, in a grain-growing area. *Australian Wildlife Research*, v. 14, n. 1, p. 105 – 115, 1987.

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, jan. 2008.

KANO, R.; SAKAMOTO, Y.; HANAHACHI, A.; KAMATA, H.; FUKUDA, Y.; FUJIWARA, K.; HASEGAWA, A. Molecular identification of *Candida parapsilosis* from crop mucosa in a cockatiel. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, p. 437-439, 2001.

KLAPHAKE, E.; CLANCY, J. Raptor gastroenterology. *Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*, v. 8, p. 307-327, 2005.

KOCAN, M. R.; HASENCLEVER, H. F.; Normal yeast flora of the upper digestive tract of some wild columbids. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 8, p. 365-368, out. 1972.

KOCIJAN, I.; PRUKNER-RADOVCIC, E.; BECK, R.; GALOV, A.; MARINCULIC, A.; SUSIC, G. Microflora and internal parasites of the digestive tract of Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*) in Croatia. *European Journal of Wildlife Research*, v. 55; p. 71-74, 2009.

LAGROU, K.; VAN ELDERE, J.; KEULEERS, S.; HAGEN, F.; MERCKX, R.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W. E.; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *Journal of Internal Medicine*, v. 257, p. 385-388, 2005.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A. Z.; MURO, M. D.; FARIAS, M. R.; MONTIANI-FERREIRA, F.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* isolated from passerine and psittacine bird excreta in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, v. 166, p. 61-69, 2008.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHERELLI, R. Occurrence of yeasts in psittacine droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia*, v. 153, p. 121-124, 2001.

MATHIAS, J. M. Como criar calopsitas. *Revista Globo Rural*, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1257601-4530,00.html>>. Acesso em: 15 jul. 2007.

MATTA, D. A.; ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J. U.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Antifungal susceptibility of 1000 bloodstream *Candida* isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 57, p. 399-404, 2007.

MAVES, R. C.; HALE, B. R. *Trichosporon* infections. [S. l.], 2006. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/med/topic2310.htm>>. Acesso em: 20 set. 2008.

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

MEYER, M. H.; LETSCHER-BRU, V.; WALLER, J.; LUTZ, P.; MARCELLIN, L.; HERBRECHT, R. Chronic disseminated *Trichosporon asahii* infection in a leukemic child. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. e22-e25, jul. 2002.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 6, p. 50 - 62.

MORETTI, A.; FIORETTI, D. P.; BONCIO, L.; PASQUALI, P.; DEL ROSSI, E. Isolation of *Candida rugosa* from turkeys. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 47, p. 433-439, 2000.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis, a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 1, p. 133-163, jan. 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Métodos de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS, documento M27-A2, 2002.

NETSVYETAYEVA, I.; SWOBODA-KOPEC, E.; PACZEK, L.; FIEDOR, P.; SIKORA, M.; JAWORSKA-ZAREMBA, M.; BLACHNIO, S.; LUCZAK, M. *Trichosporon asahii* as a prospective pathogen in solid organ transplant recipients. *Mycoses*, v. 52, p. 263-265, 2008.

NOSANCHUK, J. D.; SHOHAM, S.; FRIES, B. C.; SHAPIRO, D. S.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL, A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Annals of Internal Medicine*, v. 132, p. 205-208, 2000.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. N. Phospholipase and proteinase activity in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 60, p. 280-283, 2007.

OMBRELLA, A. M.; RACCA, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 12-16, 2008.

OSORIO, C.; FLETCHER, O.; DYKSTRA, M. J.; POST, K.; BARNES, H. J. Comb candidiasis affecting roosters in a broiler breeder flock. *Avian Diseases*, v. 51, p. 618-622, 2007.

PALACIO, A.; VILLAR, J.; ALHAMBRA, A. Epidemiología de las candidiasis invasoras em población pediátrica y adulta. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 26, n. 1, p. 2-7, 2009.

PERNIOLA, R.; FANESCHI, M. L.; MANSO, E.; PIZZOLANTE, M.; RIZZO, A.; STICCHI-DAMIANI, A.; LONGO, R. *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal

intensive care unit: microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 25, p. 193-196, 2006.

QUINDÓS, G.; ALONSO-VARGAS, R.; HELOU, S.; ARECHAVALA, A.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; NEGRONI, R. Evaluación micológica de uno nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras e interés médico. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 18, p. 23-28, 2001.

RASO, T. F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Medical Mycology*, v. 42, p. 355-362, 2004.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. 982-989, 2002.

RICHARDSON, J. A. Implication of toxic substances in clinical disorders. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. *Clinical Avian Medicine*. Palm Beach, Flórida: Spix Publishing, 2006. cap.31, p. 711 – 720.

ROSARIO, I; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. S13-S18, 2008.

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.

SAMOUR, J. H.; NALDO, J. L. Diagnosis and therapeutic management of candidiasis in falcons in Saudi Arabia. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 16, n. 2, p. 129-132, 2002.

SCULLION, F. T.; SCULLION, M. G. Pathologic findings racing pigeons (*Columba livia domestica*) with “young bird disease”. *Journal of Medicine and Surgery*, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2007.

SHRESTHA, R. K.; STOLLER, J. K.; HONARI, G.; PROCOP, G. W.; GORDON, S. M. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving infliximab: possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. *Respiratory Care*, v. 49, n. 6, p. 606-608, jun. 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 25, p. 265-274.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAY, S. T.; CHAI, H. C.; NA, S. L.; HAMIMAH, H.; ROHANI M. Y.; SOO-HOO, T. S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from birds in Klang Valley, Malaysia. *Mycopathologia*, v. 159, p. 509-513, 2005.

TSAI, S. S.; PARK, J. J.; HIRAI, K.; ITAKURA, C. Aspergillosis and candidiasis in psittacines and passeriformes birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathology*, v. 21, n. 4, p. 699-709, dez. 1992.

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

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

VIDOTTO, V.; KOGA-ITO, C. Y.; MILANO, R.; FIANCHINO, B.; PONTÓN, J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 16, p. 208-210, 1999.

VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSAS, S.; AOKI, S.; CARRARA, C.; PUGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 22, p. 29-33, 2005.

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. 70-74, 2004.

VIEIRA, R. G.; ACQUA-COUTINHO, S. D. Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 6, p. 452-456, jun. 2009.

VILAMAZONIA.COM – Um mundo de loros. Desenvolvido por Josep Bertran e Carlos Verges, 2008. Apresenta informações sobre psitacídeos vendidos. Disponível em: <http://www.vilamazonia.com/tipos_loros_carolinas_ninfas.php>. Acesso em: 15 jul. 2008.

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.