



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS, ATIVIDADE EXOENZIMÁTICA E
PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Candida tropicalis* DE ORIGEM
ANIMAL**

JONATHAS SALES DE OLIVEIRA

FORTALEZA – CEARÁ

2013

JONATHAS SALES DE OLIVEIRA

**SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS, ATIVIDADE EXOENZIMÁTICA E
PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Candida tropicalis* DE ORIGEM
ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA – CEARÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- O47s Oliveira, Jonathas Sales de.
Sensibilidade a antifúngicos, atividade exoenzimática e produção de biofilme por cepas de *cândida tropicalis* de origem animal./ Jonathas Sales de Oliveira. – 2013.
71 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal.
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.
Co-Orientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
1. Candida Tropicalis. 2. Testes de Sensibilidade Microbiana. 3. Fatores de Virulência. I.
Título.

CDD 616.9041

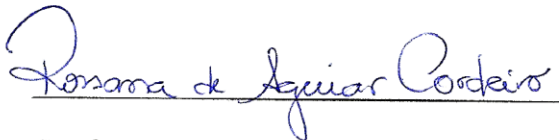
JONATHAS SALES DE OLIVEIRA

**SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS, ATIVIDADE EXOENZIMÁTICA E
PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Candida tropicalis* DE ORIGEM
ANIMAL**

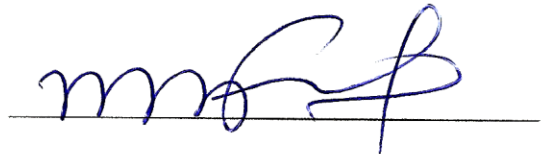
Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 19/12/2013

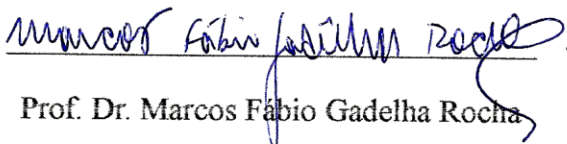
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Universidade Federal do Ceará
Orientadora



Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do
Nascimento
Universidade Estadual do Ceará
Examinador



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientador



Profa. Dra. Camila Gomes Virgínio Coelho
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

A Deus pelo novo fôlego a cada dia,
ao meu filho, por ser minha principal motivação,
à minha família, que é a base da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para prosseguir em uma jornada totalmente nova e inesperada em minha vida e pela sua presença em minha vida;

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará;

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

À professora Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, por ter me concedido a oportunidade de ampliar meus horizontes, por estar sempre disposta a repassar seu conhecimento e pelo exemplo de pessoa;

Ao professor Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por sua dedicação, ensinamentos e orientação em momentos importantes para prosseguimento da minha jornada;

À professora Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelo apoio e disponibilidade que muito me ajudaram durante este processo de crescimento pessoal;

Ao professor Dr. José Júlio Costa Sidrim, por toda a sabedoria transmitida e por motivar a incessante busca pelo conhecimento;

À professora Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, por sua dedicação com os alunos e sua alegria contagiante;

À Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, pela disposição para ajudar sempre que precisei;

À Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, à Silviane Praciano Bandeira e ao Daniel Teixeira Lima, pelo suporte durante a execução desse trabalho;

Ao Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira, por sua disponibilidade na execução do projeto, palavras de força e amizade;

À Francisca Jakelyne de Farias Marques, pelo tempo e apoio que me disponibilizou e pela paciência que para ensinar;

Aos colegas do CEMM, pelos bons momentos e pelo convívio nas alegrias e angústias. Em especial à Rosana Serpa, Charlline Vlândia, Ramila Macêdo, Paula Bittencourt, Manoel Paiva, Lucas Pereira de Alencar, Rita Amanda, Érica Pacheco, Natalya Fechine, Glaucia Morgana, Vitor Luz, Jamille Alencar e Pedro Henrique;

À secretária do PPGMM, Carolinda Vilma Soares de Oliveira, pela ajuda prestada;

À Eveline Lanzillotti e ao Francisco Ernani Magalhães, por terem me incentivado e acreditado que eu poderia trilhar esse caminho;

Aos amigos Alexandre Lopes, Marcos Monteiro e Sandra Araújo, pelas palavras de incentivo e carinho;

Aos meus pais, Manoel Sales Ferreira e Emília Maria de Oliveira, pelo amor e pela educação que levarei comigo para sempre;

À minha esposa, Maria Débora Ferreira Desidério, pela compreensão, por sempre estar ao meu lado para me segurar quando as forças desaparecem e pelo amor;

Ao meu filho, Dan Lucas Ferreira Sales, pelo sorriso que sempre me acalma e me faz querer prosseguir em meio às dificuldades e pelo seu amor, mesmo na ausência;

À toda a minha família, pelo carinho, amizade e apoio;

Aos meus indescritíveis amigos, por sempre transformarem minha vida em um acontecimento imprevisto, inimaginável, improvável; por conseguirem me suportar e me entender;

A todos que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram no andamento e conclusão dessa etapa de minha formação;

“Quem é mais feliz: aquele que desafiou a tormenta da vida e viveu ou aquele que se ateu à margem e meramente existiu?”

Hunter S. Thompson

RESUMO

Nos últimos anos houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida*. Apesar de *C. albicans* ser considerada a principal representante do gênero, outras espécies vêm ganhando destaque. *C. tropicalis*, por exemplo, tem sido associada à candidíases invasivas graves, sendo a primeira ou segunda espécie de *Candida* não-*albicans* mais comumente isolada em candidemia e candidúria em humanos, além de ser frequentemente isolada da microbiota de animais saudáveis e com candidíase. Para estabelecer a infecção, *C. tropicalis* expressa diversos fatores de virulência, como a secreção de enzimas protease e fosfolipase, a produção de biofilme, dentre outros. O presente trabalho buscou avaliar o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* e produção de fatores de virulência de cepas de *C. tropicalis* (n=100) isoladas de diferentes espécies animais. As cepas foram submetidas a teste de sensibilidade *in vitro* por meio do método de microdiluição em caldo, protocolo M27-A3, padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, frente anfotericina B, itraconazol e fluconazol. Foram avaliados ainda os atributos de virulência: produção de enzimas proteases e fosfolipases e produção de biofilme. Quanto ao perfil de sensibilidade das cepas de *C. tropicalis*, 38% foram resistentes a itraconazol, 40% resistentes a fluconazol e 34% foram resistentes a ambos os derivados azólicos. Nenhuma cepa apresentou resistência a anfotericina B. Quanto a produção de proteases, 84% das cepas secretaram estas enzimas em meio com pH 5,0, enquanto somente 40% das cepas foram ativas em pH 3,5. Somente 8% das cepas produziram fosfolipases. As cepas apresentaram padrão diferenciado na produção de biofilme, em que 63,2% foram consideradas fortes produtoras, 17,6% foram consideradas moderadas produtoras e 13,3% foram consideradas fracas produtoras. Em suma, os isolados de *C. tropicalis* provenientes de animais apresentaram resistência a derivados azólicos e expressaram fatores de virulência importantes, indicando potencial risco à saúde humana e animal.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Animais. Sensibilidade antifúngica. Fatores de virulência.

ABSTRACT

In recent years there has been a significant increase in the incidence of fungal infections caused by *Candida* species. Although *C. albicans* be considered the principal representing of the genus, other species have been gaining prominence. *C. tropicalis*, for example, has been associated with serious invasive candidiasis, being the first or second type of non-*Candida albicans* *Candida* most commonly isolated in humans with candidemia and candiduria and is frequently isolated from healthy animals and animals with candidiasis. To establish infection, *C. tropicalis* expresses many virulence factors such as the secretion of enzymes phospholipases and proteases, biofilm production, among others. This study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal susceptibility profile and production of virulence factors in strains of *C. tropicalis* (n=100) isolated from several animal species. The strains were subjected to *in vitro* susceptibility testing by broth microdilution test, M27-A3 protocol, standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute against amphotericin B, itraconazole and fluconazole. We also evaluated the virulence attributes, such as proteases and phospholipases production and biofilm formation. Regarding the susceptibility of *C. tropicalis* strains, 38% were resistant to itraconazole, 40% were resistant to fluconazole and 34% were resistant to both azoles. None of the strains were resistant to amphotericin B. Regarding the production of proteases, 84% of the strains secreted these enzymes in the medium with pH 5.0, whereas only 40% of the strains were active at pH 3.5. Only 8% of the strains produced phospholipases. The strains showed different pattern in biofilm production, which 63,2% were strong producers, 17,6% were moderate producers, and 13,3% were weak producers. In summary, the *C. tropicalis* strains isolated from animals showed high rate of resistance to azoles and expressed important virulence factors, indicating a potential threat to human and animal health.

Keywords: *Candida tropicalis*. Animals. Antifungal susceptibility. Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colônias de <i>Candida</i> spp. em ágar batata dextrose.....	17
Figura 2 - Crescimento de <i>C. tropicalis</i> em meio cromogênico.....	18
Figura 3 - Microcultivo de <i>C. tropicalis</i> em ágar fubá acrescido de Tween 80.....	19
Figura 4 - Prova de assimilação de carboidratos de <i>C. tropicalis</i>	19
Figura 5 - Prova de fermentação de carboidratos de <i>Candida</i> spp.	20
Figura 6 - Avaliação da produção de fosfolipases extracelulares por cepas de <i>Candida</i> spp. em meio ágar gema de ovo.....	24
Figura 7 - Avaliação da produção de proteases extracelulares por cepas de <i>Candida</i> spp. em meio ágar BSA.....	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características microbiológicas e bioquímicas de <i>C. tropicalis</i>	20
Quadro 2 - Origem das cepas de <i>C. tropicalis</i> isoladas de animais saudáveis.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> de cepas de <i>Candida tropicalis</i> isoladas de diferentes espécies animais.	39
Tabela 2 - Produção <i>in vitro</i> de fatores de virulência por cepas <i>Candida tropicalis</i> isoladas de diferentes espécies animais.	42

APÊNDICE

Tabela 1 - Distribuição das cepas de <i>C. tropicalis</i> por espécie animal, expressão de fatores de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica.....	63
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aids – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMB – Anfotericina B

BSA – Albumina sérica bovina

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

CNA – *Candida não-albicans*

DMSO – Dimetilsufóxido

EUA – Estados Unidos da América

FLC – Fluconazol

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ITC – Itraconazol

MOPS – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

OD – Densidade óptica

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

Saps – Aspartil proteases secretadas

USA – United States of America

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Infecções Fúngicas	13
<i>1.1.1 Infecções por Candida spp.</i>	14
1.2 O Gênero <i>Candida</i> e sua Relação com Animais	15
1.3 <i>Candida tropicalis</i>	16
<i>1.3.1 Fatores de virulência</i>	22
<i>1.3.2 Resistência a antifúngicos</i>	28
2 PERGUNTAS DE PARTIDA	31
3 HIPÓTESES	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos Específicos	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Local de Estudo	33
5.2 Micro-organismos Estudados	33
5.3 Teste de Sensibilidade	33
<i>5.3.1 Drogas antifúngicas</i>	33
<i>5.3.2 Inoculo fúngico</i>	35
<i>5.3.3 Ensaio de microdiluição</i>	35
5.4 Produção de Fosfolipases	35
5.5 Produção de Proteases	36
5.6 Formação de Biofilme de <i>C. tropicalis</i>	36
5.7 Análise Estatística	37
6 RESULTADOS	38

6.1 Teste de Sensibilidade	38
6.2 Produção Enzimática	40
6.3 Formação de Biofilme	41
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÕES	47
9 PERSPECTIVAS	48
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE	62
Apêndice A	63
Apêndice B	65
ANEXO	66
Anexo I	67
Anexo II.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções fúngicas

Os fungos são seres eucariontes heterotróficos que tradicionalmente e morfologicamente são classificados em leveduras e filamentosos. A maioria dos fungos é ubíqua no ambiente, podendo interagir com plantas, animais ou seres humanos, estabelecendo relação simbiótica, comensal ou patogênica (ROMANI, 2011).

Desde o início da década de 1980 houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas humanas. Esse aumento na ocorrência de micoses está relacionado à expansão da população de pacientes imunossuprimidos, incluindo pacientes com câncer, pacientes HIV positivos, recém-nascidos prematuros, pacientes idosos e pacientes em recuperação pós-cirúrgica (PFALLER; DIEKEMA, 2007; NUCCI et al., 2010; WILLIAMS et al., 2011). Avanços nos protocolos de tratamento de doenças graves, transplante de órgãos, hemodiálise, nutrição parenteral e uso de catéter venoso central também contribuíram para a invasão e colonização de fungos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

As infecções fúngicas podem ser causadas por dois grupos de micro-organismos: patógenos primários e patógenos oportunistas. Patógenos primários são capazes de estabelecer infecções em pessoas saudáveis; patógenos oportunistas, entre eles micro-organismos comensais na população saudável, são capazes de causar infecções quando o hospedeiro se encontra imunocomprometido. (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Dependendo do tecido que é inicialmente colonizado, as infecções fúngicas podem ser classificadas em: micoses superficiais, que são restritas a camada mais externa da epiderme; micoses cutâneas, que envolvem o sistema tegumentar, incluindo unhas e cabelos; micoses subcutâneas, que são infecções das camadas mais profundas da pele, e micoses sistêmicas, nas quais o micro-organismo se dissemina e infecta diferentes órgãos (HSU et al., 2012; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Entre os principais patógenos causadores de infecções fúngicas invasivas em indivíduos imunocomprometidos estão leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium prolificans*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Rhizomucor* (RAMANA et al., 2013).

1.1.1 Infecções por *Candida* spp. em Humanos

O gênero *Candida*, pertencente ao filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales, engloba leveduras de importância clínica e científica (DIEZMANN et al., 2004; CHAI; DENNING; WARN, 2010), sendo descritas atualmente mais de 300 espécies de *Candida* (LACHANCE et al., 2011).

Candida spp. são considerados micro-organismos comensais que colonizam cerca de 50% dos indivíduos de uma população em um determinado momento de sua vida (LIONAKIS; NETEA, 2013). Espécies desse gênero são componentes da microbiota da pele, do trato gastrointestinal e do trato geniturinário, podendo ser encontrado ainda no trato respiratório superior (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Entretanto, em condições que levam ao enfraquecimento das defesas do hospedeiro, esses micro-organismos podem converter-se em patógeno oportunista, causando infecções nas mucosas ou infecções invasivas com alta taxa de mortalidade, apesar da terapêutica antifúngica (LIONAKIS; NETEA, 2013).

Nas últimas duas décadas houve um aumento na incidência de infecções por espécies de *Candida*, sendo esta a principal causa de infecções fúngicas em seres humanos (FOURNIER et al., 2011). Este aumento tem sido atribuído, em parte, ao crescente número de pacientes portadores de neoplasias ou doenças degenerativas, indivíduos transplantados e portadores do vírus HIV (CONDE-ROSA et al., 2010).

A invasão das células do hospedeiro inicia-se com a aderência dos blastósporos de *Candida* em células epiteliais, seguido da formação de hifa, penetrando na célula ativamente ou por endocitose, causando dano progressivo ao tecido (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013). Em pacientes hospitalizados, *Candida* spp. pode acessar a corrente sanguínea via cateteres vasculares ou se disseminar a partir do intestino e provocar candidemia, doença associada com elevada mortalidade (FILLER, 2012).

C. albicans é a principal espécie do gênero relacionada a infecções oportunistas, sendo o quarto micro-organismo mais isolado a partir de hemoculturas nos Estados Unidos da América (PFALLER, 2012). Entretanto, outras espécies do gênero *Candida* vêm ganhando destaque como patógenas, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (WILLIAMS et al., 2011; DE LUCA et al., 2012; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

O Programa ARTEMIS de Vigilância Antifúngica Global (ARTEMIS *Global Antifungal Surveillance Program*), nos EUA, mostrou que *C. albicans* é a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas (63-70%), seguido por *C. glabrata* (44%), *C. tropicalis* (6%)

e *C. parapsilosis* (5%). Porém, diferenças geográficas e institucionais são amplamente reportadas, sendo *C. glabrata* isolada com menos frequência fora dos EUA (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).

Estudos reportam que espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) são responsáveis por aproximadamente 60% das fungemias (SILVA et al., 2009). No Brasil, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são a segunda e terceira espécies de *Candida* mais comuns (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011). Um estudo epidemiológico sobre candidemia na América Latina conduzido por Nucci et al. (2013) mostrou que as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são a maior causa da doença, com uma alta porcentagem de crianças acometidas.

Mesmo com opções de tratamento efetivas, ainda é observada uma alta taxa de mortalidade e morbidade em pacientes acometidos por micoses oportunistas (NUCCI et al., 2010), sendo que as taxas de mortalidade de pacientes com infecções sistêmicas por *Candida* variam de 20-60% (SMEEKENS et al., 2013). Os impactos econômicos dessas infecções também são importantes, uma vez que estão associadas a um alto custo no tratamento e hospitalização prolongada (MA et al., 2013).

1.2 O gênero *Candida* e sua relação com animais

Dados da literatura mostram que as leveduras podem ser encontradas como componentes da microbiota ou como patógenos de algumas espécies animais, tanto domésticas como silvestres livres ou em cativeiro. A microbiota de algumas espécies de mamíferos terrestres e aquáticos, aves, répteis e crustáceos apresentaram espécies de leveduras como componentes (GARCÍA; BLANCO, 2000; NARDONI et al., 2008; PRADO et al., 2008; SIDRIM et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2010; BRILHANTE et al., 2011; BRILHANTE et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013; CASTELO-BRANCO et al., 2013). Porém, relatos sobre a presença de leveduras como componentes da microbiota de animais saudáveis são poucos quando comparados com relatos em humanos (WROBEL et al., 2008; ROZANSKI; SLASKA; ROZANSKA, 2013).

Assim como ocorre no ser humano, as leveduras podem sair do estado comensal em que se encontram e causar infecção em animais nos quais compõem a microbiota em decorrência do comprometimento das barreiras físicas e imunológicas do hospedeiro (SPANAMBERG et al., 2009). O gênero *Candida* engloba as espécies de leveduras que são isoladas com maior frequência de animais saudáveis e com infecção (BRITO et al., 2009). Essas leveduras estão relacionadas a infecções no trato urinário, infecções no trato

gastrointestinal, endoftalmite, lesões cutâneas e infecções sistêmicas de diferentes espécies animais (LINEK, 2004; OZAWA et al., 2005; KRAMER et al., 2008; JUNIANTITO et al., 2009; BRADFORD et al., 2013; DOYLE et al., 2013).

Os fatores predisponentes para a infecção por *Candida* são a idade do animal, presença de doenças auto-imunes, *diabetes mellitus*, uso de glicocorticóide, antibioticoterapia, cateterismo venoso e urinário e administração de nutrição parenteral. Os sítios anatômicos mais acometidos são: pele, unhas, ouvido, trato urinário e sistema gastrointestinal (JIN; LIN, 2005; BRITO et al., 2009; BRADFORD et al., 2013), porém infecções sistêmicas também podem ocorrer (BROWN; THOMPSON; MOHAMED, 2005; KRAMER et al., 2008; MATSUDA et al., 2009). Animais em cativeiro malnutridos, que estão em terapia antibiótica, que são mantidos em condições sanitárias impróprias ou passam por estresse também estão susceptíveis a infecções fúngicas oportunistas causadas por *Candida* spp. (VIEIRA; COUTINHO, 2009).

Enquanto em humanos as espécies de *Candida* mais frequentemente isoladas são *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (DA SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2012; NUCCI et al., 2013), em animais, além dessas espécies, são isoladas com frequência as espécies *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. krusei* e *C. kefyr* (BRITO et al., 2009; BRILHANTE et al., 2010; CARREGARO et al., 2010; BRILHANTE et al., 2011).

A resistência a derivados azólicos também tem sido observada em estudos com cepas isoladas de animais. *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram resistência a drogas como cetaconazol, fluconazol e itraconazol (BRITO et al., 2007; SIDRIM et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2010; CORDEIRO et al., 2013). Sendo assim, torna-se importante o estudo das características fenotípicas de espécies de *Candida* isoladas de animais, uma vez que são poucos os relatos na literatura.

1.3 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis, primeiramente conhecida como *Oidium tropicale*, foi diferenciada das demais espécies de *Candida*, em 1910, pelo patologista e bacteriologista italiano Aldo Castellani. Vários nomes foram atribuídos à espécie, como *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula dimorpha*, *Candida paratropicalis* e outros 58 sinônimos. Somente em 1923, o nome atual foi introduzido por Christine Marie Berkhout (NEGRI et al., 2012a).

As espécies de *Candida* apresentam aspectos únicos no que diz respeito à textura da colônia, micromorfologia em ágar fubá acrescido de Tween 80 e perfis de assimilação ou fermentação nos testes bioquímicos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Macroscopicamente, as culturas de *Candida* spp. apresentam colônias lisas, úmidas ou secas, de coloração branca ou creme (Figura 1) (DE HOOG et al., 2000).



FONTE: CEMM, 2013.

Figura 1 – Colônias de *Candida* spp. em Ágar batata dextrose após 48 h de incubação a 35 °C.

Microscopicamente, em sua forma assexuada, espécies de *Candida* são visualizadas como células globosas ou elipsoidais, cilíndricas ou alongadas, podendo formar hifas ou pseudo-hifas (LACHANCE et al., 2011). Para algumas espécies de *Candida*, a avaliação micromorfológica é o teste padrão-ouro na identificação, uma vez que formam estruturas específicas (DE HOOG et al., 2000).

Os isolados de *Candida* são também submetidos às provas bioquímicas de assimilação e fermentação de carboidratos e de assimilação de nitrogênio (DE HOOG et al., 2000). A técnica de assimilação de carboidratos se baseia na avaliação do crescimento do micro-organismo na presença de diferentes fontes de carbono, onde as espécies apresentam padrões de assimilação distintos (NEPPELENBROEK et al., 2013). Algumas espécies são capazes de fermentar a glicose, havendo também espécies capazes de assimilar nitrato de potássio (LACHANCE et al., 2011). *Candida* spp. são consideradas urease negativa, uma vez que não são capazes de hidrolizar a ureia (DE HOOG et al., 2000).

Ademais, meios seletivos e diferenciais, como o CHROMagar™ *Candida*, podem ser utilizados para isolamento de colônias puras e realizar um diagnóstico presuntivo rápido, uma vez que as espécies de *Candida* apresentam padrões de coloração variadas, resultado da clivagem de substratos cromogênicos por enzimas específicas de cada espécie (DE HOOG et

al., 2000; NEPPELENBROEK et al., 2013). Testes comerciais também podem ser utilizados na identificação de espécies de *Candida*, tais como os sistemas API 20C Aux (bioMerieux Hazelwood, MO, USA), Vitek2 e ID 32C (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), bem como métodos de identificação molecular (PCR e suas variações), um advento fundamental para o avanço da identificação de *Candida* spp. (NEPPELENBROEK et al., 2013).

Macroscopicamente, em meio ágar Sabouraud ou ágar batata dextrose, as colônias de *C. tropicalis* apresentam uma coloração creme, sem brilho, com borda micelial, sendo que essas colônias não são distinguíveis das de outras espécies de *Candida* (CHAI; DENNING; WARN, 2010; NEGRI et al., 2012a). No meio cromogênico CHROMagar™ *Candida* as colônias apresentam coloração azul escura (Figura 2). Microscopicamente, em ágar fubá acrescido de Tween 80 a 25 °C após 72 h de incubação, observa-se a presença de pseudo-hifas apresentando blastoconídeos ovais, isolados ou em pequenos grupos, ao longo de toda sua estrutura (Figura 3). *C. tropicalis* não forma tubo germinativo (NEGRI et al., 2012a; SILVA et al., 2012).

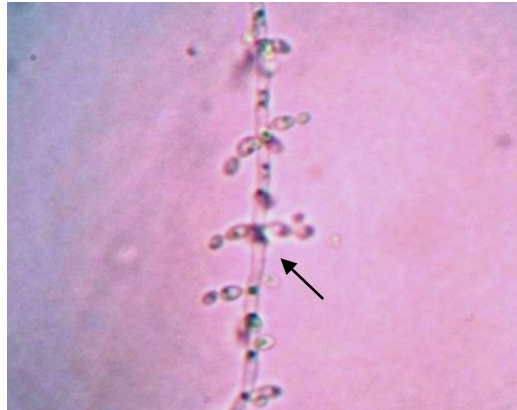


FONTE: CEMM, 2013.

Figura 2 - Crescimento de *C. tropicalis* em meio cromogênico (CHROMagar™ *Candida*). Observa-se a coloração azul escuro das colônias, característico da espécie.

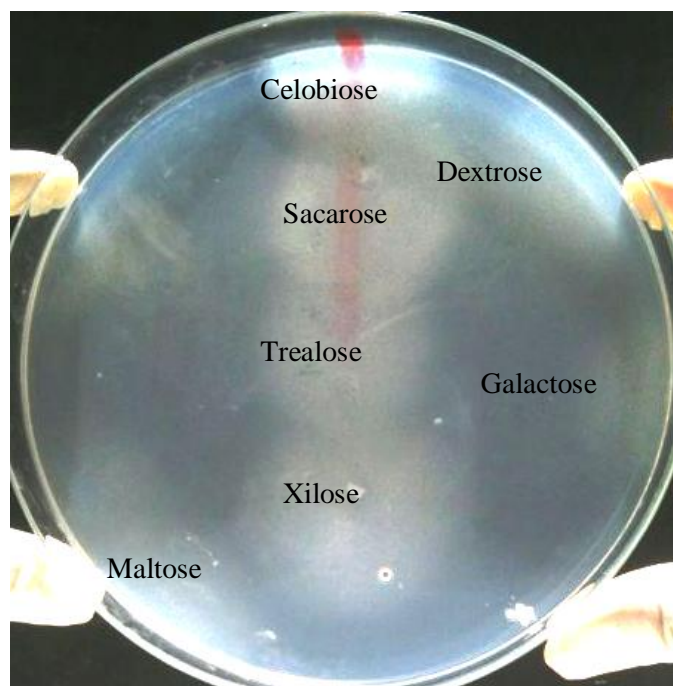
Em testes bioquímicos esta levedura é capaz de fermentar e assimilar glicose, galactose, sacarose, maltose e trealose, mas não a lactose ou rafinose. Isolados de *C. tropicalis* podem ainda não fermentar a sacarose e assimilar a celobiose, sendo essas características

variáveis dependendo da cepa (Figuras 4 e 5) (DE HOOG et al., 2000; NEGRI et al., 2012a) (Quadro 1).



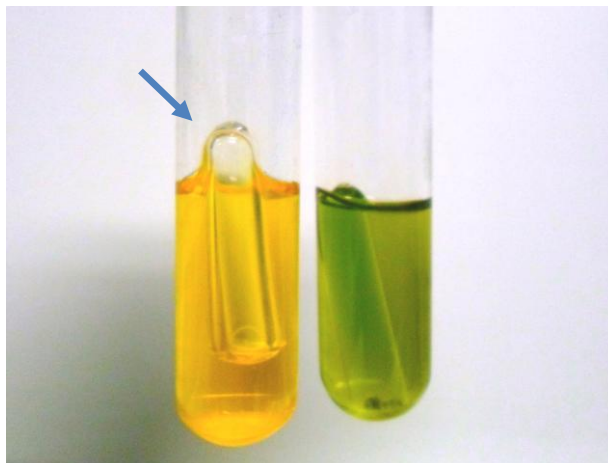
FONTE: CEMM, 2013.

Figura 3 - Microcultivo de *C. tropicalis* em ágar fubá acrescido de Tween 80. Na microscopia, observa-se a presença de pseudo-hifas apresentando blastoconídios ao longo de sua estrutura (aumento 400x).



FONTE: CEMM, 2013.

Figura 4 - Prova de assimilação de carboidratos de *C. tropicalis*. Observa-se a turvação do meio onde a levedura avaliada assimilou os açúcares.



FONTE: CEMM, 2013.

Figura 5 - Prova de fermentação de carboidratos de *Candida* spp. Observa-se a formação de bolha no interior do tubo de Durham (produção de gás), indicativo de fermentação positiva (seta).

Quadro 1 - Características morfológicas e bioquímicas de *C. tropicalis*.

Morfologia			Bioquímica										
TG	PS	CHROMAgar™	gli	gal	lac	mal	sac	mel	cel	tre	raf	U	N
-	+	Azul escuro	A+F+	A+F+	-	A+F+	A+F±	-	A±	A+F+	-	-	-

FONTE: Negri et al., 2012.

TG: tubo germinativo; PS: pseudo-hifa; gli: glicose; gal: galactose; lac: lactose; mal: maltose; sac: sacarose; mel: melibiose; cel: celobiose; tre: trealose; raf: rafinose; U: hidrólise da ureia (urease); N: assimilação de KOH₃; - negativo; + positivo; A+ assimilação positiva; A± assimilação variável; F+ fermentação positiva; F± fermentação variável.

Quanto à identificação molecular, métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real foram utilizados com sucesso na identificação de *C. tropicalis* provenientes de amostras clínicas. Todavia, estes métodos ainda não são padronizados ou prontamente disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos (NEGRI et al., 2012a). O número de cromossomos e o tamanho genômico não é conhecido precisamente, mas sabe-se que *C. tropicalis* apresenta aproximadamente 5-6 pares de cromossomos homólogos e um tamanho genômico de aproximadamente 30Mb (CHAI; DENNING; WARN, 2010).

C. tropicalis é considerada uma levedura oportunista que pode ser encontrada tanto no ambiente como em comensalismo com o ser humano (OKAWA; MIYAUCHI; KOBAYASHI, 2008), colonizando vários sítios anatômicos distintos, incluindo a pele, o trato

gastrointestinal e o trato geniturinário, podendo ser encontrado também no trato respiratório (NEGRI et al., 2012a).

Desde 1960, *C. tropicalis* é reportada como espécie causadora de candidíases invasivas graves. Infecções causadas por *C. tropicalis* podem ser adquiridas endogenamente, principal via de infecções, ou exogenamente, por meio do contato com pessoas ou fômites contaminados (NEGRI et al., 2012a). Infecções por *C. tropicalis* estão relacionadas com fatores predisponentes como leucemia aguda, neutropenia e terapia anti-neoplásica, podendo ser infecções superficiais e localizadas de mucosa vaginal, do trato urinário, e infecções invasivas e disseminadas (CHAI; DENNING; WARN, 2010).

C. tropicalis é considerada uma das espécies de *Candida* não-*albicans* mais frequente em infecções sanguíneas (candidemia) e do trato urinário (candidúria), sendo a primeira ou segunda espécie mais isolada (NUCCI; COLOMBO, 2006; DA SILVA et al., 2007; NUCCI et al., 2013; YISMAW et al., 2013), representando 3-66% das espécies de *Candida* isoladas de infecções de corrente sanguínea no mundo (CHAI; DENNING; WARN, 2010). Além disso, *C. tropicalis* demonstra ter mais sucesso na invasão da superfície de mucosas ou na colonização de cateteres intravasculares que as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* (CHEN et al., 2012), apresentando também a habilidade de disseminação rápida após a colonização em hospedeiros imunocompetentes, causando alta mortalidade (CHAI; DENNING; WARN, 2010).

Entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. tropicalis* vem sendo considerada a espécie mais frequente isolada de candidíases na região Ásia-Pacífico, Brasil e Europa (NEGRI et al., 2012a). Vários estudos mostram a frequência com que *C. tropicalis* é isolada de casos de candidíase no Brasil (NUCCI; COLOMBO, 2006; DA SILVA et al, 2007; DA COSTA et al, 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; NUCCI et al., 2013). Nos hospitais terciários brasileiros, *C. tropicalis* é apontada como a causa de 33-48% das infecções da corrente sanguínea por *Candida* (MORALEZ et al., 2013).

Em 1998, 53% dos casos de candidúria no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP, no Brasil, foram causados por *C. tropicalis* (OLIVEIRA; MAFFEI; MARTINEZ, 2001). Um estudo prospectivo realizado por Colombo et al. (2006) em onze centros médicos brasileiros mostrou que espécies de *Candida* não-*albicans* foram mais frequentemente isoladas (59%), sendo que *C. tropicalis* (21%), *C. parapsilosis* (21%) e *C. glabrata* (5%) foram as mais isoladas. Outros estudos realizados no Brasil também demonstram o frequente isolamento de *C. tropicalis* em infecções de corrente sanguínea e

urinária (DA SILVA et al., 2007; XAVIER et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; DE FREITAS et al., 2013).

Estudos realizados em camundongos não-imunocomprometidos mostraram que 60-70% dos isolados de *C. tropicalis* foram patogênicos e causaram infecções letais com 28 dias (BISTONI et al., 1984). Outro estudo mostrou a capacidade de *C. tropicalis* de invadir a mucosa do trato gastrointestinal de camundongos imunocomprometidos e se disseminar rapidamente 30 min após a inoculação no animal (DE REPENTIGNY; PHANEUF; MATHIEU, 1992). Esses modelos *in vivo* apresentam evidências experimentais mostrando a alta virulência de *C. tropicalis* (CHAI; DENNING; WARN, 2010).

C. tropicalis também já foi relatada como causa de infecções em diferentes espécies animais. *C. tropicalis* é uma das espécies de *Candida* frequentemente isoladas de mastite clínica e sub-clínica em bovinos (KRUKOWSKI et al., 2000; SANTOS; MARIN, 2005; ZARAGOZA et al., 2011; DWORECKA-KASZAK et al., 2012). *C. tropicalis* também foi relatada causando quadros diarréicos em bezerros (ELAD et al., 1998).

Pressler et al. (2003) isolaram espécies de *Candida* causando infecção urinária em cães e gatos, dentre as quais *C. tropicalis* foi uma das espécies isoladas. *C. tropicalis* também foi isolada de cães em quadro de cistite (OZAWA et al., 2005), da urina (OKABAYASHI et al., 2009) e em uma co-infecção cutânea causada por *Leishmania infantum* (MORETTI et al., 2006). Infecções por *C. tropicalis* em aves também já foram relatadas. Um estudo realizado por Kuttin et al. (1975) mostrou o estabelecimento de infecção por *C. tropicalis* no trato respiratório de perus que receberam água e alimentos contendo antibacterianos. Esses achados mostram a importância dessa espécie de levedura também na Medicina Veterinária, embora os relatos sejam escassos.

O desenvolvimento de candidíases invasivas por *C. tropicalis* está associada com uma elevada mortalidade quando comparada a outras espécies de *Candida* não-*albicans* (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; COLOMBO et al., 2006; NEGRI et al., 2012a). Essa propensão de disseminação e alta mortalidade de *C. tropicalis* pode estar relacionada com os fatores de virulência exibidos por esta espécie (KRCMERY; BARNES, 2002; NEGRI et al., 2010; NEGRI et al., 2012a).

1.3.1. Fatores de Virulência

Os fatores de virulência em espécies de *Candida* podem ser definidos como todas as características requeridas pelo micro-organismo para estabelecer a doença (YANG, 2003).

Candida pode expressar uma variedade de fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade (LIONAKIS; NETEA, 2013), entre esses fatores podemos citar a aderência à células do hospedeiro por meio de adesinas, transição morfológica, hidrofobicidade da superfície celular e secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases, lipases e proteases (NEGRI et al., 2010; DE LUCA et al., 2012; COSTA et al., 2013). Outro importante fator de virulência de espécies de *Candida* é a formação de biofilme, tanto em tecidos do hospedeiro como em dispositivos médicos intracorpóreos (NEGRI et al., 2012b; RAMAGE et al., 2012).

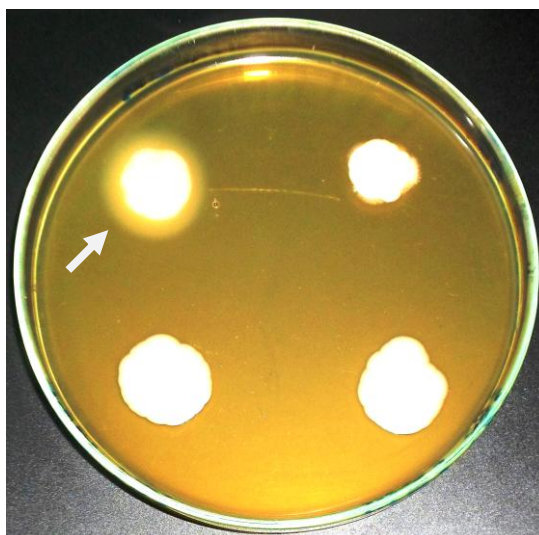
Vários mecanismos de patogenicidade já foram associados a *C. tropicalis*, como a adesão a diferentes superfícies, formação de biofilme, capacidade de disseminação, secreção de fator hemolítico e a produção de enzimas hidrolíticas (SILVA et al., 2012; FAVERO et al., 2011; NEGRI et al., 2012a; GALÁN-LADERO et al., 2013). Achados importantes indicam uma alta patogenicidade de *C. tropicalis* quando comparada a outras espécies de CNA. Porém, os mecanismos de patogenicidade de *C. tropicalis* não estão totalmente elucidados (NEGRI et al., 2012a). Entre as enzimas hidrolíticas produzidas por *Candida tropicalis* podemos citar as fosfolipases e as proteases.

As fosfolipases formam um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídios. Todas as fosfolipases tem como substrato moléculas de fosfolipídios, porém cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação éster específica (GHANNOUM, 2000). Em geral, as fosfolipases são classificadas em cinco subclasses: A (PLA), A2 (PLA2), B (PLB), C (PLC) e D (PLD), dependendo da ligação éster específica que a enzima tem como alvo (PARK; DO; JUNG, 2013).

Evidências indicam que fosfolipases podem contribuir para a penetração, injúria e lise às células do hospedeiro. A espécie *C. albicans* secreta variedades de fosfolipases B que estão relacionadas à virulência em modelos animais de candidíase (OKSUZ et al., 2007, GHANNOUM, 2000). A fosfolipase B é codificada por dois genes, *PLB1* e *PLB2*, dos quais o gene *PLB1* apresenta-se, até o momento, como o único fator importante que contribui para a atividade e virulência de fosfolipase em *C. albicans* (SAMARANAYAKE et al., 2005). A atividade das fosfolipases está provavelmente envolvida no processo de ruptura da membrana celular e invasão das células do hospedeiro, contribuindo para a penetração destes micro-organismos (GHANNOUM, 2000; PARK; DO; JUNG, 2013).

O método mais utilizado para a detecção de produção de fosfolipases é baseado no crescimento de leveduras em meio ágar Sabouraud dextrose acrescido de gema de ovo, uma rica fonte de fosfolipídios (Figura 6). Nos isolados positivos é possível observar a formação

de uma zona de precipitação densa ao redor da colônia, relacionada à quebra dos fosfolipídios em complexos de cálcio e ácidos graxos decorrente da ação enzimática (GHANNOUM, 2000; NEGRI et al., 2012a).



FONTE: CEMM, 2013.

Figura 6 - Avaliação da produção de fosfolipases extracelulares por cepas de *Candida* spp. em meio ágar gema de ovo. Observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca ao redor da colônia (seta), indicativa da produção da enzima.

Espécies de *Candida* não-*albicans* são capazes de secretar fosfolipases, mas essa produção é relativamente inferior quando comparada a *C. albicans* (OKSUZ et al., 2007; SILVA et al., 2012). *C. tropicalis* também apresenta redução na produção de fosfolipases extracelulares *in vitro* quando comparada a *C. albicans*, sendo essa produção altamente dependente da cepa (SILVA et al., 2012; NEGRI et al., 2012a). Pouco se sabe sobre a produção de fosfolipases por *C. tropicalis* quando comparada a *C. albicans*.

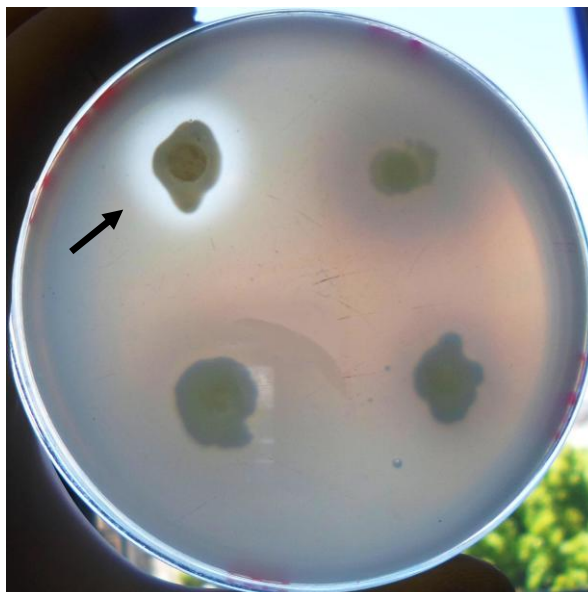
Outro importante fator de virulência de *Candida* é a produção das enzimas hidrolíticas denominadas proteases. As proteases são todas as enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas (CO-NH) das proteínas. Muitas espécies fúngicas secretam proteases quando crescidas em meio contendo proteína como fonte de nitrogênio (MONOD et al., 2002). Proteases são classificadas em dois grandes grupos dependendo do seu sítio de ação: exopeptidases e endopeptidases. Exopeptidases clivam a ligação peptídica no grupo amina (-NH₂) ou carboxila (-COOH) terminal da proteína, enquanto endopeptidases clivam ligações peptídicas dentro de uma cadeia polipeptídica (DOS SANTOS, 2011).

Baseado na natureza do grupo funcional do sítio ativo e o tipo de mecanismo enzimático, as proteases são divididas em oito tipos: asparagina, aspática, cisteína, glutâmica, metalo, serina, treonina e desconhecido. Alternativamente, todas as proteases podem ser classificadas em ácidas, alcalinas (básicas) e neutras, de acordo com o pH ótimo no qual são ativadas (YIKE, 2011).

Entre os potenciais fatores de virulência das espécies patogênicas de *Candida*, as proteinases aspáticas secretadas (Sap) têm sido objetivo de várias investigações (PARRA-ORTEGA et al., 2009). As proteases aspáticas contêm dois resíduos Asp que ativam a molécula de água que medeia o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica. São, em sua maioria, ativadas em pH ácido (YIKE, 2011). Saps podem degradar um grande número de substratos celulares, incluindo proteínas estruturais e aquelas relacionadas às defesas imunológicas, tais como IgG de cadeias pesadas, α 2-macroglobulina, proteína C3, β -lactoglobulina, lactoperoxidase, colágeno e fibronectina (PICHOVÁ et al., 2001)

Já foram identificados dez tipos diferentes de proteases aspáticas em *C. albicans* (Sap1-Sap10), quatro em *C. tropicalis* (Sapt1-Sapt4), oito em *C. dubliniensis* (Sapcd1-Sapcd4; Sapcd7-Sapcd10) e três em *C. parapsilosis* (Sapp1-Sapp3) (PARRA-ORTEGA et al., 2009). Os genes que codificam a produção de proteases aspáticas em *C. tropicalis* são designados *SAPT1* a *SAPT4* (SILVA et al., 2012). A observação da produção *in vitro* de proteases aspáticas por *C. tropicalis* é comumente feita com um meio contendo albumina sérica bovina (BSA) como fonte de nitrogênio (Figura 7) (NEGRI et al., 2012a).

Estudos nos quais foi investigado o papel dos genes *SAPT* em infecção por *C. tropicalis* em epitélio oral humano reconstituído mostraram que todos os isolados de *C. tropicalis* foram capazes de expressar *SAPT14* durante o processo de infecção. Entretanto, a alta capacidade de invadir e danificar tecidos dessa espécie parece não estar relacionada com a expressão do gene *SAPT* (SILVA et al., 2012).



FONTE: CEMM, 2013.

Figura 7 - Avaliação da produção de proteases extracelulares por cepas de *Candida* spp. em meio ágar BSA. Observa-se a formação de uma zona clarificada ao redor da colônia (seta), que indica a produção da enzima.

Além da produção de enzimas hidrolíticas, a capacidade de aderir e formar biofilmes em diferentes superfícies também é considerado um importante fator de virulência de *Candida*. Os biofilmes são comunidades microbianas que estão aderidas a uma superfície e envoltas em uma matriz extracelular polimérica, exibindo um fenótipo que é diferente das células planctônicas em relação à transcrição gênica, taxa de crescimento e resistência antifúngica. No meio ambiente, os micro-organismos são predominantemente encontrados na forma de biofilme em vez de sua forma planctônica (DONLAN, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; TOURNU; VAN DIJCK, 2012). Fatores que contribuem para a formação do biofilme são a quantidade de nutrientes, moléculas de *quorum-sensing* e o contato com superfícies (FANNING; MITCHELL, 2012).

As vantagens do biofilme para um micro-organismo incluem proteção contra o ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação da expressão gênica baseada na comunidade (RAMAGE et al., 2012). O material extracelular complexo que compõe a matriz do biofilme tem papel fundamental na defesa contra células fagocitárias, age como suporte na manutenção da integridade do biofilme e forma uma barreira que impede a difusão das substâncias tóxicas (NEGRI et al., 2012a). Células sésseis de biofilme apresentam uma aumentada resistência a agentes antimicrobianos, bem como proteção contra as defesas do hospedeiro (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006).

Acredita-se que mais de 65% das infecções adquiridas no ambiente hospitalar estão relacionadas a biofilmes (WILLIAMS et al., 2011).

Os biofilmes são a principal causa de infecções relacionadas a dispositivos médicos, sendo *Candida* as espécies fúngicas mais comumente isoladas dessas infecções. Já foram relatadas formações de biofilme em cateteres venosos centrais, cateteres urinários, dispositivos de diálise, aparelhos cardiovasculares, próteses de voz, implantes penianos, dentaduras e implantes oculares (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; ESTIVILL et al., 2011). Essas infecções associadas a implantes são inerentemente difíceis de tratar e podem requerer terapia antifúngica a longo-prazo e a remoção física do implante para controle da infecção (RAMAGE et al., 2012).

Cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* formadoras de biofilme estão associadas a uma alta taxa de mortalidade (ESTIVILL et al., 2011). *C. tropicalis* possui uma notável capacidade de aderir a superfícies abióticas, células humanas e tecidos (NEGRI et al., 2012a). Os isolados clínicos desta espécie são classificados como formadores prolíficos de biofilme, sendo seus biofilmes maduros consistidos de uma densa rede de leveduras e células filamentosas evidentes (SILVA et al., 2012).

Estudos realizados com *C. tropicalis* mostraram a capacidade desta espécie de formar biofilmes em materiais utilizados em dispositivos médicos, como PVC e poliuretano e células humanas (ESTIVILL et al., 2011; NEGRI et al., 2012b). Estudos realizados por Galán-Ladero et al. (2013) reportam que cepas de *C. tropicalis* que apresentaram maior porcentagem de filamentação e hidrofobicidade de superfície celular apresentaram maior capacidade de formação de biofilme.

Bizerra et al. (2008), estudaram o desenvolvimento, morfologia e sensibilidade a antifúngicos *in vitro* de biofilmes de *C. tropicalis*. O estudo mostrou que biofilmes maduros de *C. tropicalis* são constituídos de uma densa rede de células de leveduras e pseudo-hifas, além de apresentar alta resistência aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B. No mesmo estudo foi verificado que as células sésseis do biofilme apresentaram uma superexpressão dos genes *ERG11* e *MDR1*, responsáveis pela regulação da enzima lanosterol 14 α -demetilase e pela regulação de bomba de efluxo, respectivamente. Esses mecanismos podem contribuir para a resistência observada em biofilmes de *C. tropicalis*.

1.3.2. Resistência a Antifúngicos

A resistência microbiana refere-se a não-sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico em um teste de sensibilidade *in vitro*, no qual a concentração inibitória mínima (CIM) da droga excede o ponto de corte de sensibilidade daquele micro-organismo (KANAFANI; PERFECT, 2008). Embora as drogas antifúngicas usadas no tratamento clínico aparentam ser diversas e numerosas, são poucas as classes de antifúngicos atualmente disponíveis para o tratamento de infecções de mucosas ou sistêmicas por *Candida* spp. (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Os antifúngicos utilizados na terapêutica contemporânea podem ser divididos de acordo com o sítio de atuação na célula fúngica em: inibidores da síntese do ergosterol (azólicos, derivados morfolínicos e alilaminas); alteração da permeabilidade da membrana celular por ligação ao ergosterol (derivados poliênicos); inibidores da síntese da parede celular (equinocandinas, nicamicina); inibição da síntese de ácidos nucleicos (flucitosina) e; inibição da síntese dos microtúbulos (griseofulvina) (KATHIRAVAN et al., 2012).

Os azólicos, classe que inclui os imidazólicos (cetaconazol e miconazol) e os triazólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol), são drogas que exibem como mecanismo de ação a inibição da síntese do ergosterol, um importante esterol para a membrana celular fúngica, atuando diretamente contra a enzima lanosterol 14 α -demetilase, um citocromo P450 na via da biossíntese do ergosterol (BOSSCHE, 1997; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). São os antifúngicos mais utilizados na prática clínica, além de serem os mais estudados pela comunidade científica (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Desde o início da década de 1990 foi observado um aumento na resistência de isolados clínicos a drogas azólicas. Os mecanismos de resistência a derivados azólicos têm sido bem estudados em leveduras e podem ser divididos em quatro categorias: diminuição da afinidade pela molécula-alvo; aumento no número de cópias da molécula alvo; alteração na via da biossíntese do ergosterol após a ação dos azólicos e diminuição do acúmulo de azólicos no meio intracelular (KANAFANI; PERFECT, 2008; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Estudos realizados com espécies de *Candida* relacionadas a infecções humanas apontam um aumento na resistência desses micro-organismos aos derivados azólicos, sendo essa resistência relacionada principalmente ao agente triazólico fluconazol (COLOMBO et al., 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007; DA COSTA et al., 2009; PAM et al., 2012). O fluconazol é o antifúngico mais comumente utilizado tanto na profilaxia quanto na terapia

para combater candidemia (DA SILVA et al., 2013), o que pode estar relacionado ao aumento na resistência a esse fármaco.

Dados da literatura mostram também um aumento na resistência de isolados de *Candida* spp. de origem animal, seja esses isolados apresentando-se como comensais e parte da microbiota ou causando algum tipo de infecção no animal (BRITO et al., 2007; SIDRIM et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012; CASTELO-BRANCO et al., 2013; CORDEIRO et al., 2013). As estirpes de origem animal apresentam uma resistência elevada aos derivados azólicos, como fluconazol e itraconazol.

C. tropicalis foi considerada durante muito tempo uma espécie sensível ao fluconazol, sendo >95-98% das cepas sensíveis ao derivado azólico. Porém, nos últimos anos, houve um aumento da resistência a fluconazol por cepas de *C. tropicalis* em alguns centros onde foi observada resistência *in vivo* (falha terapêutica). Altos níveis de resistência ao itraconazol são raros, porém cepas apresentando resistência ao fluconazol requerem maiores concentrações inibitórias de itraconazol (CHAI; DENNING; WARN, 2010). Vários trabalhos mostram o aumento da resistência de *C. tropicalis* a drogas azólicas (DA COSTA et al., 2009; MENEZES; MENDES; CUNHA, 2009; KOTHAVADE et al., 2010; LI et al., 2013). Desenvolvimento de resistência ao fluconazol é particularmente observada em pacientes com aids, leucemia e tratamento intensivo. Por outro lado, resistência de *C. tropicalis* a anfotericina B é rara, sendo que poucas cepas demonstraram altos níveis de resistência a esse agente antifúngico (CHAI; DENNING; WARN, 2010).

Vandeputte et al. (2005) realizaram um estudo com *C. tropicalis* resistente a azólicos e apontaram a superexpressão do gene *CtERG11*, que codifica a lanosterol 14 α -demetilase, associada com uma mutação *missense* deste gene como possível responsável pela resistência adquirida a azólicos. Além disso, também foi descrito o desenvolvimento *in vitro* de resistência a fluconazol em *C. tropicalis* ligada a uma super-regulação de dois genes de bombas de fluxo de multidrogas, *CtMDR1* e *CtCDR1* (BARCHIESI et al., 2000).

Em um estudo do mecanismo de resistência a azólicos em isolados clínicos de *C. tropicalis* realizado por Jiang et al. (2013), ficou evidenciado um aumento na respiração celular nos isolados resistentes, porém não foi observada a superexpressão do gene mitocondrial *CYTb*, gene funcional da cadeia respiratória das mitocôndrias. Foi observado também superexpressão do gene *ERG11*, além de duas mutações *missense*, *Y132F* e *S154F*, porém não houve superexpressão dos genes *CDR1* e *MDR1*, demonstrando que a resistência a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* está relacionada principalmente a super-

regulações e mutações no gene *ERG11*. Apesar dos achados, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de resistência a azólicos em *C. tropicalis*.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Cepas de *Candida tropicalis* isoladas de animais apresentam resistência a antifúngicos de uso clínico?
2. Cepas de *Candida tropicalis* isoladas de animais produzem fatores de virulência de forma constitutiva?

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. Cepas de *Candida tropicalis* isoladas de animais apresentam resistência aos derivados azólicos e a anfotericina B.
2. Cepas de *Candida tropicalis* isoladas de animais produzem exoenzimas hidrolíticas e formam biofilmes *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotipicamente cepas de *Candida tropicalis* oriundas da microbiota de animais quanto a sensibilidade a antifúngicos de uso clínico e a produção de fatores de virulência.

4.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* das cepas de *Candida tropicalis* isoladas de diferentes espécies animais frente a anfotericina B e aos derivados azólicos fluconazol e itraconazol;
2. Avaliar a produção de fosfolipases e proteases pelas cepas de *Candida tropicalis* isoladas de diferentes espécies animais.
3. Avaliar a produção de biofilme das cepas de *Candida tropicalis* isoladas de diferentes espécies animais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

Esse estudo foi conduzido no Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM, Centro de Biomedicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC.

5.2 Micro-organismos estudados

Neste estudo, foi utilizado um total de 100 cepas de *C. tropicalis*. As cepas foram previamente isoladas de caprino (n=48), ovino (n=18), psitacídeos (arara-canidé, n=03; papagaio-verdadeiro, n=03; papagaio-do-mangue, n=02; periquito-da-caatinga, n=06), cetáceos (cachalote-anão, n=06), sirênios (peixe-boi-da-amazônia, n=03; peixe-boi-mainho, n=02), ema (n=06), cavalo (n=02) e camarão (n=01) (BRILHANTE et al., 2011; BRILHANTE et al., 2013; CORDEIRO et al., 2013). Os dados sobre as cepas estão descritos no Quadro 2. Todos os isolados analisados fazem parte da Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e encontravam-se estocados em solução salina a 4 °C. A identificação das cepas foi baseada nas seguintes características fenotípicas: teste da urease em ágar ureia de Christensen (Difco Laboratories, Inglaterra); características micromorfológicas em meio ágar fubá-Tween 80, assimilação de carbono, assimilação de nitrogênio e fermentação de carbono (DE HOOG, 2000). Os isolados foram recuperados do estoque e plaqueados em meio cromogênico (HiCrome *Candida* Differential Agar – HiMedia Laboratories, Índia) Para a avaliação da pureza e viabilidade. Colônias puras foram, então, transferidas para ágar batata dextrose e mantidas até o momento de uso.

5.3 Teste de sensibilidade

5.3.1 Drogas antifúngicas

As cepas de *C. tropicalis* foram testadas frente aos antifúngicos anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, USA), itraconazol (ITC) (Janssen Pharmaceutica, Bélgica) e fluconazol (FLC) (Pfizer Pharmaceuticals, USA). As soluções-estoque dos antifúngicos foram diluídas em DMSO a 100%, exceto para fluconazol em que foi utilizada água destilada estéril, conforme protocolo M27-A3 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2008).

Todas as drogas foram estocadas a -20 °C e diluídas no momento de uso em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morpholinepropanesulfonic (MOPS, Sigma Chemical Co.). Os antifúngicos foram testados nas concentrações preconizadas pelo documento citado anteriormente, com intervalos que variaram de 64 - 0,125 µg/mL para FLC e 16 - 0,0313 µg/mL para ITC e AMB.

Quadro 2 - Origem das cepas de *C. tropicalis* utilizadas neste estudo

Espécie	Sítio Anatômico	Isolados (n)	Total (n)
Caprino (<i>Capra aegragus hircus</i>)	cavidade nasal	23	48
	cavidade oral	21	
	cavidade retal	4	
Ovino (<i>Ovis ariesi</i>)	cavidade nasal	2	14
	cavidade oral	12	
	cavidade retal	4	
Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	cavidade oral	3	3
Arara (<i>Ara ararauna</i>)	inglúvio	2	3
	cloaca	1	
Papagaio-do-mangue (<i>Amazona amazonica</i>)	cavidade oral	1	2
	inglúvio	1	
Periquito-do-sertão (<i>Aratinga cactorum</i>)	cavidade oral	2	6
	papo	2	
	cloaca	2	
Ema (<i>Rhea americana</i>)	cavidade oral	1	6
	cloaca	5	
Cavalo (<i>Equus ferus caballus</i>)	cavidade nasal	2	2
Peixe-boi-da-Amazônia (<i>Trichechus inunguis</i>)	genital	1	3
	cavidade retal	1	
	pele	1	
Peixe-boi-marinho (<i>Trichechus manatus</i>)	cavidade nasal	1	2
	genital	1	
Cachalote-anão (<i>Kogia sima</i>)	espiráculo	2	6
	genital	2	
	cavidade oral	1	
	cavidade retal	1	
Camarão (<i>Macrobrachium amazonicum</i>)	trato digestivo	1	1
Total			100

5.3.2 Inóculo fúngico

Os inódulos de todas as cepas testadas foram preparados a partir de culturas de *C. tropicalis* previamente semeadas em ágar batata dextrose e incubadas por 24 horas a 35 °C. No preparo do inóculo, colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,9%) e a suspensão obtida foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluídas nas proporções 1:50 e 1:20 em meio RPMI para obtenção de um inóculo com concentração final de 0,5 a 2,5 x 10³ células/mL (CLSI, 2008).

5.3.3 Ensaio de microdiluição

O teste de sensibilidade foi realizado por meio da técnica de microdiluição em caldo de acordo com documento M27-A3 (CLSI, 2008). O teste foi realizado utilizando microplacas de 96 poços. Aliquotas de 100 µL do inóculo final foram adicionadas às placas já contendo 100 µL de RPMI-1640 suplementado das drogas, distribuídas em diluições seriadas. Como controle de crescimento de cada cepa, foram utilizados poços contendo o inóculo e o meio RPMI sem a adição de droga. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Todos os isolados foram testados em duplicata. Para a AMB, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como aquela capaz de inibir 100% do crescimento fúngico visível quando comparado ao controle sem tratamento; para ITC e FLC, CIM foi definido como a menor concentração capaz de reduzir em 50% o crescimento fúngico, quando comparado ao controle sem tratamento. (CLSI, 2008). As cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controle de qualidade em todos os testes. Isolados apresentando CIM >1,0 µg/mL, ≥1,0 µg/mL, and ≥ 8,0 µg/mL foram considerados resistentes à AMB, ITC e FLC, respectivamente (CLSI, 2008; CLSI, 2012).

5.4 Produção de fosfolipases

A produção de fosfolipases foi avaliada como descrito por Sidrim et al. (2010). O meio utilizado foi o ágar gema de ovo, contendo ágar Sabouraud dextrose 2% adicionado de 1 mol/L de cloreto de sódio, 0,05 mol/L de cloreto de cálcio e 8% de uma emulsão de gema de ovo estéril a 30%. O meio foi distribuído em placas de Petri de 90-mm estéreis e mantidas

sob refrigeração até momento de uso. As leveduras foram previamente crescidas em ágar batata dextrose por 24 h a 35 °C. Após esse período, o inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril, atingindo uma concentração final de 4 na escala de McFarland. 5 µL de cada inóculo foram pipetados em discos de papel filtro esterilizados de aproximadamente 5 mm, os quais foram depositados nas placas contendo o meio ágar gema de ovo. As placas foram, então, incubadas a 35 °C por 7 dias. A atividade enzimática (Pz) foi determinada calculando a razão entre o diâmetro da colônia fúngica e o diâmetro total, incluindo a colônia e a zona de precipitação. $Pz = 1$ indica que o isolado é negativo para a produção de fosfolipase; quando $1 > Pz \geq 0.64$, o isolado apresenta atividade positiva; e quando $Pz < 0.64$, o isolado é considerado fortemente positivo.

5.5 Produção de proteases

A produção de proteases foi avaliada como descrito por Aoki et al. (1994), com modificações. O meio utilizado foi o ágar albumina sérica bovina (BSA), composto de 2% de dextrose, 0,1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,25% de K_2HPO_4 , 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5% de ágar bacteriológico e 0,25% de albumina sérica bovina. Foram utilizados meios com diferentes valores de pH (3,5 e 5,0), ajustados. As leveduras foram previamente crescidas em caldo YEPD por 24 h a 35 °C. Após esse período, os tubos com crescimento em caldo foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril a uma concentração final de 5 na escala de McFarland. 10 µL de cada inóculo foram pipetados em discos de papel filtro esterilizados de aproximadamente 5 mm, os quais foram depositados nas placas contendo o meio ágar BSA. As placas foram incubadas a 35 °C por até 5 dias. A atividade enzimática (Pz) foi determinada calculando a razão entre o diâmetro da colônia fúngica e o diâmetro total, incluindo a colônia e a zona de precipitação. $Pz = 1$ indica que o isolado é negativo para a produção de protease, enquanto $Pz < 1$ indica que o isolado é positivo para a produção da enzima (VIDOTTO et al., 2004).

5.6 Formação de biofilme de *C. tropicalis*

Para o teste de formação do biofilme por capas de *C. tropicalis*, o inóculo foi preparado conforme protocolo previamente descrito por Chatzimoschou et al. (2011), com

modificações. Cepas de *C. tropicalis* (n=68), aleatoriamente escolhidas, foram cultivadas em ágar Sabouraud por 48 h a 30 °C. Posteriormente, as amostras foram transferidas para caldo Sabouraud e incubadas por 24 h a 30 °C, sob agitação constante de 150 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com PBS (tampão fosfato-salino) estéril. As células foram, então, ressuspendidas em meio RPMI e a suspensão foi ajustada até atingir a concentração 1×10^6 células/mL e 200 µL do inóculo foram transferidos para placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h sob agitação orbital de 150 rpm. Poços contendo apenas meio de cultura sem inóculo foram utilizados como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os poços lavados três vezes com PBS-*Tween* (0,05% de *Tween* 20 em PBS). Subsequentemente, os poços foram lavados com 100 µL de metanol 100% e o sobrenadante foi aspirado. Uma alíquota de 100 µL de cristal violeta a 0.3% foi adicionado em cada poço. Após 20 minutos a 25 °C, a solução corante foi aspirada e os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de água destilada estéril. Finalmente, 150 µL de uma solução de ácido acético a 33% foram adicionados aos poços corados e deixados por 30 segundos. Após esse tempo, o volume foi transferido para uma nova placa de 96 poços, a qual foi lida imediatamente utilizando um espectrofotômetro a 590 nm para obtenção dos valores de OD. Os valores de ponto de corte (OD_c) para o ensaio de formação do biofilme foi definido como três desvios padrões acima da média de OD₅₉₀ nm do controle negativo. Todas as cepas foram classificadas, de acordo com Stepanovic et al. (2000), com modificações, como não produtores de biofilme ($OD \leq OD_c$), produtores fracos ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), produtores moderados ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) e forte produtores ($4 \times OD_c < OD$).

5.7 Análise estatística

As características de sensibilidade a antimicrobianos e virulência entre cepas de diferentes grupos animais foram comparadas utilizando análise de variância *one-way* (ANOVA) e o pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados relativos às cepas isoladas de cavalo e camarão não foram representativos e, portanto, não foram incluídos na análise. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Teste de sensibilidade

No tocante ao teste de sensibilidade à antifúngicos, não foi observada resistência à AMB entre nenhum dos isolados estudados. Entretanto, resistência aos derivados azólicos foi detectada entre cepas isoladas de todos os grupos animais. 38/100 e 40/100 das cepas de *C. tropicalis* foram resistentes ao ITC e ao FLC, respectivamente. Resistência a ambos os derivados azólicos foi detectada em 34/100 isolados (Tabela 1).

Tabela 1. Sensibilidade antifúngica *in vitro* de cepas de *Candida tropicalis* isoladas de diferentes espécies animais.

Organismos (n)	Drogas	Resistência (n)	CIM (µg/ml)			
			MG	Variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Caprino (48)	AMB	0	0,577	0,062-1,0	0,5	1,0
	FLC	19	4,689	0,25-64,0	2,0	64,0
	ITC	20	0,445	0,031-16,0	0,187	16,0
Ovino (18)	AMB	0	0,481	0,25-1,0	0,5	1,0
	FLC	2	1,65	0,125-64,0	3,0	13,6
	ITC	2	0,081	0,031-16,0	0,031	16,0
Psitacádeo (14)	AMB	0	0,552	0,125-1,0	0,5	1,0
	FLC	9	10,25	0,5-64,0	12,0	64,0
	ITC	6	1,0	0,031-16,0	0,375	16,0
Ema (6)	AMB	0	0,445	0,25-0,5	*	*
	FLC	3	5,657	0,5-64,0	*	*
	ITC	2	0,5	0,031-16,0	*	*
Sirênio (5)	AMB	0	0,378	0,25-0,5	*	*
	FLC	2	6,063	0,5-64,0	*	*
	ITC	3	1,149	0,031-16,0	*	*
Cetáceo (6)	AMB	0	0,3536	0,125-1,0	*	*
	FLC	2	2,0	0,25-64,0	*	*
	ITC	2	0,28	0,031-16,0	*	*
Cavalo (2)	AMB	0	0,1767	0,125-0,25	*	*
	FLC	2	64,0	64,0	*	*
	ITC	2	16,0	16,0	*	*
Camarão (1)	AMB	0	*	0,5	*	*
	FLC	1	*	32,0	*	*
	ITC	1	*	16,0	*	*

ITC – itraconazol; FLC – fluconazol; AMB – anfotericina B; MG – media geométrica; * – valores não calculados,

6.2 Produção enzimática

No tocate a produção enzimática, 84 cepas foram positivas ($Pz < 1$) para a produção de proteases em meio ágar BSA com pH 5,0, enquanto 16 amostras foram negativas para a produção da enzima ($Pz = 1$). 20 cepas foram positivas ($Pz < 1$) para a produção de proteases em meio ágar BSA com pH 3,5, enquanto 30 isolados foram negativos ($Pz = 1$). No que diz respeito à produção de fosfolipases em meio ágar gema de ovo, 08 cepas foram consideradas positivas ($Pz < 1$), das quais 03 foram fortemente positivas ($Pz < 0.64$), enquanto 92 não apresentaram a produção de fosfoipases ($Pz = 1$). Os resultados relativos à produção enzimática pelas cepas de *C. tropicalis* estão apresentadas na Tabela 2.

6.3 Formação de biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado utilizando 68 isolados de *C. tropicalis*. 64 das cepas testadas foram capazes de formar biofilme *in vitro*. As cepas foram classificadas como forte produtoras de biofilme (43/68) ($OD > 4 \times OD_c$), moderadas produtoras (12/68) ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$), fracas produtoras (09/68) ($xOD_c < OD \leq 2 \times OD_c$) e não produtoras (04/68) ($OD \leq OD_c$). Os resultados referentes à produção de biofilme estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de fatores de virulência *in vitro* por cepas de *Candida tropicalis* isoladas de diferentes espécies animais.

Organismo (n)	Protease		Fosfolipase	Biofilme
	pH 5,0	pH 3,5		
Caprino (48)	+ (47/48) - (1/48)	+ (6/15) - (9/15)	++ (3/48) ± (1/48) - (44/48)	++ (12/27) ± (7/27) f (7/27) - (1/27)
Ovino (18)	+ (5/18) - (13/18)	+ (1/5) - (4/5)	± (4/18) - (14/18)	++ (2/7) ± (1/7) f (1/7) - (3/7)
Psitacídeos (14)	+ (14/14)	+ (1/11) - (10/11)	- (14/14)	++ (12/14) ± (2/14)
Ema (6)	+ (6/6)	+ (1/5) - (4/5)	- (6/6)	++ (6/6)
Sirênios (5)	+ (5/5)	+ (2/5) - (3/5)	- (5/5)	++ (4/5) f (1/5)
Cetáceos (6)	+ (6/6)	+ (6/6)	- (6/6)	++ (6/6)
Cavalo (2)	+ (1/2) - (1/2)	- (2/2)	- (2/2)	++ (1/2) ± (1/2)
Camarão (1)	- (1/1)	- (1/1)	- (1/1)	± (1/1)

++ - forte positivo; + - positivo; ± - moderado positivo; f - fraco positivo; - - negativo.

7. DISCUSSÃO

Animais podem atuar como reservatórios de leveduras e fungos leveduriformes patogênicos (PRADO et al., 2008; CORDEIRO et al., 2013). *C. tropicalis* é uma espécie de CNA frequentemente isolada de animais sadios como parte da sua microbiota (BRITO et al., 2009; BRILHANTE et al., 2010; CARREGARO et al., 2010; BRILHANTE et al., 2011), porém podem se tornar patógenos quando há alterações nas defesas do hospedeiro ou alterações no microambiente da pele (PRADO et al., 2008). Essa espécie pode apresentar um potencial maior para disseminação em pacientes neutropênicos do que *C. albicans* e outras espécies de CNA (NEGRI et al., 2012). Sob estas circunstâncias, esses animais podem apresentar algumas implicações na saúde humana. Por tanto, o estudo das características fenotípicas de cepas de *C. tropicalis* isoladas de animais torna-se relevante.

No presente estudo, no tocante a sensibilidade das cepas de *C. tropicalis* frente a antifúngicos clássicos, não foi observada resistência à AMB, mostrando, assim, que isolados de origem veterinária respondem a essa droga de maneira similar àquela observada em isolados de pacientes humanos (MENEZES et al., 2009; NEGRI et al., 2010; DA SILVA et al., 2013; DE FREITAS et al., 2013). A resistência à AMB em *C. tropicalis* é bastante rara, mas não impossível de ocorrer. Frequentemente, a resistência à AMB é causada por decréscimo na quantidade de ergosterol (alvo da droga) na membrana plasmática. Além disso, a resistência também pode ser causada por mudanças na estrutura molecular do lipídeo alvo, o que acarreta uma diminuição da capacidade de ligação da AMB à sua molécula alvo (DA COSTA et al., 2009).

A resistência de *C. tropicalis* a derivados azólicos encontrada neste estudo apresentou-se substancial. 38% e 40% dos isolados de *C. tropicalis* foram resistentes ao ITC e ao FLC, respectivamente. 34% dos isolados foram resistentes a ambos os azólicos azoles. Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado um aumento da resistência de *C. tropicalis* a derivados azólicos, tanto de cepas de origem veterinária como de isolados humanos (MENEZES et al., 2009; KOTHAVADE et al., 2010; LORD et al., 2010; BRILHANTE et al., 2013; LI et al., 2013).

A superexpressão do gene *CtERG11* associada com mutações missenses já foram descritas como mecanismos de resistência em isolados clínicos de *C. tropicalis* (VANDEPUTTE et al., 2005). Esse pode ser um dos mecanismos implicados na resistência de cepas de *C. tropicalis* isoladas de animais. Além disso, desenvolvimento *in vitro* de resistência ao FLC em *C. tropicalis* relacionada ao aumento da regulação de dois genes que

codificam bombas de efluxo multidrogas, *CtMDR1* e *CtCDR1*, já foi anteriormente descrito (BARCHIESI et al., 2000). A presença de bombas de efluxo pode representar um mecanismo de resistência importantes em isolados veterinários. Estudos posteriores analisando aspectos fenotípicos e genotípicos são necessários para melhor entendimento dos mecanismos de resistência que levam à redução da sensibilidade a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* origem veterinária.

As taxas de resistência a derivados azólicos em cepas de *C. tropicalis* isoladas de animais encontradas neste estudo foram maiores que as taxas de resistência encontradas em estudos com isolados humanos. (YANG et al., 2004; DA COSTA et al., 2009; NEGRI et al., 2012; DE FREITAS et al., 2013). Não se sabe ao certo quais motivos podem ter levado ao desenvolvimento de resistência em isolados de animais que nunca receberam tratamento antifúngico com derivados azólicos. É importante frisar que *C. tropicalis* é prevalente em solos enriquecidos e ambientes aquáticos (YANG et al., 2012). De acordo com Yang et al. (2012), o uso de compostos azólicos neste ambientes, principalmente compostos utilizados na prática agrícola, possivelmente seleciona organismos que exibem sensibilidade reduzida a drogas. Os animais podem entrar em contato com estes micro-organismos resistentes, os quais podem permanecer como parte de sua microbiota e, eventualmente, podem ser transmitidos por meio de contato direto ou fômites para o homem.

O estudo da atividade enzimática de cepas de *C. tropicalis* se torna relevante uma vez que tais fatores de virulência (fosfolipases e proteases) podem apresentar importante papel na invasão e persistência do micro-organismo patogênico nos tecidos do hospedeiro debilitado (PICHOVÁ et al., 2001; PARK et al., 2013) Isolados humanos de *C. tropicalis* de diferentes sítios anatômicos parecem apresentar habilidade reduzida para a produção de fosfolipases extracelulares *in vitro* quando comparado a cepas de *C. albicans*, quando empregada a metodologia utilizando crescimento das leveduras em ágar gema de ovo (DA COSTA et al., 2009; NEGRI et al., 2010; NEGRI et al., 2012). No caso presente, poucos isolados foram considerados positivos para a produção de fosfolipases. Os dados encontrados são similares a outros estudos, nos quais poucos ou nenhum isolados apresentaram a capacidade de produzir fosfolipases *in vitro* (KUMAR et al., 2009; BRILHANTE et al., 2013).

O método utilizado neste estudo para avaliar a presença das enzimas extracelulares (utilização de ágar gema de ovo) não apresenta grande acurácia, especialmente quando esta técnica é comparada com métodos moleculares que podem detectar expressão de genes relacionados à expressão dessas enzimas (NEGRI et al, 2010). Este fato pode explicar a

razão pela qual foram encontrados poucos isolados produtores de fosfolipase em nossa avaliação. Além disso, ensaios radiométricos e colorimétricos específicos podem ser utilizados para determinar a atividade enzimática de isolados que apresentam baixos níveis de fosfolipases extracelulares secretadas (GHANNOUM, 2000).

C. tropicalis apresenta atividade enzimática proteolítica *in vitro* em meio contendo BSA como fonte de nitrogênio (DA COSTA et al., 2009). Nossos dados revelaram que isolados de *C. tropicalis* de origem veterinária apresentam alta capacidade de produção de proteases secretadas em meio ágar BSA com pH 5,0, resultado esse superior aos encontrados para o meio ágar BSA com pH 3,5. Esses achados podem ser relacionados com o fato de que diferentes classes de proteases, e até mesmo proteases de uma mesma classe, apresentam diferente pH ótimo no qual essas enzimas são ativadas.

Kumar et al. (2009) detectaram que 100% das cepas foram capazes de produzir e secretar proteases, sendo esses micro-organismos isolados de pacientes com tuberculose pulmonar. Em oposição, outros autores encontraram que somente alguns isolados de *C. tropicalis* foram positivos para a produção enzimática de proteases quando comparados a cepas de *C. albicans* (GOKCE et al., 2007; DA COSTA et al., 2009; DA COSTA et al., 2011). Estudos moleculares deverão ser realizados para verificar quais são os tipos de proteases produzidas pelos isolados utilizados neste estudo.

A produção de biofilme é considerada um importante fator de virulência de espécies de *Candida* (WILLIAMS et al., 2011). Biofilmes são a principal causa de infecções relacionadas a dispositivos médicos implantados (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; ESTIVILL et al., 2011). Estas infecções associadas a implantes são inerentemente difíceis de tratar e podem requerer terapia antifúngica de longo prazo e remoção do implante para controle da infecção (RAMAGE et al., 2012). Dados da literatura mostram que *C. tropicalis* isolados de pacientes humanos apresentam uma notável capacidade de formação de biofilme, com taxas de produção geralmente atingindo 100% (NEGRI et al., 2010; ESTIVILL et al., 2011; GALÁN-LADERO et al., 2013).

No presente estudo, similares resultados foram encontrados, com 94,1% dos isolados capazes de formar biofilme *in vitro*. 63,2% das cepas de *C. tropicalis* testadas foram classificadas como fortes produtoras de biofilme e 17,6% e 13,3% das cepas avaliadas foram classificadas como moderadas e fracas produtoras de biofilme, respectivamente. Este resultado claramente demonstra que cepas de *C. tropicalis* isoladas de animais apresentam alta capacidade de adesão e formação de biofilme.

Os resultados obtidos mostram que cepas de *C. tropicalis* isoladas de diversas espécies animais apresentam elevadas taxas de resistência a derivados azólicos, tendo implicância no tratamento de infecções que possam acometer animais que passem por desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Além disso, a capacidade de produção de fatores de virulência, como fosfolipases, proteases e a habilidade de formação de biofilmes, implicam que estes micro-organismos apresentam ferramentas necessárias para invasão, implantação e persistência nos tecidos do hospedeiro que apresentar imunocomprometimento, tanto animais como seres humanos que estão diretamente envolvidos com esses animais.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com cepas de *C. tropicalis* isoladas de diferentes espécies animais apresentaram elevadas taxas de resistência aos derivados azólicos itraconazol e fluconazol. Além disso, foi observada uma elevada produção de biofilme, importante fator de virulência para o estabelecimento de infecções. Outros fatores de virulência estudados mostraram a capacidade de produção das enzimas fosfolipase e protease por cepas de *C. tropicalis* isoladas de animais. Esses resultados tornam-se pertinentes, mostrando um potencial risco á saúde animal, uma vez que essas leveduras podem sair do estado comensal e causar enfermidade em animais imunocomprometidos.

9 PERSPECTIVAS

Estudos deverão ser realizados para a análise dos mecanismos que levam a resistência aos derivados azólicos de cepas de *C. tropicalis* isoladas de animais, assim também como análise do potencial patogênico dessas cepas em modelos de infecção *in vivo*. Outros fatores de virulência dessas cepas, como produção de fatores hemolíticos e adesão à superfícies celulares, poderão ser avaliados para uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados por estas cepas para implantar a infecção.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; KATO, J.; NONIMIYA, K.; VIDOTTO, V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Micopathologia*, v. 128, p. 143-155, 1994.

BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; DI FRANCESCO, L. F. CASELLI, F., GIANNINI, D.; GIACOMETTI, A.; GAVAUDAN, S.; SCALISE, G. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 6, p. 1578-1584, 2000.

BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A.; CENCI, E.; SBARAGLIA, G.; PERITO, S.; CASSONE, A. A comparison of experimental pathogenicity of *Candida* species in cyclophosphamide-immunodepressed mice. *Sabouraudia*, v. 22, n. 5, p. 409-418, 1984.

BIZERRA, F. C.; NAKAMURA, C. V.; POERSCH, C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; QUESADA, R. M. B.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. F. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 442-450, 2008.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 12, p. 44-49, 1997.

BRADFORD, K.; MEINKOTH, J.; MCKEIMEN, K.; LOVE, B. *Candida* peritonitis in dogs: report of 5 cases. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 42, n. 2, p. 227-233, 2013.

BRILHANTE, R. S. N.; MAIA, D. C. B. S. C.; SOARES, G. D. P.; ASTETE-MEDRANO, D. J.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, p. 718-723, 2010.

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

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

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

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

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

BROWN, M. R.; THOMPSON, C. A.; MOHAMED, F. M. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, n. 3, p. 272-276, 2005.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. *BMC Research Notes*, v. 3, 2010.

CARREGARO, F. B.; SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; ARGENTA, J. S.; PEREIRA, D. I. B.; ZANETTE, R.; SANTURIO, J. M.; DE BARCELLOS, D. E. S. N.; FERREIRO, L. Fungal microbiota isolated from healthy pig skin. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. 2, p. 147-153, 2010.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical Mycology*, v. 51, n. 5, p. 555-560, 2013.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.

CHATZIMOUSCHOU, A.; KATRAGKOU, A.; SIMITSOPOULOU, M.; ANTACHOPOULOS, C.; GEORGIADOU, E.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Activities of triazole-echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 1968-1974, 2011.

CHEN, Y. V.; ROSLI, R.; FONG, S. H.; SIDIK, S. M.; PEI, C. P. Histopathological Characteristics of experimental *Candida tropicalis* induced acute systemic candidiasis in BALB/c mice. *International Journal of Zoological Research*, v. 8, n. 1, p. 12-22, 2012.

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

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Fourth Informational Supplement. *CLSI Document M27-S4*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

CONDE-ROSA, A.; AMADOR, R.; PEREZ-TORRES, D.; COLÓN, E.; SÁNCHEZ-RIVERA, C.; NIEVES-PLAZA, M.; GONZÁLEZ-RAMOS, M.; BERTRÁN-PASARELL, J. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, v. 29, n. 1, p. 26-29, 2010.

CORDEIRO, R. A.; BITTENCOURT, P. V.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SILVA, S. T. C.; ALENCAR, L. P.; SOUZA, E. R. Y.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Medical Mycology*, v. 51, n. 7, p. 731-736, 2013.

COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*, v. 4, n. 5, p. 391-399, 2013.

DA 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.

DA COSTA, K. R.; FERREIRA, J. C.; LAVRADOR, M. A.; BARUFFI, M. D.; CANDIDO, R. C. Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. *Mycoses*, v. 55, n. 3, e97-e105, 2011.

DA COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; SILVA, N. Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 29, n. 3, p. 239-243, 2012.

DA SILVA, C. R.; ANDRADE NETO, J. B.; SIDRIM, J. J. C.; ANGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B. C.; BRILHANTE, R. S. N.; MACEDO, D. S.; MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; NOBRE JÚNIOR, H. V. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 4., p. 1691-1700, 2013.

DA SILVA, E. H.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; AULER, M. E.; GIUDICE, M. C.; MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C. R. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, n. 6, p. 394-353, 2007.

DE FREITAS, A. R.; BAEZA, L. C.; FARIA, M. G. I.; DOTA, K. F. D.; MARTÍNEZ, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2013.

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

DE LUCA, C.; GUGLIELMINETTI, M.; FERRARIO, A.; CALABRÒ, M.; CASARI, E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiologica*, v. 35, p. 459-468, 2012.

DE REPENTIGNY, L.; PHANEUF, M.; MATHIEU, L. G. Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 11, p. 4907-4914, 1992.

DIEZMANN, S.; COX, C. J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T. G.; Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: A multigenic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5624-5635, 2004.

DOS SANTOS, A. L. S. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. *World Journal of Biological Chemistry*, v. 2, n. 3, p. 48-58, 2011.

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

DONLAN, R. M. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DOYLE, A.; LÓPEZ, A.; PACK, L.; MUCKLE, A. *Candida* osteomyelitis in a gelding. *Canadian Veterinary Journal*, v. 54, n. 2, p. 176-178, 2013.

DWORECKA-KASZAK, B.; KRUTKIEWICZ, A.; SZOPA, D.; KLECZKOWSKI, M.; BIEGANSKA, M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *The Scientific World Journal*, 2012, 2012.

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

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

ESTIVILL, D.; ARIAS, A.; TORRES-LANA, A.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARÉVALO, M. P. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*, v. 86, p. 238-242, 2011.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 4, 2012.

FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses*, v. 54, e816-e820, 2011.

FILLER, S. G. Insights from human studies into the host defense against candidiasis. *Cytokine*, v. 58, n. 1, p. 129-132, 2012.

FOURNIER, P.; SCHWEBEL, C.; MAUBON, D.; VESIN, A.; LEBEAU, B.; FORONI, L.; HAMIDFAR-ROY, R.; CORNET, M.; TIMSIT, J.; PELLOUX, H. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 12, p. 2880-2886, 2011.

HSU, L. Y.; WIJAYA, L., NG, E. S. T.; GOTUZZO, E. Tropical fungal infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.26, p. 497-512, 2012.

GALÁN-LADERO, M. A.; BLANCO-BLANCO, M. T.; HURTADO, C.; PÉREZ-GIRALDO, BLANCO, M. T. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. *Yeast*, 2013.

GARCÍA, M. E.; BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 17, p. S2-S7, 2000.

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

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, v. 164, n. 6, p. 265-269, 2007.

JIANG, C.; DONG, D.; YU, B.; C, G.; WANG, X.; JI, Y.; PENG, Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 778-785, 2013.

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

JUNIANITO, V.; IZAWA, T.; KUWAMURA, M.; YONEZAWA, M.; ITO, S.; YAMATE, J. Gastrointestinal candidiasis in an Aldabra giant tortoise (*Geochelone gigantea*). *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 71, n. 9, p. 1269-1272, 2009.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic; Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 5678-5698, 2012.

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

KRAMER, K.; HAIST, V.; ROTH, C.; SCHRÖDER, C.; SIESENHOP, U.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEN, P. Systemic *Candida albicans* infection in two alpacas (*Lama pacos*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 139, n. 2-3, p. 141-145, 2008.

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

KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJEWSKI, T.; ROZANSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, v. 150, n. 1, p. 5-7, 2000.

KUMAR, V. G.; LATHA, R.; VEDHAGIRI, K.; SATHIAMOORTHY, T.; JAYARANI, G.; SASIKALA, R.; SELVIN, J.; NATARAJASEENIVASAN, K. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 19, p. 3-10, 2009.

KUTTIN, E. S.; BEEMER, A. M.; ROCK, R. R.; PERLSTEIN, Z. *Candida tropicalis* infecting the respiratory tract of turkeys in Israel. *Avian Diseases*, v. 19, n. 2, p. 393-395, 1975.

LACHANCE, M. A.; BOEKHOUT T.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; KURTZMAN, C. P. *Candida* Berkhout (1923). In *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 5^a Ed. Londres: Elsevier, 2011.

LI, F.; WU, L.; CAO, B.; ZHANG, Y.; LI, X.; LIU, Y. Surveillance of the prevalence, antibiotic susceptibility, and genotypic characterization of invasive candidiasis in a teaching hospital in China between 2006 to 2011. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, 2013.

LINAK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. *Veterinary Ophthalmology*, v. 7, n. 3, p. 159-162, 2004.

LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLOS Pathogens*, v. 9, n. 1, 2013.

LORD, A. T. K.; MOHANDAS, K.; SOMANATH, S.; AMBU, S. Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 9, n. 11, 2010.

MA, C.; LI, F.; SHI, L.; HU, Y.; WANG, Y.; HUANG, M.; KONG, Q. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, 2013.

MATSUDA, K.; SAKAGUCHI, K.; KOBAYASHI, S.; TOMINAGA, M.; HIRAYAMA, K.; KADOSAWA, T.; TANIYAMA, H. Systemic candidiasis and mesenteric mast cell tumor with multiple metastases in a dog. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 71, n. 2, p. 229-232, 2009.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 3, p. 354-355, 2009.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. *Annals of Parasitology*, v. 59, n. 2, p. 57-66, 2013.

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

MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. *Medical Mycology*, 2013.

MORETTI, A.; BONCIO, L.; POSTERARO, B.; MECHELLI, L.; BALDUCCI, M.; FADDA, G.; LA SORDA, M.; DI CHIO, M.; GRELLONI, V.; AGNETTI, F. Co-cutaneous infection in a dog: PCR-reverse identification of *Candida tropicalis* on skin biopsy. *Journal of Medical Mycology*, v. 16, n. 1, p. 30-36, 2006.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 301-309, 2004.

NARDONI, S.; PAPINI, R.; MARCUCCI, G. M.; MANCIANTI, F. Survey on the fungal flora of the cloaca of healthy pet reptiles. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 159, n. 3, p. 159-165, 2008.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J. OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*, v. 169, p. 175-182, 2010.

NEGRI, M.; BOTELHO, C.; SILVA, S.; LOPES, L. M. R. H.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, p. 1270-1275, 2011.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology; Infectious Diseases*, v. 31, p. 1399-1412, 2012a.

NEGRI, M.; SILVA, S.; BREDÁ, D.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA R. *Candida tropicalis* biofilms: Effect on urinary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 53, p. 95-99, 2012b.

NEPPELENBROEK, K. H.; SEÓ, R. S.; URBAN, V. M.; SILVA, S.; DOVIGO, L. N.; JORGE, J. H.; CAMPANHA, N. H. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases*, v. 2013, 2013.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 58, p 77-82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. A. L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLOS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.

OZAWA, H.; OKABAYASHI, K., KANO, R.; WATARI, T.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia*, v. 160, n. 2, p. 159-162, 2005.

OKAWA, Y.; MIYAUCHI, M.; KOBAYASHI, H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 8, p. 1507-1510, 2008.

OKABAYASHI, K.; IMAJI, M.; OSUMI, T.; MURAKAMI, Y.; MARUYAMA, H.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; WATANABE, T. Antifungal activity of itraconazole and voriconazole against clinical isolates obtained from animals with mycoses. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 50, n. 2, p. 91-94, 2009.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 60, n. 5, p. 280-283, 2007.

OLIVEIRA, R. D. R.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 47, n. 3, p. 231-235, 2001.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLA, F. T.; SMITH, S. I. Fluconazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Lagos Nigeria. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, v. 3, n. 1, p. 84-90, 2012.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Micobiology*, v. 41, n. 2, p. 67-72, 2013.

PARRA-ORTEGA, B.; CRUZ-TORRES, H.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 505-512, 2009.

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, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

PICHOVÁ, I.; PAVLÍČKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJŠÍ, E.; HRUŠKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; WEBER, J. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, n. 9, p. 2669-2677, 2001.

PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, p. 197-202, 2008.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L.; LANE, I. F.; COWGILL, L. D.; DYE, J. A. *Candida* spp. urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 39, n. 3, p. 263-270, 2003.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 979-986, 2006.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, J.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, 2012.

RAMANA, K. V.; KANDI, S.; BHARATKUMAR, V.; SHARADA, C. V.; RAO, R.; MANI, R.; RAO, S. D. Invasive fungal infections: a comprehensive review. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, v. 1, n. 4, p. 64-69, 2013.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, v.11, n. 4, p. 275-288, 2011.

ROZANSKI, P.; SLASKA, B.; ROZANSKA, D. Prevalence of yeasts in English full blood mares. *Mycopathologia*, v. 175, p. 339-344, 2013.

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

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

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*, v. 47, p. 681-689, 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, p. 288-305, 2012.

SMEEKENS, S. P.; VAN DE VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; NETEA, M. G. Genetic susceptibility to *Candida* infections. *EMBO Molecular Medicine*, v. 5, p. 805-813, 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.

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

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

TAKAHASHI, H.; UEDA, K.; ITANO, E. N.; YANAGISAWA, M.; MURATA, Y.; MURATA, M.; YAGUCHI, T.; MURAKAMI, M.; KAMEI, K.; INOMATA, T.; MIYAHARA, H.; SANO, A.; UCHIDA, S. *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an aquarium. *Veterinary Medicine International*, v. 2010, 2010.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. *Candida* biofilms and the host: Models and new concepts for eradication. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, 2012.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 11, p. 4608-4615, 2005.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, 2012.

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

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.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

WILLIAMS, D. W.; KURIYAMA T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M. A. O. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, v. 55, p. 250-265, 2011.

WROBEL, L.; WHITTINGTON, J. K.; PUJOL, C.; OH, S. H.; RUIZ, M. O.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SOLL, D. R.; HOYER, L. L. Molecular phylogenetic analysis of a geographically and temporally matched set of *Candida albicans* isolates from humans and nonmigratory wildlife in Central Illinois. *Eukaryotic Cell*, v. 7, n. 9, p. 1475-1486, 2008.

XAVIER, P. C. N.; CHANG, M. R.; NUNES, M. O.; PALHARES, D. B.; SILVA, R. A.; BONFIM, G. F.; ALMEIDA JÚNIOR, N. F. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 5, p. 458-463, 2008.

YANG, Y. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 36, p. 223-228, 2003.

YANG, Y. L.; HO, Y. A.; CHENG, H. H.; HO, M.; LO, H. J. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 25, n. 1, p. 60-64, 2004.

YANG, Y. L.; LIN, C. C.; CHANG, T. P.; LAUDERDALE, T. L.; CHEN, H. T.; LEE, C. F.; HSIEH, C. W.; CHEN, P. C.; LO, H. J. Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. *PLOS One*, v. 7, n. 4, e34609, 2012.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia*, v. 171, p. 299-323, 2011.

YISMAW, G.; ASRAT, D.; WOLDEAMANUEL, Y.; UNAKAL, C. Prevalence of candiduria in diabetic patients attending Gondar University Hospital, Gondar, Ethiopia. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, v. 7, n. 2, p. 102-107, 2013.

ZARAGOSA, C. S.; OLIVARES, R. A.; WATTY, A. E.; MOCTEZUMA, A. L.; TANACA, L. V. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 28, n. 2, p. 79-82, 2011.

APÊNDICE

Apêndice A – Tabela 1 – Distribuição das cepas de *C. tropicalis* por espécie animal, expressão de fatores de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica.

Cepa	Origem	Produção de protease (pH 5,0)	Produção de protease (pH 3,5)	Produção de fosfolipase	Produção de biofilme	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
						AMB	ITC	FLC
3C9SOL	Caprino	+	-	-	*	0,0625	0,125	0,5
4C10SNA	Caprino	+	+	-	Forte	1	8 ^R	64 ^R
4C10SOA2	Caprino	+	*	-	Moderado	0,5	0,03125	0,5
4C11SNA	Caprino	+	-	-	Moderado	1	16 ^R	64 ^R
4C12SNA	Caprino	+	*	-	Forte	1	1 ^R	1
4C12SRA	Caprino	+	*	-	*	1	1 ^R	8 ^R
4C13SNA	Caprino	+	+	++	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
4C13SOA	Caprino	-	*	-	Fraco	1	0,125	16 ^R
4C15SOA1	Caprino	+	*	-	*	1	0,03125	0,5
4C16SNA	Caprino	+	*	-	Moderado	0,5	0,03125	2
4C16SOA	Caprino	+	*	-	*	1	0,03125	1
4C17SNA	Caprino	+	+	-	Fraco	0,5	0,125	2
4C17SOA	Caprino	+	*	-	Fraco	1	4 ^R	16 ^R
4C18SNA	Caprino	+	*	-	Moderado	0,5	0,03125	1
4C19SNA	Caprino	+	*	-	Fraco	1	0,125	2
4C19SOA	Caprino	+	-	-	*	0,25	0,0625	0,5
4C20SNA	Caprino	+	*	-	*	0,5	0,125	4
4C20SOA	Caprino	+	*	-	*	0,25	0,0625	1
4C21SNA	Caprino	+	-	-	Forte	1	0,0625	0,25
4C21SOA	Caprino	+	*	-	*	0,25	0,0625	0,5
4C22SNA	Caprino	+	+	-	Forte	1	0,5	64 ^R
4C22SOA	Caprino	+	*	-	Moderado	0,5	16 ^R	4
4C23SNA	Caprino	+	+	+	Forte	0,5	2 ^R	64 ^R
4C23SOA	Caprino	+	*	++	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
4C24SNA	Caprino	+	-	-	Não produtor	0,5	0,125	2
4C24SOA	Caprino	+	*	-	*	1	1 ^R	32 ^R
4C25SNA	Caprino	+	*	-	*	0,25	0,03125	1
4C25SOA	Caprino	+	-	-	Forte	1	16 ^R	64 ^R
4C26SNA	Caprino	+	*	-	*	0,25	0,125	2
4C27SNA	Caprino	+	*	-	*	1	0,03125	0,5
4C27SOA	Caprino	+	-	-	*	0,25	0,0625	1
4C27SRA	Caprino	+	*	-	Forte	1	1 ^R	8 ^R
4C29SNA	Caprino	+	*	-	Moderado	1	1 ^R	64 ^R
4C29SOA	Caprino	+	*	-	*	0,5	0,5	1
4C2SOA	Caprino	+	-	-	*	0,5	1 ^R	64 ^R
4C30SNA	Caprino	+	*	-	*	1	0,25	1
4C30SOA	Caprino	+	*	-	Fraco	0,5	0,03125	0,5
4C3SNA	Caprino	+	*	-	Fraco	0,5	1 ^R	4
4C3SOA	Caprino	+	+	-	Forte	0,25	16 ^R	64 ^R
4C3SRA	Caprino	+	*	-	*	0,25	16 ^R	64 ^R
4C4SNB	Caprino	+	*	-	*	0,5	0,03125	2
4C4SOA	Caprino	+	*	-	Forte	1	16 ^R	64 ^R
4C6SNB	Caprino	+	*	-	*	0,5	0,0625	1
4C6SRA	Caprino	+	*	-	Moderado	1	0,5	1
4C7SNA	Caprino	+	*	-	*	1	16 ^R	64 ^R
4C7SOA	Caprino	+	*	-	*	0,5	0,125	1
4C8SNA	Caprino	+	*	-	Fraco	1	0,0625	2
4C8SOA	Caprino	+	-	++	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
1O2SOA	Ovino	+	*	-	*	0,5	0,5	64 ^R
1O5SOR	Ovino	+	*	-	*	0,25	0,125	0,5
5O9SOL	Ovino	-	*	-	*	1	0,03125	4
6O10SOA1	Ovino	+	*	-	Moderado	0,25	0,25	4
6O2SNA	Ovino	-	+	+	Fraco	0,5	0,03125	4
6O2SOA	Ovino	-	*	-	*	0,5	0,03125	4
6O3SOA	Ovino	+	*	-	*	0,25	0,03125	0,5
6O4SOA	Ovino	-	+	-	Forte	0,5	0,03125	0,125
6O5SOA	Ovino	-	*	-	*	0,5	0,03125	0,125
6O5SRA1	Ovino	-	*	-	Não produtor	0,25	0,03125	2
6O6SNA	Ovino	-	*	-	*	0,5	0,03125	4

Tabela 1 – Distribuição das cepas de *C. tropicalis* por espécie animal, expressão de fatores de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica. (Continuação)

Cepa	Origem	Produção de protease (pH 5,0)	Produção de protease (pH 3,5)	Produção de fosfolipase	Produção de biofilme	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
						AMB	ITC	FLC
6O6SOA1	Ovino	-	*	+	*	0,5	0,03125	4
6O6SRA	Ovino	-	-	-	*	0,5	0,03125	2
6O7SOA	Ovino	-	*	+	Não produtor	1	16 ^R	2
6O7SRA	Ovino	-	+	-	Forte	0,5	0,03125	0,125
6O8SOA	Ovino	-	*	-	*	1	0,03125	4
6O9SOB2	Ovino	+	*	-	*	0,5	0,03125	0,125
6O9SRA	Ovino	-	+	+	Não produtor	0,5	16 ^R	8 ^R
PAP BICO AZUL	Psitacédeo	+	-	-	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
PVO30-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	0,5	0,03125	0,5
PVO34-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	1	16 ^R	64 ^R
AP9-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	1	16 ^R	64 ^R
AC2-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	1	0,125	1
AP7-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	1	16 ^R	64 ^R
PMO4-A	Psitacédeo	+	+	-	Forte	0,125	0,03125	0,5
PMP5-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	1	16 ^R	64 ^R
PSO16-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	0,25	0,25	8 ^R
PSC16-A	Psitacédeo	+	*	-	Moderado	1	0,25	16 ^R
PSP17-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	0,25	0,125	8 ^R
PSC18-A	Psitacédeo	+	-	-	Forte	0,5	0,5	4
PSO35-A	Psitacédeo	+	*	-	Forte	0,5	16 ^R	32 ^R
PSP39-A	Psitacédeo	+	*	-	Moderado	0,5	0,125	4
1C	Ema	+	*	-	Forte	0,5	0,0625	0,5
4BMA	Ema	+	-	-	Forte	0,5	0,5	32 ^R
4CV	Ema	+	-	-	Forte	0,25	0,03125	0,5
7CTA	Ema	+	-	-	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
9CPL	Ema	+	-	-	Forte	0,5	0,0625	1
29CMA	Ema	+	+	-	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
14G1	Sirênio	+	-	-	Forte	0,5	8 ^R	64 ^R
14R1	Sirênio	+	+	-	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
31P1	Sirênio	+	-	-	Fraco	0,25	0,5	2
57N	Sirênio	+	+	-	Forte	0,5	0,03125	0,5
59G	Sirênio	+	-	-	Forte	0,125	1 ^R	2
556E	Cetáceo	+	+	-	Forte	0,25	16 ^R	8 ^R
556G	Cetáceo	+	+	-	Forte	0,5	16 ^R	64 ^R
586E	Cetáceo	+	+	-	Forte	0,25	0,03125	0,5
586G	Cetáceo	+	+	-	Forte	0,125	0,03125	0,125
586O	Cetáceo	+	+	-	Forte	0,5	0,03125	2
586R	Cetáceo	+	+	-	Forte	1	0,0625	0,5
3NA	Cavalo	-	-	-	Forte	0,125	16 ^R	64 ^R
18NA	Cavalo	+	-	-	Moderado	0,25	16 ^R	64 ^R
TDN 34L	Camarão	-	-	-	Moderado	0,5	16 ^R	32 ^R

ITC – itraconazol; FLC – fluconazol; AMB – anfotericina B; + – positivo; ++ – fortemente positivo; - – negativo; ^R – resistência ao antifúngico; * – teste não realizado



Original Paper

Candida tropicalis isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors

Rossana de Aguiar **Cordeiro**^{1,2}, Jonathas Sales de **Oliveira**¹, Débora de Souza Collares Maia **Castelo-Branco**¹, Carlos Eduardo Cordeiro **Teixeira**¹, Francisca Jakelyne de Farias **Marques**¹, Paula Vago **Bittencourt**^{1,2}, Vitor Luz **Carvalho**¹, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes **Bandeira**^{1,3}, Raimunda Sâmia Nogueira **Brilhante**¹, José Luciano Bezerra **Moreira**¹, Waldemiro de Aquino **Pereira-Neto**¹, José Júlio Costa **Sidrim**¹ and Marcos Fábio Gadelha **Rocha**^{1,2}

¹Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil, ²School of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil and ³School of Medicine, Christus College - UNICHRISTUS, Fortaleza, Ceará, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Rossana De Aguiar Cordeiro, Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil. Tel: +55 85 33668594; E-mail: rossanacordeiro@ufc.br

Received 26 June 2014; Revised 2 October 2014; Accepted 16 October 2014

Abstract

Candida tropicalis has been associated with Invasive candidiasis, being the first or second most common non-*Candida albicans* *Candida* species isolated in humans with candidemia and candiduria, as well as being frequently isolated from healthy animals. This study aimed to characterize *C. tropicalis* isolates ($n = 64$) obtained from several animal species regarding antifungal susceptibility and production of virulence factors. The isolates were obtained from the microbiota of healthy animals (goats, $n = 25$; sheep, $n = 6$; psittacines, $n = 14$; rheas, $n = 6$; horses, $n = 2$; sirenians, $n = 5$; shrimp, $n = 1$), as well as from aquatic mammals found dead in the environment (cetaceans, $n = 5$). The isolates were subjected to *in vitro* susceptibility testing by broth microdilution according to the CLSI M27-A3 protocol against amphotericin B, caspofungin, itraconazole, and fluconazole. We also evaluated the virulence attributes, such as proteases and phospholipases, as well as biofilm formation. Resistance to itraconazole ($n = 29$) and fluconazole ($n = 30$) was detected among isolates from every source; resistance to both azoles was detected in 24 isolates, but none of them were resistant to amphotericin B and caspofungin. Protease production was detected in the majority of the isolates ($n = 59$), but phospholipase was produced by only a few of them ($n = 6$). The isolates showed different patterns in

ANEXO

I. MEIOS DE CULTURA

1 Ágar gema de ovo

Água destilada 276 mL

Ágar Sabouraud 2% 14,1 g

Cloreto de sódio (NaCl) 16,1 g

Cloreto de cálcio(CaCl₂) 0,2g

Emulsão de gema de ovo 30% 24 mL

Emulsão de gema de ovo:

Água destilada 21 mL

Gema de ovo 9 mL

Dissolver o Ágar Sabouraud 2%, o NaCl e o CaCl₂ em 276 mL de água destilada. Autocalvar o meio, por 15 minutos, a 121 °C e resfriar até 50°C. Acrescentar 24 mL da emulsão de gema de ovo e homogeneizar o meio. Distribuir imediatamente em placas de Petri estéreis.

2 Ágar albumina sérica bovina (BSA)

Água destilada 150 mL

Dextrose 4 g

Cloreto de sódio (NaCl) 1 g

Fosfato dipotássico (K₂HPO₄) 0,5 g

Sulfato de magnésio (MgSO₄ 7H₂O) 0,04 g

Extrato de levedura 0,2 g

Ágar bacteriológico 3 g

Solução de albumina sérica bovina:

Água destilada 50 mL

Albumina sérica bovina 0,5 g

Dissolver a dextrose, o NaCl, o extrato de levedura, o K_2HPO_4 0,5 g e o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em 150 mL de água destilada e ajustar o pH desejado utilizando HCl. Adicionar o agar bacteriológico e autoclavar o meio, por 15 minutos, a 121 °C e resfriar até 50°C. Acrescentar 50 mL da solução de albumina bovina previamente esterilizada por filtração e homogeneizar o meio. Distribuir imediatamente em placas de Petri estéreis.

II. SOLUÇÕES

1 Tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 0,05% de Tween 20

Cloreto de sódio - NaCl 8 g

Cloreto de potássio - KCl 0,2 g

Fosfato de sódio dibásico - Na_2HPO_4 1,44 g

Fosfato de potássio monobásico - KH_2PO_4 0,24 g

Água deionizada 800 mL

Tween 20 500 µL

Água destilada 1000 mL

Dissolver todos os sais em 800 mL de água deionizada. Ajustar o pH para 7,4 utilizando solução de ácido clorídrico 1 mol/L e acrescentar 500 µL de Tween 20, em seguida completar para 1000 mL com água destilada.

2 Solução de cristal violeta 0,3%

Cristal Violeta em pó 2 g

Álcool etílico 95% 20 mL

Oxalato de amônio 0,8 g

Água destilada 80 mL

Água destilada estéril 8,5 mL

Solução A: dissolver 2 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico 95%

Solução B: dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada

Misturar as soluções A e B para o preparo da solução-mãe de cristal violeta a 2%. Esterilizar por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Para o preparo de 10 mL da solução de cristal violeta a 0,3%, adicionar 1,5 mL da solução-mãe em 8,5 mL de água destilada estéril.

2.3 Solução de ácido acético 33%

Água deionizada 67 mL

Ácido acético P.A. 33 mL

Adicionar 33 mL de ácido acético em 67 mL de água deionizada.