

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA – PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

DISSERTAÇÃO

Fatores de virulência *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de cães

Clara de Almeida Mendes

2021



UFRRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA –
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**FATORES DE VIRULÊNCIA *IN VITRO* DE LEVEDURAS ISOLADAS
DA CAVIDADE ORAL DE CÃES**

CLARA DE ALMEIDA MENDES

Sob a orientação do Professor
Francisco de Assis Baroni

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia Animal

Seropédica, RJ
Junho de 2021

M538f

Mendes, Clara de Almeida, 1994-
Fatores de virulência in vitro de leveduras
isoladas da cavidade oral de cães / Clara de Almeida
Mendes. - Seropédica, 2021.
79 f.

Orientador: Francisco de Assis Baroni.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas),
2021.

1. Microbiota oral canina. 2. Periodontopatias. 3.
Competição microbiológica. 4. Infecções fúngicas. I.
Baroni, Francisco de Assis, 1958-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária
(Patologia e Ciências Clínicas) III. Título.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA –
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

CLARA DE ALMEIDA MENDES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/06/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Francisco de Assis Baroni (Ph. D) - UFRRJ
(Orientador)

Claudete Rodrigues Paula (Ph. D) - USP

Rinaldo Ferreira Gandra (Ph. D) - UNIOESTE

DEDICATÓRIA

*A todos que valorizam e vivem a ciência,
tão negligenciada nos tempos sombrios
que vivemos.*

*Aos animais que contribuíram para que
essa pesquisa pudesse acontecer e a todos
os outros que já passaram pela minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe, que sempre priorizou a educação na minha vida. Você é o colo para recarregar minha energia e a força para enfrentar qualquer batalha. Agradeço por apoiar minhas decisões e acreditar em todas elas.

Gratidão por toda minha família, sempre acolhedora e a base que formou grande parte dos valores que tenho na vida. Vocês são meu exemplo e a certeza que, por mais longe que eu vá, sempre terei para onde voltar.

Agradecimentos especiais a todos os meus amigos, que acreditam que sempre posso mais. Vocês me motivam e me dão forças para que eu esteja sempre em busca dos meus objetivos. Obrigada por tornarem o caminho mais leve e por terem os abraços que preciso.

Agradeço ao meu orientador, Francisco de Assis Baroni, por compartilhar seus conhecimentos durante os anos que convivemos e pelo tempo dedicado à pesquisa.

Ao meu colega de laboratório, que se tornou um amigo para a vida, Mário Mendes Bonci, muito obrigada por compartilhar experiências e cooperar com o trabalho.

Ao professor Celso Barbosa, por gentilmente se dispor a me ajudar com a estatística do projeto.

A Deus, por me proteger e me acompanhar em todos os passos.

Obrigada!

RESUMO

MENDES, Clara de Almeida. **Fatores de virulência *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de cães.** 2021. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Dentre as enfermidades infecciosas, no cão, as periodontopatias são as mais recorrentes, sendo descritas principalmente pelo acometimento por agentes bacterianos. Diversos estudos têm abordado os componentes bacterianos da cavidade oral do cão, porém, o mesmo não é visto para leveduras, mesmo já descritas como parte da microbiota oral, podendo promover distúrbios primários ou estabelecer desafios secundários. Sabe-se que as afecções orais refletem no estado geral do animal com diversas consequências, como dificuldade de alimentação e possibilidade de infecções ascendentes, evoluindo para um quadro sistêmico. Ademais, o aumento da proximidade dos cães com os humanos torna mais frequente a ocorrência de ferimentos por mordedura, sendo a identificação dos componentes da cavidade oral do cão importante para a elucidação de infecções dessa origem. A manifestação de infecções fúngicas depende de diversos fatores, tais como o desequilíbrio microbiológico e consecutiva diminuição da atividade competidora dos micro-organismos comensais, além de fatores de imunossupressão. A necessidade de elucidar os patógenos envolvidos nos distúrbios da microbiota oral do cão é crescente. A fim de ampliar conhecimentos, foram coletadas amostras de saliva em diferentes sítios da cavidade oral de cães, utilizando-se escovas dentárias previamente depositadas em tubos com salina estéril para posterior processamento e isolamento das amostras. Este estudo buscou a identificação de componentes leveduriformes da cavidade oral hígida e lesionada de cães e a avaliação dos fatores de virulência *in vitro* desses componentes, que foram submetidos aos testes de protease, fosfolipase e DNase. Objetivou-se, além da contribuição para o bem-estar animal e saúde pública, a identificação de leveduras componentes da cavidade oral de cães, comparação da microbiota oral hígida e lesionada, avaliação da virulência *in vitro* dos isolados e auxílio no tratamento clínico terapêutico de afecções dessa origem. Para isso, o presente trabalho contou com amostras de 54 cães para o experimento, sendo 27 deles sem lesões na cavidade oral, pertencendo ao grupo 1 e 27 com lesões na cavidade oral, pertencendo ao grupo 2. Foram isoladas e identificadas 68 amostras com leveduras, compostas por 33 do grupo 1 (48,53%) e 35 do grupo 2 (51,47%), divididas em *Malassezia pachydermatis* (n= 24 / 35,29%), *Geotrichum* spp. (n= 11 / 16,18%), *Candida glabrata* (n= 6 / 8,82%), Complexo *Candida albicans* (n= 5 / 7,35%), *Rhodotorula* spp. (n = 5 / 7,35%), *Candida lusitaniae* (n= 4 / 5,88%), *Candida krusei* (n= 4 / 5,88%), *Candida tropicalis* (n= 3 / 4,41%), *Candida famata* (n= 2 / 2,94%), leveduras negras (n= 2 / 2,94%) e *Trichosporon* spp. (n = 2 / 2,94%). Posteriormente, 48 dessas amostras foram avaliadas quanto aos fatores de virulência, sendo 87,5% (42/48) das cepas capazes de produzir protease, 50% (24/48) das cepas com atividade enzimática de fosfolipase e 72,92% (35/48) produtoras de DNase. Não houve diferença significativa estatisticamente na produção de protease, fosfolipase e DNase entre os grupos de cães sem lesões e com lesões na cavidade oral.

Palavras-chave: infecções fúngicas, periodontopatias, competição microbiológica

ABSTRACT

MENDES, Clara de Almeida. ***In vitro* virulence factors of yeasts isolated from the oral cavity of dogs**. 2021. 78f. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Periodontopathies are the most recurrent infectious diseases in dogs, being mainly described by the involvement of bacterial agents. Several studies have addressed the bacterial components of the dog's oral cavity. However, the same is not seen for yeasts, even though they are already described as part of the oral microbiota, which may promote primary disorders or establish secondary conditions. It is known that the animal's general condition can have several consequences as a result of oral affections, such as feeding difficulties and the possibility of ascending infections, with possible systemic aggravation. Furthermore, the closer contact between dogs and humans makes the occurrence of bite wounds more frequent, which increases the importance of knowing the microorganisms present in the dog's oral cavity to elucidate infections of this origin. Fungal infection manifestation depends on several factors, including immunosuppression conditions and microbiological imbalance with a consecutive decrease in the competitive activity of commensal microorganisms. The need to elucidate the pathogens involved in oral microbiota disorders in dogs is raising. To improve knowledge in this area, saliva samples were collected from different sites in the oral cavity of dogs, using toothbrushes previously deposited in tubes with sterile saline for further processing and isolation of microorganisms. This study sought to identify yeast components from the healthy and injured oral cavity of dogs and to evaluate *in vitro* virulence factors (protease, phospholipase, and DNase) of these unicellular microorganisms. The study aimed to, in addition to contributing to animal welfare and public health, the identification of yeast components of the oral cavity of dogs, comparison of healthy and injured oral microbiota, *in vitro* virulence evaluation of the isolates, and knowledge support in the therapeutic clinical treatment of affections of that origin. For this, the present work counted on samples of 54 dogs, 27 of them without lesions in the oral cavity, belonging to Group 1, and 27 with lesions in the oral cavity, belonging to Group 2. A total of 68 samples with yeasts were obtained, composed of 33 yeasts from Group 1 (48.53%) and 35 from Group 2 (51.47%). Those were identified as *Malassezia pachydermatis* (n= 24 / 35,29%), *Geotrichum* spp. (n= 11/ 16,18%), *Candida glabrata* (n= 6 / 8,82%), Complexo *Candida albicans* (n= 5 / 7,35%), *Rhodotorula* spp. (n = 5 / 7,35%), *Candida lusitaniae* (n= 4 / 5,88%), *Candida krusei* (n= 4 / 5,88%), *Candida tropicalis* (n= 3 / 4,41%), *Candida famata* (n= 2 / 2,94%), leveduras negras (n= 2 / 2,94%) e *Trichosporon* spp. (n = 2 / 2,94%). Subsequently, 48 of these isolates were evaluated for virulence factors, being 87.5% (42/48) protease producers, 50% (24/48) of the strains with phospholipase enzymatic activity, and 72.92% (35/48) DNase producers. There was no statistically significant difference in the production of protease, phospholipase, and DNase between the groups of dogs without lesions and with lesions in the oral cavity.

Key words: fungal infections, periodontitis, microbiological competition

LISTA DE ABREVIÇÕES

UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;
n	Número;
SDA	Sabouraud Dextrose Agar;
°C	Graus Celsius;
pH	Potencial Hidrogeniônico;
µm	Micrometro;
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida;
%	Porcentagem;
NAC	<i>Candida Não-albicans</i> ;
®	Marca registrada;
PCR	Polimerase Chain Reaction;
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina;
CRE	<i>Enterobacteriaceae</i> Resistente à Carbapenem;
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight;
MLST	Multilocus Sequence Typing;
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA;
GMX	Glucuronoxilomanano;
MEA	Malt Extract Agar;
CAPD	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua;
Var.	Variedade;
DRC	Doença Renal Crônica;
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina;
FELV	Vírus da Leucemia Felina;
mL	Mililitro;
mm	Milímetro;
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio;
KOH	Hidróxido de Potássio;
Pz	Atividade enzimática;
HCl	Ácido clorídrico;
SRD	Sem Raça Definida;
AmStaff	American Staffordshire Terrier;
BOG	Bacteria Overgrowth;
MOG	Malassezia Overgrowth;
DPS	Desvio portossistêmico;
UFC	Unidade Formadora de Colônia;
INC	Incontáveis;
q.s.p.	Quantidade suficiente para.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade enzimática, adaptada de Price et al. (1982) por Ishida et al. (2012).	27
Tabela 2. Detalhes da origem das amostras clínicas e classificação por grupo (continua).	30
Tabela 3. Micro-organismos isolados através de amostras de saliva de cães com e sem lesões na cavidade oral (continua).	32
Tabela 4. Contagem por unidade colonial das amostras nas diferentes diluições realizadas, contáveis abaixo de 300 UFC, sendo acima disso consideradas incontáveis/INC (continua).	36
Tabela 5. Atividade enzimática da protease produzida pelas amostras (continua).	38
Tabela 6. Atividade enzimática da fosfolipase produzida pelas amostras (continua).	39
Tabela 7. Atividade enzimática da DNase produzida pelas amostras (continua).	40
Tabela 8. Comparação de produção dos fatores de virulência entre as espécies de <i>Candida albicans</i> e NAC.	47
Tabela 9. Ordem decrescente das amostras com expressão de atividade de protease comparadas entre todas as leveduras que apresentaram atividade dessa enzima.	48
Tabela 10. Ordem decrescente das amostras com expressão de atividade de fosfolipase comparadas entre todas as leveduras que apresentaram atividade dessa enzima (continua).	48
Tabela 11. Ordem decrescente das amostras com expressão de atividade de DNase comparadas entre todas as leveduras que apresentaram atividade dessa enzima.	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (a e b) – cães do grupo 1, sem lesões na cavidade oral; (c e d) – cães do grupo 2. 19
O cão da imagem (c) apresenta cálculo dentário, sangramento e formação sólida tumoral em gengiva. Já o cão da imagem (d) apresenta cálculo dentário, tecido de necrose em gengiva e fístula.
- Figura 2.** Placa de Petri apresentando crescimento colonial com características macromorfológicas de levedura; marcações indicativas da contagem manual das colônias. 20
- Figura 3.** Macromorfologia observada em levedura negra isolada. 20
- Figura 4.** (a) – Levedura negra em microscopia direta com clarificante, aumento de 400x; 21
(b) – *Malassezia pachydermatis* em microscopia direta com lactofenol azul de algodão, aumento de 1000x.
- Figura 5.** Placas de Petri com amostra negativa e positivas em diferentes escalas de 21
revelação do pH.
- Figura 6.** Formação de clamidoconídio por levedura do gênero *Candida* spp., aumento de 22
400x.
- Figura 7.** Tubo germinativo – filamento fino e cilíndrico, originado de um blastoconídio. 22
Observar que não há zona de constrição ao longo de sua extensão.
- Figura 8.** Presença de halo opaco, indicando capacidade de assimilação da fonte de número 23
3, correspondente à sacarose.
- Figura 9.** Evidência de testes positivos para fermentação, apresentando diferentes graus de 24
formação de gás em tubo de Durhan invertido.
- Figura 10.** *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente, 24
representadas no meio cromogênico.
- Figura 11.** Presença de zona de degradação proteica em torno de uma colônia de *Candida* 25
spp.
- Figura 12.** Halo de precipitação de CaCl₂ em amostra de *Rhodotorula* spp. 26
- Figura 13.** Halo de degradação após adição de acidificante indicando positividade do teste. 26
- Figura 14.** Médias das produções enzimáticas nos diferentes grupos (P>0,05). 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Fungos Leveduriformes	2
2.1.1 <i>Candida</i> spp.	2
2.1.2 <i>Malassezia</i> spp.	6
2.1.3 <i>Trichosporon</i> spp.	8
2.1.4 <i>Geotrichum</i> spp.	9
2.1.5 Leveduras negras.....	9
2.1.6 <i>Rhodotorula</i> spp.	11
2.2 Afecções da Cavidade Oral e Leveduras Associadas	13
2.3 Acidentes de Mordedura e Lambedura	15
2.4 Fatores de Virulência Fúngicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Fluxograma do Delineamento Experimental	17
3.2 Fase Pré-analítica	18
3.2.1 Obtenção de amostras	18
3.3 Isolamento de Cepas Clínicas	19
3.4 Identificação Morfológica das Cepas.....	20
3.6 Testes de Identificação.....	21
3.6.1 Urease.....	21
3.6.2 Cultivo em ágar arroz.....	22
3.6.3 Cultivo em soro sanguíneo.....	22
3.6.4 Auxanograma	23
3.6.5 Zimograma	23
3.6.6 CHROMagar® <i>Candida</i>	24
3.7 Manutenção das Amostras	24
3.8 Avaliação <i>In Vitro</i> de Fatores de Virulência.....	25
3.8.1 Protease	25
3.8.2 Fosfolipase	25
3.8.3 DNase.....	26
3.9 Determinação da Atividade Enzimática.....	27
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	50

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8 ANEXOS	62
Anexo A – Termo de consentimento para coleta de amostra no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ	62
Anexo B – Termo de consentimento para coleta de amostra na Clínica Veterinária Vetmaster, Seropédica-RJ.	63
Anexo C – Termo de consentimento para coleta de amostra na Clínica Emporium Veterinária, Itaguaí-RJ.	63
Anexo D – Modelo do termo de consentimento assinado pelo tutor para coleta de amostra do seu cão.	64
Anexo E – Meios de Cultura e Soluções.....	64
Anexo F – Assinaturas digitais (SIGAA)	66

1 INTRODUÇÃO

A saúde da cavidade oral dos animais de companhia vem ganhando importância no decorrer dos anos, principalmente devido ao contato mais próximo destes animais com seus tutores. Por conta dessa maior proximidade, acidentes de mordeduras e lambeduras de feridas são mais possíveis de ocorrer, tanto em outros animais quanto em humanos, sendo importante o conhecimento dos micro-organismos que podem ser transferidos para infecções dessa origem.

O acometimento da cavidade oral reflete no estado geral do animal, pois o desconforto causado pelas afecções diminui o interesse pela alimentação, levando a consecutiva perda de peso, com outras consequências. As lesões representam também solução de continuidade para infecções ascendentes da gengiva para a corrente sanguínea, podendo disseminar.

A participação de bactérias nas afecções orais é bastante estudada, mas os estudos sobre a participação de leveduras são escassos. Um dos fatores que incidem sobre a proliferação fúngica é a diminuição da competitividade microbiológica, fato recorrente na atualidade devido ao uso indiscriminado de antibióticos, que diminuem a concentração bacteriana.

Além do desequilíbrio microbiológico causado pela prescrição indiscriminada de antibióticos ser algo corriqueiro, na clínica veterinária lidamos rotineiramente com casos relacionados às deficiências imunológicas. Os animais com comprometimento do sistema imunológico são mais susceptíveis às enfermidades infecciosas como a proliferação fúngica, com consequentes danos à saúde do animal.

Considerando-se a existência de poucos estudos sobre a microbiota oral do cão e com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre esses componentes, neste projeto objetivou-se isolar e identificar espécimes leveduriformes da cavidade oral de cães, comparar a microbiota de cães sem afecções orais e com lesões e verificar e comparar *in vitro* a virulência de cada um dos isolados.

O conhecimento desses micro-organismos é fundamental para que o clínico veterinário possa distinguir as afecções devidas ao exacerbamento proliferativo comensal daquelas que são decorrentes da presença de leveduras patogênicas não pertinentes ao sítio oral. A identificação dos fatores de virulência auxiliará na elucidação da capacidade patogênica das leveduras que transitam na microbiota oral canina e a avaliação do potencial de contaminação de seus tutores.

Além disso, permitirá verificar os possíveis patógenos envolvidos em infecções causadas por mordeduras ou lambeduras em feridas já existentes, pela elucidação das leveduras pertencentes ao sítio oral na presença de lesões ou na higidez, garantindo suporte clínico auxiliar para o diagnóstico e tratamento.

1.1 Objetivos

- Isolamento e identificação de leveduras pertencentes à cavidade oral saudável e lesionada de cães;
- Comparação das leveduras encontradas na cavidade oral de cães com e sem lesões;
- Verificação e comparação *in vitro* dos fatores de virulência das leveduras isoladas;
- Propiciar, através dos resultados obtidos, suporte clínico auxiliar para o diagnóstico e tratamento de infecções decorrentes de acidentes de mordedura e lambedura de feridas preexistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos Leveduriformes

As leveduras pertencem ao reino Fungi, são eucarióticas, unicelulares, apresentando-se em estados vegetativos que se reproduzem predominantemente por brotamento ou fissão, resultando no crescimento, que é composto principalmente de células únicas. São organismos que degradam matéria orgânica e assumem diversas formas e funções na natureza, como o estabelecimento de relações mútuas com outros organismos, competição, parasitismo e patogenicidade. A nível celular, os fungos estão mais relacionados aos humanos do que as bactérias (KURTZMAN et al., 2011; CIUREA et al., 2020).

A propagação de doenças fúngicas está sendo intensificada pela atividade humana, modificando os ambientes naturais e criando oportunidades de evolução. Dentre as doenças infecciosas existentes, infecções fúngicas foram amplamente negligenciadas, embora sejam infecções onipresentes (JUNIOR et al., 2020).

O isolamento de amostras associadas a indivíduos de sangue quente deve ser feito convencionalmente em meio SDA e incubadas em temperaturas em torno de 30-37 °C. Os meios utilizados podem conter adição de antibióticos, porém, as leveduras geralmente são capazes de se desenvolver em níveis de pH e atividades de água que reduzem ou inibem o crescimento bacteriano. Macroscopicamente, as leveduras apresentam textura mucóide, fluida ou viscosa, butírica, friável ou membranosa, podendo ter superfície brilhante ou opaca, lisa, áspera, setorizada, com dobras, estriada ou algodonosa e com cores distintas, variando entre tonalidades de amarelo a laranja e vermelho (KURTZMAN et al., 2011).

As amostras clínicas demoram em média 48h para crescimento, salvo algumas exceções. Para a identificação assertiva são utilizados métodos baseados na morfologia do crescimento, em testes bioquímicos e, cada vez mais, métodos moleculares. A identificação correta é importante devido ao fato das infecções fúngicas representarem uma ameaça constante e crescente à saúde humana, pelo surgimento de novas espécies como agentes causadores de doenças e ao incremento da resistência aos antifúngicos (AGARWAL, 2011; KURTZMAN et al., 2011; GAVIRIA e MONTES, 2020).

2.1.1 *Candida* spp.

O gênero *Candida* inclui cerca de 150 espécies capazes de causar infecções em humanos, sendo diversas delas endossimbiontes, causando infecções principalmente em hospedeiros imunossuprimidos. Algumas espécies deste gênero existem em relação comensal com o trato gastrointestinal, urogenital, tecidos mucocutâneos, cavidade oral e pele, podendo levar a lesões locais ou à distância (KURTZMAN et al., 2011; CIUREA, 2020).

Candida spp. compreende um grupo fúngico extremamente heterogêneo, que macroscopicamente possui colônias que podem ser lisas, brilhantes ou secas, enrugadas e opacas. Sob condições padrão com nutrientes ideais, a levedura cresce em fase logarítmica, microscopicamente representado por células em brotamento (blastoconídios), de formato esférico a oval e aproximadamente 2-5 x 3-7 µm de tamanho e paredes finas. Certas espécies apresentam diferentes tipos de crescimento: filamentosos, como hifas verdadeiras ou, mais frequentemente, pseudo-hifas (KURTZMAN et al., 2011; SILVA et al., 2012).

A distinção entre hifas e pseudo-hifas está relacionada a maneira como são formadas. As pseudo-hifas são formadas a partir de células de levedura ou hifas por brotamento, quando o novo crescimento permanece ligado à célula mãe e se alonga, resultando em filamentos com

constricções nas junções “célula-célula”, não havendo septos. Em comparação, as hifas verdadeiras são formadas a partir de células de levedura ou mesmo como ramos de hifas existentes, iniciado por uma projeção de tubo germinativo, que é um filamento fino sem constrição no ponto de origem celular, que se alonga e, então, se ramifica com septos definidos, que dividem as hifas em unidades fúngicas septadas (KURTZMAN et al., 2011; SILVA et al., 2012).

A formação de ramificações está diretamente ligada a patogenicidade das espécies de *Candida* spp., mediada por fatores de virulência que interagem com as células hospedeiras, estimulam a resposta imune e, conseqüentemente, geram danos celulares e alterações homeostáticas. A ocorrência da doença requer, primeiramente, a fixação às células do hospedeiro, seguida da invasão do tecido. Ao formar redes intracelulares complexas, as leveduras deste gênero tornam-se não apenas mais refratárias às terapias antifúngicas, mas também mais sujeitas a causar doenças (SALES, 2019; CIUREA, 2020).

A adaptabilidade que permite rápida resposta a situações de estresse e outras peculiaridades apresentadas pelas diferentes espécies de *Candida* spp., do ponto de vista epidemiológico e terapêutico, justifica a necessidade de identificar as leveduras ao nível de espécie, sendo fundamental para permitir a melhor conduta terapêutica a ser instituída no paciente infectado (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; CIUREA, 2020).

A doença sistêmica com risco de vida por *Candida* spp. é a quarta infecção nosocomial mais comum em humanos, ocorrente na corrente sanguínea, afetando pessoas em quimioterapia, que estejam se recuperando de procedimentos cirúrgicos ou grandes queimaduras, receptores de transplantes e pacientes com AIDS. A taxa bruta de mortalidade associada a essas infecções é alta, variando de 46% a 75%, e as estimativas sugerem que pelo menos 400.000 infecções com risco de vida ocorrem anualmente (AMES et al., 2017).

As infecções invasivas por *Candida albicans* ainda predominam, embora a incidência por NAC esteja se tornando cada vez mais frequente. *Candida albicans* é uma levedura com potencial patogênico conhecido, sendo as infecções dessa espécie geralmente de origem endógena, mas podendo ocorrer disseminações de paciente para paciente. Dependendo do estado fisiológico do hospedeiro, as cepas variam sua virulência e o equilíbrio entre colonização transitória, comensal ou parasitismo (KURTZMAN e FELL, 1998; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; AMES et al., 2017; CIUREA, 2020).

A patogenicidade de *C. albicans* está relacionada ao seu dimorfismo, sua significativa termotolerância e sua expressão de fatores de virulência como aderência a diferentes mucosas e epitélios ou superfícies abióticas, morfogênese (transição levedura-hifas) e secreção de enzimas hidrolíticas como proteases, DNases e fosfolipases. Tais fatores auxiliam na invasão tissular do hospedeiro e manutenção da infecção (ARITA et al., 2020).

Esta levedura está entre as espécies capazes de formar pseudomicélio e tubo germinativo, sendo as cepas de *C. albicans* incapazes de formar filamento consideradas avirulentas em modelos animais de candidíase sistêmica. Ademais, *C. albicans* produz clamidoconídios, esporos assexuados de parede espessa, podendo estar em posições como a intercalar em hifas, ao longo das laterais (sésseis) ou na sua extremidade (terminais), adaptados para a manutenção da vitalidade celular em períodos de dormência, sendo mais bem observado em culturas pobres nutricionalmente, como o Ágar arroz. Outro aspecto a ser analisado é o crescimento em CHROMagar® *Candida*, onde apresenta colônia azul-esverdeada (KURTZMAN e FELL, 1998; WINN JR et al., 2001; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; SILVA et al., 2012; ARITA et al., 2020).

Atualmente, alguns autores consideram a classificação por complexo *C. albicans*, composto pelas espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. africana*. Apesar do alto grau de semelhança genética com *C. albicans*, *C. africana* mostra características fenotípicas distintas,

podendo ser diferenciada por CHROMagar® com a produção de colônias verdes turquesa menores e mais profundas do que *C. albicans*. A correlação entre essas espécies ocorre por conta das inúmeras semelhanças morfológicas e bioquímicas que apresentam, sendo melhor diferenciadas geneticamente, através de técnicas moleculares como o PCR (HANA et al., 2020).

C. dubliniensis é morfológicamente e bioquimicamente semelhante à *C. albicans*, sendo formadoras de tubo germinativo e clamidoconídios. A distinção ocorre por meio de métodos moleculares ou quando o isolamento é feito a 45 °C, pois assim *C. dubliniensis* não forma colônia e *C. albicans* cursa normalmente com o seu crescimento. Além disso, possui capacidade de assimilar α -Metil-D-Glucosídeo, Lactato ou Xilose. As semelhanças entre essas duas espécies dificultam a diferenciação e podem levar a resultados que subestimam sua prevalência (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; KURTZMAN et al., 2011; HANA et al., 2020; JUNIOR et al., 2020).

Fungemias com ou sem complicações devido a espécies de NAC também são preocupantes, pela virulência, pela imunossupressão do hospedeiro e, também, devido à resistência apresentada aos antifúngicos disponíveis. Diversos estudos consideram algumas espécies de NAC menos virulentas *in vitro* e em modelos animais. No entanto, podem apresentar capacidade de causar infecções graves em humanos, podendo evoluir para o óbito, quando comparadas com a virulência de *C. albicans* (KRCMERY e BARNES, 2002).

Espécies de NAC estão emergindo como colonizadores e patógenos, sendo as mais comumente isoladas em hemoculturas *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Em conjunto, essas espécies apresentam cerca de metade de todos os isolados de *Candida* spp., embora existam outras espécies que estão emergindo nos últimos anos (KRCMERY e BARNES, 2002; AMES et al., 2017; CIUREA, 2020).

Geneticamente *C. tropicalis* é a levedura do gênero com a maior similaridade com *C. albicans*. Achados importantes apontam que apresenta uma alta patogenicidade, semelhante ou mais alta do que a relatada para *C. albicans*. Sua patogenicidade está relacionada com os diferentes mecanismos de virulência descritos. Estão inclusas a morfogênese para uma forma filamentosa, permitindo a adaptação rápida às mudanças no hospedeiro, sendo que as cepas incapazes de produzir filamentação causam danos celulares reduzidos. Inclui-se ainda, nos mecanismos de virulência, enzimas hidrolíticas e a capacidade de formar biofilme (WINN JR et al., 2001; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; SILVA et al., 2012; ARIAS et al., 2019).

Macroscopicamente suas colônias se apresentam com coloração creme e uma borda levemente micelial. Microscopicamente produz blastoconídios ovais típicos do gênero, pseudo-hifas e, dependendo de alguns relatos, hifas verdadeiras. Para a sua identificação, são necessários estudos de assimilação de carboidratos, com perfil fermentativo e assimilativo incluindo sacarose e maltose, e outros sistemas de identificação de leveduras. Em meio CHROMagar® suas colônias ganham coloração azul escura (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; SILVA et al., 2012; AMES et al., 2017).

A espécie *C. glabrata* é a segunda mais comum no gênero presente em infecções sanguíneas, atrás apenas da *C. albicans*, e possui resistência intrínseca ao fluconazol. Macroscopicamente forma colônias brilhantes, lisas e de coloração creme, amplamente indistinguíveis das outras espécies de *Candida* spp. Microscopicamente, não é considerada uma espécie polimórfica, cresce apenas como blastoconídio, sem ramificação, destacado por ser visivelmente menor, com 1-4 μ m de tamanho (KURTZMAN et al., 2011; SILVA et al., 2012).

O perfil fermentativo e assimilativo de *C. glabrata* também é contrastante, sendo positivo apenas para glicose e trealose. Além disso, uma das suas principais características genéticas é que tem genoma haplóide, em contraste com o genoma diplóide de várias outras espécies. Em meio CHROMagar® aparecem brancas, rosa ou roxas (SILVA et al., 2012).

C. guilliermondii e *C. krusei* também fazem parte do grupo emergente de espécies de *Candida* spp. relacionadas à candidíase sistêmica, sendo os agentes causadores em 2% a 5% dos relatos. A taxa de mortalidade de *C. guilliermondii* é semelhante ao registrado para *C. albicans*, enquanto em *C. krusei* a taxa é maior, provavelmente relacionado à resposta inadequada às terapias antifúngicas padrão (ARIAS et al., 2019).

C. krusei apresenta macromorfologia típica, porém, possui termodimorfismo, produzindo hifas verdadeiras ao crescer a 37 °C e blastoconídios e pseudo-hifas quando incubados em temperaturas mais baixas. Ao microscópio é possível observar seus blastoconídios cilíndricos, com 25 µm de comprimento, semelhantes ao arroz de grão longo. A análise das suas sequências do genoma permitiu a reclassificação desses organismos no gênero *Pichia* spp. Esta levedura é capaz de secretar enzimas hidrolíticas que podem degradar macromoléculas do hospedeiro, contribuindo para a aquisição de nutrientes, para degradar efetores imunológicos ou na disseminação dentro dos tecidos do hospedeiro (GAVIRIA e MONTES, 2020).

Candida auris é outra espécie que atualmente apresenta relevância hospitalar, responsável por um número crescente de infecções, causando surtos nosocomiais e levantando preocupações a nível global. Pode sobreviver e persistir dentro do ambiente por períodos longos, resultando em fechamento de unidades de atendimento, exigindo a implementação de medidas comparáveis às utilizadas para limitar MRSA e CRE. Além disso, muitas vezes é erroneamente identificada, possui alta transmissibilidade e significativo número de isolados multirresistentes a antifúngicos. Assim como as outras espécies, apresenta atividade de enzimas extracelulares (KRCMERY e BARNES, 2002; KEAN et al., 2020; CIUREA, 2020).

Outra espécie de importância é *Candida parapsilosis*, que devido a sua heterogeneidade genética ocasionou a sua reclassificação taxonômica no Complexo *C. parapsilosis*, composto por *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente, de acordo com prevalência. Dentre os fatores de virulência associados ao complexo, destacam-se a produção de enzimas extracelulares. Em meio CHROMagar®, as leveduras deste complexo apresentam-se branco-creme ou lilás (SALES, 2019).

Este grupo de espécies se apresenta macroscopicamente com colônias brancas, cremosas, brilhantes e lisas/enrugadas. Já microscopicamente, possuem células ovais ou alongadas, sem produção de hifa verdadeira, podendo gerar pseudo-hifas caracteristicamente dilatadas e curvas, muitas vezes referidas como células gigantes. Sobre o perfil fermentativo, é importante ressaltar sua incapacidade de fermentar maltose (SILVA et al., 2012; SALES, 2019).

O complexo tem sido implicado como agente etiológico comum em candidemias humanas, sendo frequente em infecções sistêmicas no Brasil, prevalente em hospitais públicos, em pacientes de todas as idades. Na veterinária, são atribuídos como micro-organismos comensais da microbiota de várias espécies e importante agente oportunista, predominantemente encontrado na mucosa perianal e vaginal de cães, com relato de associação em caso de dermatomicose em cão. Entretanto, há poucos dados epidemiológicos clínicos de infecções sistêmicas (SALES, 2019).

Outra espécie emergente é *C. lusitaniae* que tem sido considerada como parte da microbiota normal dos animais. Outras NAC como *C. rugosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. norvegensis*, *C. kefyr*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. famata*, entre outras, são raras, causando menos de 1% de fungemia no homem (KRCMERY e BARNES, 2002; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; KURTZMAN et al., 2011).

Após o isolamento de *Candida* spp., as espécies podem ser identificadas por ensaios de assimilação e fermentação de carboidratos, bem como por características morfológicas, como desenvolvimento de tubo germinativo em soro sanguíneo a 37 °C e formação de clamidoconídio

em meio pobre nutricionalmente. Bioquimicamente, a maioria das espécies de *Candida* spp. são negativas para urease (KURTZMAN et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Podemos citar como exemplos de testes que auxiliam na identificação: API 20C AUX® (bioMérieux), AUXACOLOR® (Bio-Rad), Uni-Yeast-Tek kit® (Remel Laboratories), VITEK® (bioMérieux), RapID® Yeast Plus System (Innovative Diagnostic Systems), Fongiscreen® (Sanofi Diagnostics Pasteur), CHROMagar® Candida, MALDI-TOF (Dempster Mass Lab), dentre outros (SILVA et al., 2012; SALES, 2019).

Contudo, há desvantagens inerentes a essas técnicas, incluindo recursos financeiros, entendimento de técnica e sistemas operacionais, banco de dados limitado, identificação errônea de algumas espécies, principalmente por gerarem uma identificação mais confiável para patógenos comuns, sendo necessário o uso complementar de outros métodos para obtenção de um diagnóstico preciso em casos de infecções mistas ou incomuns (SALES, 2019).

Dentre as tecnologias de base molecular, a que teve maior impacto no diagnóstico clínico das infecções por *Candida* spp. foi a PCR, sendo citados o uso de MLST e RAPD. A técnica de PCR pode detectar quantidades altamente limitadas de ácido nucléico microbiano de sangue, amostras de tecido e micro-organismos cultivados. Os primers usados em amostras clínicas são específicos e não amplificam o DNA do hospedeiro ou de outros micro-organismos. Apesar do crescente desenvolvimento de novas abordagens moleculares, a grande maioria dos diagnósticos clínicos de afecções por *Candida* spp. são baseados em metodologias não moleculares devido à quantidade reduzida de equipamentos, problemas com preparação de amostras, contaminação ambiental e falta de protocolos padronizados para as metodologias de PCR (AMES et al., 2017; SALES, 2019).

2.1.2 *Malassezia* spp.

O gênero *Malassezia* spp. é composto por 18 espécies lipofílicas caracterizadas como leveduras comensais da maioria dos animais de sangue quente e, às vezes, como patógenos oportunistas. Comumente, as leveduras desse gênero estão localizadas em áreas corporais ricas em lipídios. As espécies mais comuns são *M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis* em humanos e *M. pachydermatis* em animais. No entanto, algumas publicações relataram infecções humanas potencialmente graves por *M. pachydermatis* em indivíduos imunocomprometidos, além do isolamento de espécies humanas em animais domésticos (CAFARCHIA e OTRANTO, 2004; MARÍN et al., 2018; TORRES et al., 2020).

Em humanos, mesmo que a colonização da pele por *Malassezia* spp. possa ser o resultado de fontes maternas e ambientais, os dados sugerem que a colonização da pele começa imediatamente após o nascimento e a distribuição das espécies varia com a idade. A colonização aumenta rapidamente após o nascimento e, durante a adolescência, o gênero se torna o mais predominante do microbioma da pele humana, fato que tem sido associado a mudanças na composição lipídica da pele (RHIMI et al., 2020).

Todas as espécies de *Malassezia* spp. necessitam de adição exógena de lipídios para crescimento em SDA, exceto *Malassezia pachydermatis*, que não é lipídio-dependente e cresce no meio sem adição de fonte lipídica. A identificação das espécies é de suma importância não apenas para a vigilância epidemiológica e investigação de surtos, mas também quando é registrada a falha terapêutica. Foi visto que a duração da fungemia por *Malassezia* spp. é maior que a duração da candidemia, provavelmente pela origem da cepa ou pela menor eficácia da terapia antifúngica (LEE et al., 2019; RHIMI et al., 2020).

Malassezia pachydermatis é conhecida por colonizar cães saudáveis, estando presente em ânus, vagina, canal auditivo externo, lábios e pele interdigital, associada a casos de otite externa e dermatite seborreica em cães em condições de predisposição. Não está comumente

associada à colonização da pele humana, embora já tenha sido associada a infecções da corrente sanguínea. Um estudo avaliando cães e gatos, saudáveis e com otite externa crônica, mostrou que a ocorrência e o tamanho da população de *M. pachydermatis* aumentaram de acordo com a presença de lesões cutâneas, não apenas em áreas afetadas da pele, mas também em outros locais sem lesões cutâneas detectáveis, sugerindo que as leveduras poderiam ser facilmente transmitidas de um local para outro devido ao prurido (BOND et al., 1995; ANTONIO et al., 2018; LEE et al., 2019; RHIMI et al., 2020).

M. pachydermatis pode ser transmitida mecanicamente dos cães para seus donos e, subsequentemente, podem causar problemas de saúde. Reforçando seu potencial zoonótico, existem relatos de infecções sistêmicas em humanos adultos e neonatos com comorbidade e em terapia intensiva. Tendo em vista que os casos não são relatados com presença de contactantes animais, hipoteticamente estariam associados à utilização de cateter intravascular, infusão lipídica, transmissão da mãe, práticas higiênicas precárias por profissionais de saúde, persistência do patógeno em recintos ou lençóis e uso de antifúngicos para prevenção de *Candida* spp. promovendo infecções resistentes. Porém, apesar de todas as hipóteses, a real origem da infecção não é clara (LEE et al., 2019; HUANG et al., 2020; RHIMI et al., 2020; TORRES et al., 2020).

Até o momento, *Malassezia furfur*, *M. sympodialis* e *M. pachydermatis* são as únicas espécies de *Malassezia* spp. isoladas de infecções da corrente sanguínea, sendo *Malassezia furfur* a espécie mais encontrada, seguida por *M. pachydermatis*. Embora ferramentas moleculares tenham sido usadas para detectar leveduras desse gênero em amostras biológicas, nenhum estudo foi realizado para diagnosticá-las molecularmente pelo sangue e, portanto, a cultura continua sendo o padrão ouro para isolar e identificar as leveduras. A cultura também é adequada para a quantificação das leveduras, avaliação de viabilidade e, eventualmente, para testar o perfil de susceptibilidade antifúngica das espécies isoladas. O sistema BacT/Alert funciona bem para detecção de *M. pachydermatis* do sangue, embora seja duvidoso para *M. furfur* (RHIMI et al., 2020).

A produção de protease e fosfolipase pelo gênero *Malassezia* spp. é descrita como contribuinte para o fator de virulência do micro-organismo, desempenhando papel importante nas interações com hospedeiro e comunidade microbiana, fazendo parte da invasão, colonização tecidual, persistência e proliferação no tecido do hospedeiro. Quando os isolados são obtidos de animais lesionados, em sua maioria, há expressão de fosfolipase e, quando isoladas de animais saudáveis, a expressão enzimática cai. Além desses fatores de virulência, espécies desse gênero são capazes de produzir biofilme, esterases e lipases. *M. pachydermatis* apresenta diferentes padrões quando se trata de amostras coletadas de animais saudáveis ou com lesões (CAFARCHIA e OTRANTO, 2004; CANNIZZO et al., 2007; BRILHANTE et al., 2018; RHIMI et al., 2020).

Portanto, a análise de virulência sofre interferência da presença comensal ou lesional e outros fatores que precisam ser mais bem esclarecidos. Utilizando de métodos de impressão digital e análise de sequência multigênica, diferentes genótipos de *Malassezia* spp. foram identificados como estritamente relacionados ao hospedeiro, origem geográfica e/ou manifestações clínicas (RHIMI et al., 2020).

Malassezia pachydermatis tem sua temperatura ótima de crescimento entre 32 °C e 37 °C e, após crescimento, as colônias apresentam cor creme a amarelado, sendo foscas ou brilhantes, lisas ou ligeiramente enrugadas e com elevação convexa. Microscopicamente suas células possuem formato de garrafa e característico colarete devido a deposição de quitina (KURTZMAN et al., 2011; SPARBER e LANDMANN, 2019; BANDINI, 2020; TORRES et al., 2020).

2.1.3 *Trichosporon* spp.

As espécies do gênero *Trichosporon* spp. são basidiomicetos semelhantes às leveduras, amplamente distribuídos no meio ambiente, predominantemente em áreas tropicais e temperadas, em solo, madeira em decomposição, ar, rios, fezes de pássaros, mamíferos e etc. Nos humanos, ocasionalmente fazem parte da microbiota gastrointestinal e cavidade oral, podendo colonizar transitoriamente o trato respiratório e a pele (COLOMBO et al., 2011; BIEGANSKA et al, 2018).

Recentemente, a taxonomia de *Trichosporon* spp. foi reavaliada e novos gêneros da família *Trichosporonaceae* foram descritos. Atualmente, mais de 50 subespécies diferentes e cerca de 16 diferentes cepas causam doenças humanas. As cepas em questão, são altamente patogênicas e amplamente distribuídas em seres vivos, como formigas, besouros, pássaros, golfinhos, cães, bois e ovelhas (SANTO et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Esses basidiomicetos estão associados a infecções superficiais, como piedra branca em mamíferos peludos. Tais infecções superficiais são predominantemente observadas em pacientes imunocompetentes, sendo os pacientes imunocomprometidos passíveis de serem afetados por infecções localizadas ou profundas (SANTO et al., 2020).

Trichosporon asahii é a principal espécie causadora de infecções invasivas e disseminadas, sendo a espécie mais recuperada na urina de pacientes hospitalizados no Brasil e frequentemente fatal. Em pacientes com infecção hematológica, além de *T. asahii*, *T. asteroides* e *T. mucoides* são as principais espécies responsáveis pelos casos de tricosporonose. Entre os relatos, as espécies *T. beigelii* e *T. cutaneum* também aparecem, em casos de septicemia, infecções uretrais, implante infectado, acometimentos sistêmicos em pacientes com leucemia, além de infecções relacionadas ao cateter venoso de pacientes cirúrgicos com neoplasias hematológicas (DE HOOG et al., 2014; SANTO et al., 2020).

A maioria dos casos por *Trichosporon asahii* confirmados apresentou disseminação hematogênica nos pacientes, principalmente imunossuprimidos. Existem relatos de infecção disseminada em paciente com queimaduras graves, osteomielite e linfadenopatia observada em paciente com IgE acentuadamente elevada. Também são relatadas ocasionalmente em neonatos, em acometimentos cutâneos de pacientes imunocompetentes e infecções nosocomiais (SANTO et al., 2020).

Além dessas espécies, já foram detectadas em tricosporonoses superficiais ou invasivas: *T. inkin*, *T. ovoides*, *T. loubierii*, *T. coremiiforme*, *T. chiarelli*, *T. dermatis*, *T. dohaense*, *T. domesticum*, *T. faecale*, *T. japonicum*, *T. lactis*, *T. montevideense* e *T. jirovencii*, este último sendo responsável por infecção do trato respiratório de um cão, cursando com traqueobronquite (BENTUBO e GOMPERTZ, 2014; DE HOOG et al., 2014; BIEGANSKA et al, 2018; SANTO et al., 2020).

O desenvolvimento colonial ideal é entre 35 °C e 40 °C, sendo as colônias inicialmente semelhantes à levedura, apresentando cores que variam do branco ao creme, úmidas, tipicamente exibindo aspectos cerebriformes e radiais, podendo se tornar secas e membranosas com o tempo. Microscopicamente, brotamentos podem ou não estar presentes, havendo presença de micélio, com blastoconídios localizados nas extremidades de seus abundantes artroconídios cilíndricos, simulando orelhas de coelho (WINN JR et al., 2001 e COLOMBO et al., 2011; DE HOOG et al., 2014; SANTO et al., 2020).

Quanto as características de crescimento, são capazes de utilizar diferentes fontes carbonadas e hidrolisam ureia, mas os membros deste gênero não são fermentativos. A identificação fenotípica é útil, mas apenas métodos moleculares são capazes de determinar as espécies, podendo ser utilizado método de RAPD e avaliação fisiológica, que permitem

diferenciar cepas clínicas de isolados ambientais (WINN JR et al., 2001 e COLOMBO et al., 2011; DE HOOG et al., 2014; SANTO et al., 2020).

Embora *Trichosporon* spp. esteja entre as leveduras mais comuns responsáveis por infecções fúngicas invasivas, poucos estudos publicados caracterizam a virulência deste fungo, associado a infecções superficiais, que podem servir como reservatório para infecções invasivas. Os fatores de virulência relacionados a este gênero incluem a produção de DNase, proteinase e fosfolipase, que oscila entre as espécies. O mesmo não ocorre com a formação de biofilme, situação em que todas as cepas apresentam produção. Além disso, um dos componentes da parede celular se assemelha ao GMX *Cryptococcus neoformans* e pode facilitar a disseminação dentro do organismo do hospedeiro e inibir a atividade fagocítica de monócitos ou neutrófilos, aumentando assim a patogenicidade das leveduras (BENTUBO e GOMPERTZ, 2014; BIEGANSKA et al., 2018; SANTO et al., 2020).

2.1.4 *Geotrichum* spp.

O gênero *Geotrichum* é classificado como fungo filamentosso microscópico e alguns o caracterizam como um fungo filamentosso que se assemelha a levedura. A espécie *Geotrichum candidum* é um sapróbio decompositor comum de materiais vegetais e está geralmente associado ao leite ou produtos lácteos (DE HOOG et al., 2014; FOLTINOVÁ et al., 2021).

As principais doenças causadas em humanos e outros mamíferos são por colonização do trato intestinal e infecções de origem respiratória, acometendo brônquios e pulmões. Este micro-organismo se manifesta com infiltrados irregulares disseminados com septo viscoso e grande quantidade de artroconídios. Infecções sanguíneas com sepse são ocasionalmente observadas, assim como existem relatos de afecções renais, infecções traumáticas e infecção cutânea canina (DE HOOG et al., 2014).

Inicialmente a colônia do gênero *Geotrichum* apresenta, em meio MEA, coloração branca, com rápido crescimento com diâmetros entre 50-65 mm, podendo a textura ser plana, macia ou, ao longo do tempo, ter micélio aéreo aveludado na superfície do meio. A margem colonial costuma ser franjada, com odor insignificante ou frutado. Estas leveduras não apresentam nenhum crescimento a 40 °C e, logo, precisam ser incubadas em temperaturas inferiores (WINN JR et al., 2001; DE HOOG et al., 2014; FOLTINOVÁ et al., 2021).

Microscopicamente os conidióforos são hifas indiferenciadas, possuem micélio hialino, septado, com hifas largas ou estreitas, vegetativas, que se ramificam ou fragmentam e formam artroconídios. Os artroconídios são formados em cadeias por desarticulação nos septos laterais do interior da hifa, inicialmente hialinos e cilíndricos e, posteriormente, truncados em forma de barril a elipsoidais ou subglobosos, por vezes intercalados entre hifa (CARMICHAEL, 1957; KURTZMAN e FELL 1998; FOLTINOVÁ et al., 2021).

As suas hifas verdadeiras e, na maturidade, artroconídios, são semelhantes ao gênero *Trichosporon*. Estes dois gêneros podem ser diferenciados devido ao fato do gênero *Geotrichum* produzir um único tubo germinativo a partir de uma extremidade do artroconídio, simulando um taco de hóquei. Além disso, os micro-organismos pertencentes ao gênero *Geotrichum* são urease negativo e o seu perfil fermentativo é positivo para xilose e sorbitol e assimila uma quantidade limitada de fontes de carbono (WINN JR et al., 2001; DE HOOG et al., 2014).

2.1.5 Leveduras negras

As leveduras negras são definidas como fungos assexuados potencialmente capazes de produzir células de brotamento melanizadas em qualquer estágio de seu ciclo de vida. Esta

condição ocorre em fungos de grande diversidade filogenética, alguns basidiomicetos no gênero *Moniliella* spp. e membros da ordem dos ascomicetos *Chaetothyriales*, gênero *Exophiala* e *Cladophialophora*, por exemplo, e, ordem *Dothideales*, gênero *Cladosporium*, *Aureobasidium* e semelhantes. Compreendem principalmente fungos associados às plantas, que estão excepcionalmente envolvidos em doenças humanas. Frequentemente, também leveduras negras patogênicas estão inclusas neste grupo, sendo aplicada a indicação “fungos semelhantes a levedura negra” (DE HOOG et al., 2014; LAVRIN et al., 2020).

Na ordem dos ascomicetos *Chaetothyriales* e *Dothideales*, os estados anamorfos são morfologicamente diversos, ambos com uma gama semelhante de diversidade. A patologia potencial determina em grande parte se a cepa sob consideração é o possível agente etiológico ou se deve ser descartada como um provável contaminante. Por exemplo, o gênero *Cladophialophora* (*Chaetothyriales*) contém agentes altamente virulentos de doença sistêmica, enquanto sua contraparte morfologicamente semelhante, *Cladosporium* (*Dothideales*), contém saprófitas onipresentes nas plantas (DE HOOG et al., 2014).

A plasticidade fenotípica se dá pela necessidade de sobreviver e se propagar em situações de modificações ambientais e de gradiente nutricional. Comumente são relatados como fungos de importância industrial e encontram-se em laboratórios clínicos como contaminante, porém, existem relatos de acometimentos clínicos em humanos e animais (SLEPECKY e STARMER, 2009; DE HOOG et al., 2014).

Os *Chaetothyriales* ainda são relativamente inexplorados, muitos táxons novos e clinicamente relevantes ainda precisam ser descritos. A patologia do grupo varia de colonização leve a patogenicidade sistêmica fatal. Os quadros clínicos são observados geralmente em pacientes saudáveis e o crescimento do número de pacientes hospitalizados com distúrbios subjacentes graves não parece influenciar a prevalência desses fungos (DE HOOG et al., 2014).

O gênero *Exophiala*, anamorfo mais comumente encontrado, é um heterogêneo de demáceo, taxonomicamente posicionado na família *Herpotrichiellaceae*, ordem *Chaetothyriales*. Sua espécie *Exophiala dermatitidis* é uma levedura negra polifilética, neurotrópica e com ecotipo extremofílico distinto. Habita diversos ambientes internos conectados a fontes de água e temperaturas extremas, como banheiros, saunas e lava-louças. Já foi isolada de uma ampla gama de superfícies, solo, água de geleira e áreas contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos, além de ser relatada também como habitante de ambientes com alta salinidade, aridez, baixa atividade de água, alta radiação UV, pH flutuante e oligotroficidade (DE HOOG et al., 2014; CASTILLO et al., 2020; LAVRIN et al., 2020).

Exophiala dermatitidis é responsável por infecções humanas subcutâneas e invasivas, podendo causar feo-hifomicose por inoculação traumática. Também promove a cromoblastomicose, doença exclusiva da ordem e caracterizada por ser uma infecção subcutânea com crescimento excessivo de células da pele devido à presença de células fúngicas muriformes no tecido, por inoculação traumática e invasões sistêmicas (DE HOOG et al., 2014; CASTILLO et al., 2020).

Pode causar várias outras condições médicas, desde infecções cutâneas e subcutâneas a infecções sistêmicas em imunocomprometidos, ceratite, infecções gastrointestinais, peritonite relacionada à CAPD, sepse relacionada a cateter, infecções pulmonares e neurotrópicas. Foi isolado também das orelhas, seios da face, muco do pulmão de pacientes com fibrose cística e sangue (DE HOOG et al., 2014; LAVRIN et al., 2020).

O mais importante acometimento se dá por infecções cerebrais com morbimortalidade significativa. A invasão e penetração observada de células de neuroblastoma por hifas de *E. dermatitidis* provavelmente causa a degradação da maioria delas em apenas três dias. Isso pode representar uma causa direta ou indireta até agora pouco conhecida para o desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas. De acordo com investigações recentes, as micoses

sistêmicas podem ser um dos agentes causadores ou um fator de risco adicional para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Células de leveduras fúngicas e fragmentos de hifas foram detectados em diferentes partes do cérebro, tanto dentro quanto fora dos neurônios (CASTILLO et al., 2020; LAVRIN et al., 2020).

Infecções típicas são vistas em hospedeiros imunocomprometidos e a sua patogenicidade provavelmente se deve a vários fatores de virulência, incluindo pigmentação da melanina, termotolerância e polimorfismo. A melanina se acumula na parede celular de *E. dermatitidis*, que é espessa, tendo um efeito protetor contra substâncias nocivas e estresse oxidativo do meio ambiente ou da célula hospedeira. O caráter polimórfico e a pigmentação melânica permitem sua colonização lenta em condições de estresse (LAVRIN et al., 2020).

Aureobasidium pullulans, ordem *Dothideales*, é uma espécie considerada levedura negra ou semelhante a uma levedura, particularmente conhecida por sua importância biotecnológica como produtora do polissacarídeo extracelular biodegradável “pullulan”. Esta espécie apresenta considerável variabilidade em suas propriedades morfológicas e fisiológicas, sendo considerada pleomórfica, definida por quatro variedades: *var. pullulans*, *var. melanogenum*, *var. subglaciale* e *var. namibiae* (ZALAR et al., 2008; SLEPECKY e STARMER, 2009).

Considerado um oligotrófico onipresente, apresenta-se disseminado e pode ser encontrado em ambientes com atividades aquáticas flutuantes, banheiros, alimentos, rações, ambientes osmoticamente modificados, mármore, rochas, vidro úmido etc. É considerado também colonizador em casos de biodeterioração, sendo um indicador de poluição ambiental implicado em doenças alérgicas em humanos e animais (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ et al., 1980; ZALAR et al., 2008; SLEPECKY e STARMER, 2009; DE HOOG et al., 2014).

Muitas leveduras negras, em particular aquelas dentro de *Chaetothyriales*, possuem capacidade incomum de crescer a 37 °C para invadir o corpo humano. De modo geral, a colônia destes micro-organismos varia consideravelmente entre as cepas e sua expressão é influenciada pela temperatura, pH e luminosidade. Se apresentam com crescimento rápido, espalhado na superfície do ágar, aparentemente liso, opaco, frequentemente coberto com material viscoso dos conídios e geralmente com micélio aéreo fino, pigmentado inicialmente de cor creme ou rosa e mais tarde tornando-se quase sempre marrom ou preto (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ et al., 1980; SLEPECKY e STARMER, 2009; DE HOOG et al., 2014).

Microscopicamente seu ciclo de vida envolve a formação de blastoconídios em diferentes locais das hifas de forma síncrona, que podem cursar com micélios produtores de clamidoconídios de parede grossa e septados, também chamados de artroconídios. As hifas são hialinas ou marrons. Os conídios são produzidos simultaneamente em grupos densos, hialinos, elipsoidais, de formas e tamanhos variados, podendo ser uni ou bicelular com endoconidiação (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ et al., 1980; SLEPECKY e STARMER, 2009; DE HOOG et al., 2014; LAVRIN et al., 2020).

Quanto ao seu crescimento, possui vasto perfil de assimilação e fermentação de fontes carbonadas. Pode contrastar-se o gênero *Moniliella* spp., que é reconhecido pela capacidade de fermentar glicose, além de microscopicamente ter ocorrência frequente de artroconídios retangulares (DE HOOG et al., 2014).

2.1.6 *Rhodotorula* spp.

O gênero *Rhodotorula* pertence às leveduras oleaginosas caracterizadas pelo fato de até 50% de seu peso seco consistir em lipídios. É muitas vezes mencionado como contaminante laboratorial ou fungo de baixa virulência. Amplamente distribuído no meio ambiente, já foi isolado do solo, ar, ecossistemas aquáticos, plantas, frutas, escovas de dentes e cortinas de

banheiro (ALMEIDA et al., 2008; HOF, 2019; GHARAGHANI et al., 2020; SANNA, C. et al., 2021).

Entretanto, tem sido cada vez mais reconhecido como patógeno oportunista emergente, capaz de causar infecções invasivas em ambientes apropriados. Frequentemente são detectadas em dispositivos médicos, por apresentarem afinidade com materiais plásticos, podendo crescer na forma de biofilme. Ademais, foi classificada como a terceira levedura mais isolada das hemoculturas e o micro-organismo mais comum nas mãos de funcionários e pacientes de hospitais. Existem pelo menos 8 espécies do gênero conhecidas e várias delas já foram descritas em infecções clínicas em humanos e animais, sendo exemplos: *R. glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginosa* (BIEGANSKA et al, 2018; HOF, 2019; GHARAGHANI et al., 2020; JARROS et al., 2020; SANNA, C. et al., 2021).

Em humanos, os mais acometidos são pacientes com doenças graves como câncer ou outros tumores sólidos, doença linfoproliferativa, HIV, DRC, diabetes mellitus e pacientes submetidos a procedimentos invasivos. Além de fungemia e meningite, *Rhodotorula* spp. causa infecções cutâneas, onicomicose, peritonite, endocardite, ceratite, ventriculite, infecções oculares e outras menos frequentes, como infecções do trato respiratório, gastrointestinal e urinário, geralmente representando colonização inofensiva e transmissão principalmente através do ar e de alimentos. A colonização intestinal é bastante comum, mas um crescimento excessivo é normalmente suprimido, uma vez que sua temperatura ideal de crescimento é excedida no corpo (GHARAGHANI et al., 2020; JARROS et al., 2020; SANNA, C. et al., 2021).

Uma revisão sistemática recente mostra que infecções fúngicas por *Rhodotorula* spp. consistem principalmente em infecções da corrente sanguínea e do sistema nervoso central, acometendo principalmente os pacientes imunossuprimidos em uso de cateter venoso central. Essas apresentações clínicas, assim como os aspectos microbiológicos, fazem com que as infecções por *Rhodotorula* pareçam criptococose e, como leveduras desse gênero costumam ser resistentes aos azóis, que possuem boa atividade *in vitro* contra espécies de *Cryptococcus* spp., o manejo dessas duas infecções precisa ser bem conhecido (JARROS et al., 2020).

Rhodotorula spp. já foi encontrada em gatos saudáveis, macacos “rhesus”, camelos e avestruzes. Em cão com doença concomitante e que fazia uso de glicocorticóide, *R. mucilaginosa* foi reportada como um dos patógenos causadores de uma traqueobronquite, sendo isolada através de descarga mucopurulenta, obtida a partir de broncoscopia da área laringotraqueal e identificada através de técnica molecular (BIEGANSKA et al, 2018).

O gênero *Rhodotorula* foi reportado ainda como causador de dermatomicose em felino FIV e FELV positivo. Outro relato em cão, reportou a espécie *R. glutinis* como causadora de epididimite granulomatosa. Em outro caso, a mesma espécie foi identificada, por técnica molecular, em cão com dermatite granulomatosa. O animal em questão estava imunossuprimido devido à leishmaniose visceral e osteossarcoma (BIEGANSKA et al, 2018; ROSA et al., 2018).

Macroscopicamente *Rhodotorula* spp. produz colônias lisas a mucóides, úmidas, brilhantes e com pigmento carotenóide distinto, de rosa salmão a vermelho coral. Microscopicamente é produtora de blastoconídios, suas células leveduriformes são curtas e ovóides, geralmente sem ramificações, mas podendo apresentar, por vezes, pseudomicélio. Suas características morfológicas e fisiológicas são semelhantes a *Sporobolomyces* spp. e *Cryptococcus* spp., sendo diferenciada deste último pela produção de pigmentos carotenóides e pela inability em assimilar inositol. Bioquimicamente já foi descrito que não são fermentadoras de carboidratos e produzem urease. Diversas cepas apresentaram capacidade de formar biofilme no soro a 37 °C, o que é crucial na patogênese das infecções fúngicas. Algumas cepas de *R. mucilaginosa* apresentaram atividades significativas de fosfolipase e protease, enquanto outras revelam resistência aos agentes antifúngicos comuns (ALMEIDA et al., 2008;

BIEGANSKA et al, 2018; HOF, 2019; NEVES et al., 2019; GHARAGHANI et al., 2020; SANNA, C. et al., 2021).

Apesar de sua importância, as infecções por *Rhodotorula* spp. ainda não estão bem explicadas, pouco se conhecendo sobre o potencial de virulência desta levedura. O processo de disseminação ainda precisa de esclarecimentos, se depende mais do mérito patogênico fúngico, pela capacidade de formação e estabelecimento de biofilme em dispositivos médicos ou da debilidade do paciente (JARROS et al., 2020).

2.2 Afecções da Cavidade Oral e Leveduras Associadas

Na clínica médica de pequenos animais, pela crescente ocorrência, distúrbios na cavidade oral têm ganhado significativa importância na medicina veterinária. Dentre as doenças mais comuns em cães e gatos, a doença periodontal constitui uma das afecções de maior frequência. As periodontopatias acometem cerca de 80% dos cães, sendo a principal enfermidade infecciosa, ocorrendo geralmente a partir dos quatro anos de idade. Acredita-se que entre os cães com mais de um ano de idade, 95% apresentam algum grau da doença e, na clínica veterinária, acredita-se que 100% dos animais adultos tenham graus variados de acometimento odontológico (ROZA, 2004; BRAGA et al., 2005; SANTIN, 2009; TORTORA et al., 2012; O'NEILL et al, 2014; PAULA et al., 2021).

Um dos fatores que predis põem a doença periodontal nos cães é a anatomia dental e óssea. Nestes animais, há uma relação de extensão entre o dente e o osso da mandíbula e uma relação entre o tamanho do dente e o volume do osso mandibular comparado ao porte, sendo maiores nos cães de porte pequeno do que naqueles de porte grande, predispondo estes à periodontopatias (GIOSO, 1998).

A doença periodontal resulta do acúmulo de placa microbiana na superfície dos dentes, exacerbada pelo acúmulo de cálculo dentário mineralizado depositado a partir de fluido salivar, geralmente separada em duas condições clínicas, a gengivite e a periodontite. O início da doença traduz-se pela gengivite, que consiste num quadro inflamatório, resultado da presença da placa próxima à gengiva, levando à destruição dos tecidos adjacentes, evoluindo para periodontite (VENTURINI, 2006; HARVEY et al., 2008).

Quando se trata dos fatores que evidenciam o comprometimento odontológico, podemos citar: Edema local, halitose, sialorreia, cálculo dentário, presença de fístula, dificuldade na mastigação, úlceras, sangramento gengival, retração gengival, mudança comportamental, mudança na coloração dentária e fratura, que muitas vezes passam despercebidos ou são ignorados pelo clínico geral, atrapalhando ou impedindo o diagnóstico das lesões endodônticas (LEON-ROMAN e GIOSO, 2004; PAULA et al., 2021).

Estas doenças possuem potencial para destruição de tecidos de sustentação do dente e acometimentos sistêmicos pelos micro-organismos envolvidos, tendo como principal causa o biofilme dentário em contato com a gengiva. Dentre os acometimentos sistêmicos causados por organismos fúngicos, já descritos também em afecções orais, podem ser citados quadros de cistites, endoftalmite, endocardite, peritonite e lesões cutâneas (OZAWA et al., 2005; SANTIN, 2009; CRUZ, 2010; ONG et al., 2010; ENDERS et al., 2017).

A cavidade oral representa a entrada do sistema digestivo e qualquer anormalidade, doença ou disfunção nesta região, tem capacidade de causar efeitos adversos. Problemas de menor importância geram desconforto e dor, enquanto doenças orais severas levam à diminuição de ingestão hídrica e alimentar, menor aproveitamento nutricional, causando debilidade, diminuição da qualidade de vida, alterações sistêmicas e, por fim, óbito do animal (VENTURINI, 2006).

É importante ressaltar que, além da consequência da periodontopatia na qualidade de vida do cão, o aumento da proximidade entre os cães e as pessoas resulta em uma provável maior troca de micro-organismos entre eles, incluindo leveduras. Estes micro-organismos geram preocupação na saúde pública, devido à capacidade de causarem doenças quando passam de sapróbios para oportunistas (PAULA et al., 2021).

Devido a casos de agressividade animal ou por desconhecimento profissional, a inspeção da cavidade oral é negligenciada e, como consequência, o diagnóstico da enfermidade é retardado. Além disso, deve ser considerado também o longo período decorrido entre o início do acometimento e a manifestação clínica no animal (CORRÊA et al., 1998; VENTURINI, 2006, PAULA et al., 2021).

Em avaliação da cavidade oral, após resultados macroscópicos e microscópicos de 45 cães submetidos à necropsia, Debowes et al. (1996) sugeriram que a periodontite pode estar associada a efeitos sistêmicos no cão, indicando uma relação estatisticamente significativa entre a gravidade da doença periodontal e alterações morfológicas nos rins, miocárdio e parênquima hepático.

Em estudo retrospectivo relacionado ao atendimento odontológico veterinário, Venturini (2006) relatou em 2.300 cães o acometimento de 71,4% deles por periodontopatias, observando correlação estatística significativa entre a doença periodontal e a idade do animal, sendo mais frequente em animais acima de 7 anos, enquanto a gengivite ocorreu mais em animais jovens.

Embora existam relatos de infecções por fungos, há pouco conhecimento da microbiota oral de cães, especialmente da parte fúngica. Em geral, acredita-se em uma microbiota variada, que em condições específicas pode passar de componentes sapróbios para patogênicos. Já foram descritas como leveduras que acometem a cavidade oral de cães o gênero *Candida*, especialmente a espécie *C. albicans*, um comensal oportunista, havendo, no entanto, relatos de participação de fungos filamentosos como *Conidiobolus coronatus* (BAUER et al., 1997; WINN JR et al., 2001; LACAZ et al., 2002; JADHAV e PAL, 2006; SANTIN, 2009).

O acometimento mucocutâneo por *Candida* spp. é usualmente manifestado por úlceras cobertas por placas esbranquiçadas na cavidade oral. Outros sinais que levantam suspeita são gengivite, estomatite, anorexia, halitose, friabilidade da cavidade oral, disfagia, sialorreia e linfadenopatia submandibular (JADHAV e PAL, 2006).

Outras leveduras já citadas correlacionadas à cavidade oral foram *Malassezia pachydermatis*, associada a relatos de estomatite, faringite e tonsilite, *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium (Pullularia) pullulans*, *Debaryomyces nepalensis* e *Cryptococcus* spp., associado a um caso de sialoadenite em cão (BRITO, 2009; SANTIN, 2009; BORGES et al., 2016; NAVARRO, 2016).

Em 2009, Brito et al. revelaram que as leveduras mais comumente isoladas da mucosa de cães saudáveis foram *Malassezia pachydermatis*, seguida por *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula* spp. No mesmo ano, Santin (2009) estudou sobre leveduras da cavidade oral de fêmeas caninas, isolando 61 leveduras, distribuídas em mais da metade dos animais, sendo 50,82% *Malassezia pachydermatis*, 13,11% *Trichosporon asahii*, 13,11% *Rhodotorula* spp., 6,56% *Cryptococcus albidus*, 4,92% *Candida albicans*, 3,28% *C. catenulata*, 1,64% *C. famata*, 1,64% *C. guilliermondii*, 1,64% *C. parapsilosis*, 1,64% *C. intermedia* e 1,64% *Trichosporon mucoides*. Mais tarde, Navarro (2016) identificou 43 leveduras em 45 amostras testadas, sendo 86% correspondente ao gênero *Candida*, 11,6% ao gênero *Trichosporon* e 2,3% à espécie *Malassezia pachydermatis*.

2.3 Acidentes de Mordedura e Lambedura

Os cães têm um lugar intrínseco na sociedade moderna, com inúmeros benefícios para a sociedade. Entre os animais domésticos, o mais próximo das pessoas é o cão, estabelecendo relação de companheirismo, segurança e, atualmente, como auxiliares de deficientes visuais e até mesmo detectores de patógenos em ambientes hospitalares (PAULA et al., 2021; TULLOCH et al., 2021).

No entanto, a Organização Mundial da Saúde estima que mordidas de cães causem dezenas de milhões de ferimentos em todo o mundo. Reconhecidas como um problema de saúde pública global, as mordidas desses animais têm apresentado graves consequências físicas e infecciosas para os humanos, podendo resultar em sequelas e/ou óbito. A maior ocorrência desses acidentes é com crianças, devido a intensa atividade e proximidade entre eles (MACEDO et al., 2006; FRIAS et al., 2011; e RUI-FENG et al. 2013; TULLOCH et al., 2021).

Durante um estudo que relatou 6.533 mordidas causadas por cães, sendo a maior incidência de mordedura em humanos por animais, 99,95% desses cães eram conhecidos pela vítima e 57,48% destes ataques ocorreram em ambientes fechados. Já foi relatado que, nos seres humanos 15 a 20% das mordidas de cães são infectadas e 4 a 20% tornam-se infectadas em 8 a 24 horas após a lesão (GOLDSTEIN, 1992; BARRIOS et al., 2021).

Além dos acidentes de cães que mordem humanos, lidamos com acidentes de cães que atacam outros cães, com intervenção do proprietário em quase metade dos casos, sofrendo ferimentos secundariamente. Metade das feridas traumáticas contaminadas em cães e gatos são decorrentes de mordidas e boa parte delas já está infectada no momento do primeiro atendimento veterinário (ARIAS et al., 2008; MONTROSE et al., 2020).

O conhecimento da microbiota oral de cães permite estabelecer prováveis patógenos envolvidos nas infecções de feridas por mordidas em animais e seres humanos, assim como em infecções de feridas cirúrgicas de cães pelo próprio paciente e, conseqüentemente, orientar na escolha do melhor tratamento (CARNEIRO et al., 2001).

Foram relatadas por Forsblom et al. (1997) e Goldstein (1992) a dificuldade do tratamento das infecções de feridas por mordedura de animais em seres humanos, principalmente devido à falta de conhecimento sobre a composição exata da microbiota comensal da cavidade oral canina.

Ainda que sejam um problema comum e representem até 1% de todas as visitas a unidades de saúde, são necessários mais estudos sobre tratamento de infecções de feridas por mordedura de mamíferos. Acredita-se numa natureza polimicrobiana das feridas por mordidas de animais e altos níveis de resistência por micro-organismos comumente encontrados nas lesões, sendo necessária a adoção de medidas farmacológicas adequadas para os micro-organismos em questão. Embora o uso de antibióticos possa ser útil para reduzir o risco de desenvolver uma infecção, não há evidências de que o uso de antibióticos profiláticos seja eficaz para mordidas de gato ou cachorro (HENTON e JAIN, 2012; OMRAN et al., 2020).

2.4 Fatores de Virulência Fúngicos

O surgimento de infecções fúngicas tem sido atribuído ao avanço da utilização farmacológica e o aumento de pacientes gravemente enfermos, contribuindo para um sistema imunológico debilitado. As leveduras são patógenos oportunistas que contam com fatores de virulência para a adaptação a diferentes hospedeiros, invasão e permanência tecidual. Essa virulência não é uma propriedade constante, podendo ser aumentada, perdida e restaurada em diversas circunstâncias. Essa inconstância é vista, por exemplo, na estabilidade fisiológica do micro-organismo em temperaturas específicas, que pode ser relevante para a expressão da

atividade, considerando a natureza mesofílica da maioria dos patógenos conhecidos. Podemos dizer que todas as características necessárias para o estabelecimento da doença são fatores de virulência, entretanto, os fatores de virulência são aqueles que interagem diretamente com as células do hospedeiro causando danos (AGARWAL, 2011; SILVA et al., 2012; KURTZMAN et al., 2011; BENTUBO e GOMPERTZ, 2014; CIUREA et al., 2020).

Resumidamente, fatores de virulência são moléculas que compõem produtos e estruturas, que conseqüentemente geram estratégias para danificar ou evitar a agressão por parte das células do hospedeiro, propiciando o estabelecimento e a manutenção da infecção em um organismo vivo. Dessa forma, praticamente todos os micro-organismos produzem pelo menos um fator de virulência para garantir sua sobrevivência (MOHAN DAS e BALLAL, 2008; ZHAO e MAO, 2015).

Na cavidade oral, o potencial virulento pode ser decisivo para o aparecimento de afecções fúngicas no animal, além do estado imunológico geral, a saúde da mucosa e a resistência do hospedeiro. O desenvolvimento de candidíase oral, por exemplo, é um alerta de comprometimento dos mecanismos de defesa locais ou sistêmicos, pois ocorre pelo desequilíbrio entre os fatores de virulência fúngicos e a defesa do hospedeiro. As manifestações de virulência dos fungos oportunistas estão intimamente relacionadas com a presença de fatores predisponentes intrínsecos, como prenhez, idade avançada, prematuridade, neoplasias, doenças crônicas, imunodeficiências, desnutrição. E fatores extrínsecos, como terapia antibacteriana de amplo espectro, corticoterapia, quimioterapia, intervenções cirúrgicas e agentes físicos e químicos (ZAITZ et al., 1998; JAMMIL e YEHA, 2019).

Os fatores de virulência traçam estratégias para que os agentes patogênicos cresçam e se estabeleçam nos tecidos do hospedeiro, tais como dimorfismo, termotolerância, expressão de componentes na parede celular, presença de cápsula, secreção de enzimas, entre outras. A expressão de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteases, fosfolipases e DNases está associada à virulência de cepas que causam micoses importantes e a expressão dessas enzimas pode fornecer pistas sobre a natureza da relação entre o fungo e o hospedeiro, contribuindo para o entendimento da patogenicidade das leveduras (BENTUBO e GOMPERTZ, 2014; JAMMIL e YEHA, 2019).

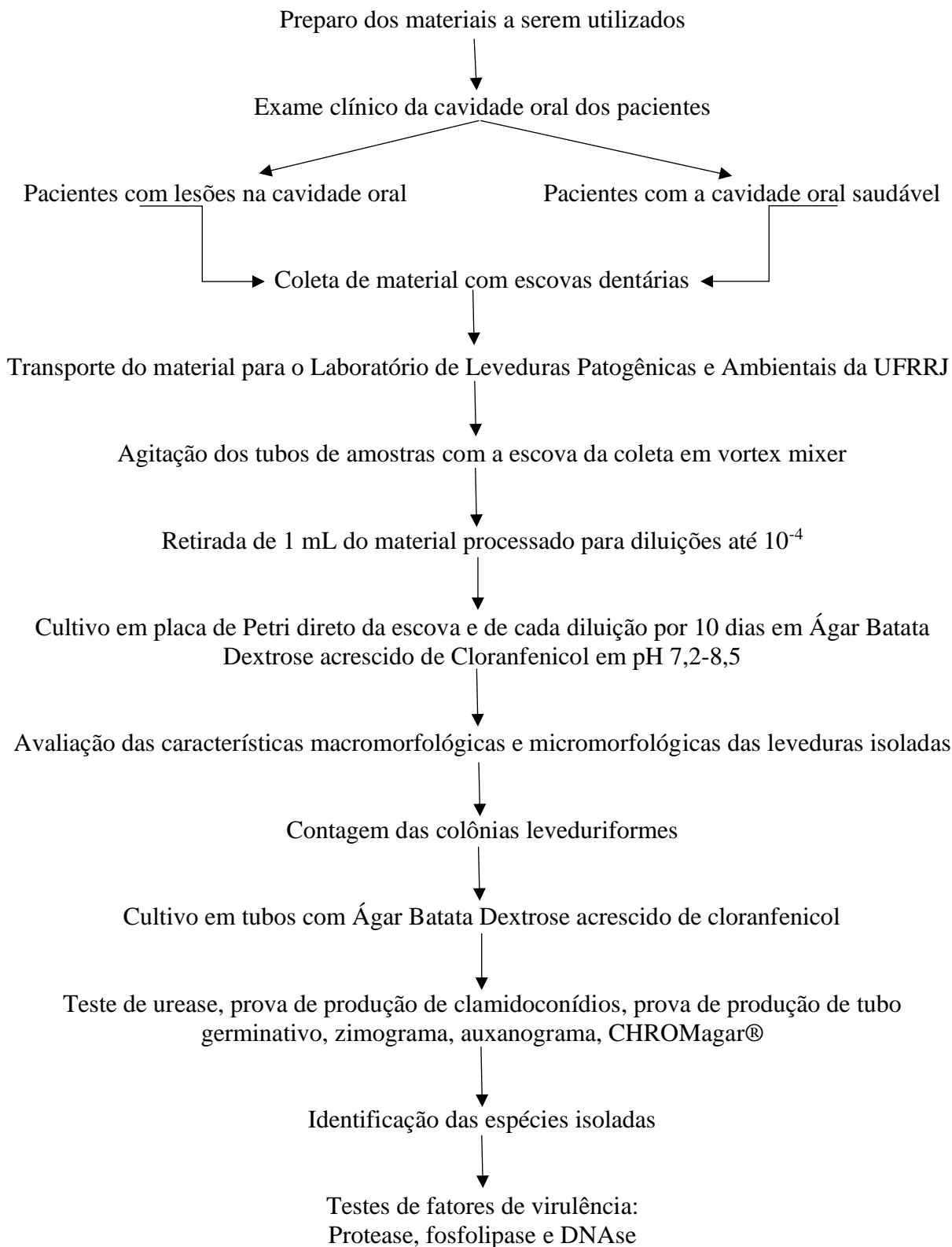
Visto que a membrana celular é composta por uma dupla camada de fosfolipídios, intercalados por proteínas, um dos exemplos de virulência microbiana é a ação de proteases e fosfolipases, que debilitam as funções celulares, favorecendo a invasão tecidual, sendo consideradas importantes fatores e indicadores da patogenicidade em microbiologia (COUTINHO e PAULA, 2000; ORTIZ et al., 2013).

Dentre as enzimas extracelulares, as proteases são enzimas que desempenham um papel importante na superação das barreiras imunológicas do hospedeiro. Já as fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídios por clivagem de uma ligação éster específica, com potencial de danificar a membrana celular do hospedeiro para posterior invasão (CAFARCHIA e OTRANTO, 2004; BENTUBO e GOMPERTZ, 2014; MONTOYA et al., 2020).

A desoxirribonuclease (DNase) é uma enzima extracelular responsável por clivar as ligações fosfodiéster presentes na molécula de DNA, amplamente estudada nas bactérias. Mais especificamente, as DNases podem estar envolvidas no crescimento e na maturação do biofilme, bem como na capacidade de escapar do sistema imunológico. Autores relatam dificuldades em testes de produção da DNase, principalmente durante a leitura de resultados e, por isso, novas técnicas como as que utilizam corridas em gel de agarose tem sido avaliadas para facilitar as interpretações (GERCEKER et al., 2009; HAAS et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma do Delineamento Experimental



3.2 Fase Pré-analítica

Ao escolher o material para a coleta, foi levado em consideração estudo feito por Santin (2009), que comparou duas diferentes técnicas de colheita da mucosa gengival, sendo uma invasiva com cureta e outra mais conservadora com swab, não constatando diferença entre as técnicas utilizadas. Para tanto, em fase pré-analítica, foram utilizadas diferentes técnicas para encontrar a que obtinha maior concentração de colônias, a fim de ter um maior aproveitamento e isolamento de leveduras. Devido a semelhança entre as técnicas com swab e cureta, optou-se pela avaliação menos invasiva do swab, juntamente com o papel filtro e a escova de dentes.

Ambas as técnicas passaram pelo mesmo procedimento de obtenção de amostra em áreas predefinidas da cavidade oral do cão (palato, parte superior da língua, frênulo, bochechas, mucosas gengivais, dentes e sulcos periodontais).

A coleta da saliva com swab e papel filtro foi realizada por fricção e a coleta com a escova por escovação dessas áreas descritas. Os isolados dos mesmos animais eram comparados para as diferentes técnicas e esperava-se a identificação dos mesmos patógenos em concentrações semelhantes. O isolamento das amostras coletadas foi realizado em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose acrescido de cloranfenicol e pH modificado para 7,2-8,5, semelhante ao da cavidade oral do cão saudável, como descrito por Bringel et al. (2020).

A técnica que demonstrou menor retenção e, consecutivamente, menor perda do montante, foi a da escova de dentes, apresentando maiores concentrações de patógenos e até mesmo a presença de leveduras em situações de menores concentrações, quando não havia detecção nas demais técnicas. Sendo assim, a escova dentária foi eleita para o presente trabalho como o instrumento de coleta.

3.2.1 Obtenção de amostras

Amostras de saliva foram coletadas da cavidade oral de 66 cães, a partir de um ano de idade, com auxílio de escovas de dente humana comerciais esterilizadas. Os animais utilizados para o fornecimento das amostras foram cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e atendidos em clínicas veterinárias particulares, como a Vetmaster Clínica Veterinária, localizada em Seropédica-RJ e a Emporium Veterinária, localizada em Itaguaí-RJ.

Os cães que apresentassem crescimento de leveduras eram divididos em dois grupos, sendo assim, 27 animais foram alocados no grupo 1 e 27 animais foram alocados no grupo 2. O primeiro grupo era composto por cães sem lesões e o segundo grupo composto por cães com lesões na cavidade oral, tais como cálculo dentário, halitose, sangramento, gengivite, estomatite, periodontite e fístulas dentárias, sendo necessária a apresentação de duas ou mais lesões para pertencer ao grupo em questão (Figura 1).

Estes animais foram selecionados aleatoriamente, dentro dos grupos predefinidos, para a coleta durante consultas ou procedimentos pré-agendados que nada tinham a ver com o estudo realizado. Não houve necessidade de intervenção farmacológica a fim de tranquilizá-los. Após o consentimento do tutor e a avaliação da cavidade oral do paciente, era iniciada escovação em áreas predefinidas da cavidade oral do cão: palato, parte superior da língua, frênulo, bochechas, mucosas gengivais, dentes e sulcos periodontais.

Posteriormente, as escovas utilizadas foram mergulhadas em tubos contendo 10 mL de solução salina estéril acrescida de cloranfenicol, o suficiente para que suas cabeças ficassem submersas, para solubilização da massa microbiana obtida e transporte das amostras de forma refrigerada até o Laboratório de Leveduras Patogênicas da UFRRJ, onde foram processadas.

O projeto foi enviado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Instituto de Veterinária – UFRRJ e protocolado sob o CEUA nº 5677060519.



Figura 1. (a e b) – cães do grupo 1, sem lesões na cavidade oral; (c e d) – cães do grupo 2. O cão da imagem (c) apresenta cálculo dentário, sangramento e formação sólida tumoral em gengiva. Já o cão da imagem (d) apresenta cálculo dentário, tecido de necrose em gengiva e fístula.

3.3 Isolamento de Cepas Clínicas

Os tubos de ensaio contendo as escovas utilizadas para coleta, conforme previamente descrito, foram submetidos a agitação em vórtex mixer durante 1 minuto. Posteriormente, a escova foi transferida para outros dois tubos contendo o mesmo volume de solução salina (10 mL) e agitados pelo mesmo período cronometrado, para a máxima retirada da massa microbiana da escova dentária.

Então, a escova foi comprimida levemente diversas vezes em placa de Petri de 90x15 mm antes de ser descartada. A placa em questão continha meio Ágar Batata Dextrose acrescido de Cloranfenicol com pH modificado para 7,2-8,5 por acréscimo de fosfato de potássio bibásico. As salinas mixadas dos 3 tubos submetidos ao vórtex foram misturadas para então ser retirado 1 mL para realização de diluições até 10^{-4} em tubos com salina estéril também acrescidos de cloranfenicol.

Uma alíquota de 1 mL de cada uma das diluições obtidas pela solubilização da massa microbiana foi semeada em diferentes placas de Petri do mesmo diâmetro, que também continham meio Ágar Batata Dextrose acrescido de Cloranfenicol com pH modificado. A alíquota foi dispersa pela placa com auxílio de alças estéreis descartáveis.

As placas foram incubadas em estufa BOD a 32 °C até visualização de colônias com características macromorfológicas de leveduras. Os cultivos com 15 dias sem evidência de crescimento foram considerados negativos. Após crescimento se procedeu análise das características coloniais e a contagem de colônias presentes na placa (Figura 2). Posterior a contagem, os isolamentos de múltiplas leveduras eram separados em diferentes placas de Petri de 90x15 mm a partir de cultivo por sequência de estrias para esgotamento de inóculos da alça.

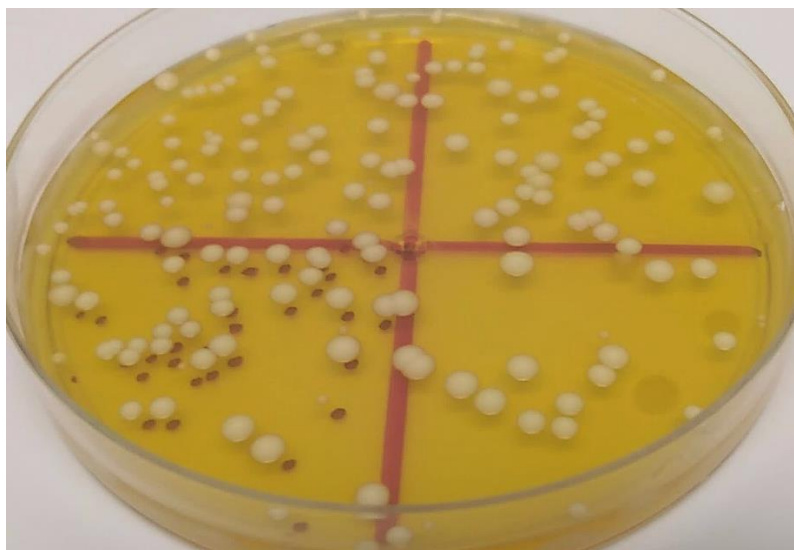


Figura 2. Placa de Petri apresentando crescimento colonial com características macromorfológicas de levedura; marcações indicativas da contagem manual das colônias.

3.4 Identificação Morfológica das Cepas

A caracterização macromorfológica das colônias leveduriformes foi realizada através da observação do crescimento destas em Ágar Batata Dextrose com cloranfenicol após incubação (Figura 3). Para tanto, foram avaliadas características do verso e anverso das colônias, bordas, consistência, coloração e textura.



Figura 3. Macromorfologia observada em levedura negra isolada.

A partir dos isolamentos foram realizados exames diretos de pequena porção dos cultivos, colocados entre lâmina e lamínula com lactofenol azul de algodão, clarificante KOH 20% e/ou nigrosina para a observação das características microscópicas compatíveis com leveduras, como tipo de brotamento, presença ou não de micélio e presença ou ausência de cápsula, utilizando aumento de até 1000x em óleo de imersão (Figura 4).

Após avaliação dos aspectos micromorfológicos das diferentes amostras, as cepas foram semeadas em tubos de ensaio contendo o mesmo substrato, sendo submetidas ao mesmo processo de incubação. Então, após crescimento em tubo, eram mantidas em refrigeração para sua conservação. Novos repiques eram feitos com intervalos mensais para manutenção das amostras até o término da pesquisa.

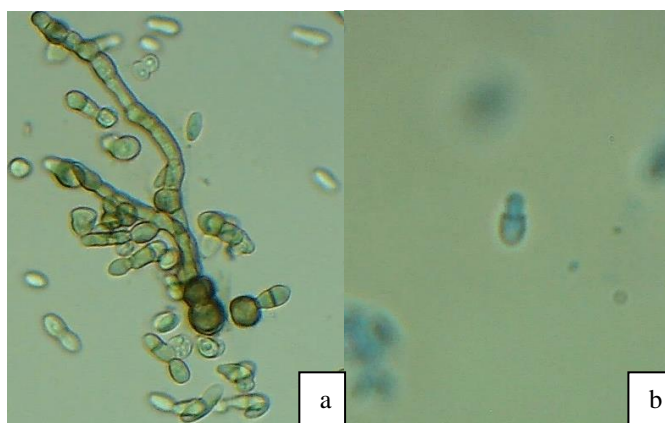


Figura 4. (a) – Levedura negra em microscopia direta com clarificante, aumento de 400x; (b) – *Malassezia pachydermatis* em microscopia direta com lactofenol azul de algodão, aumento de 1000x.

3.6 Testes de Identificação

Os testes foram baseados no Protocolo de Identificação de Leveduras do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais – DMIV – IV – UFRRJ e de acordo com o preconizado por Kurtzman e Fell (1998), iniciando-se a partir de testes de produção de urease, provas de produção de clamidoconídios, produção de tubo germinativo, provas de Auxanograma, Zimograma e, adicionalmente, semeadura em CHROMagar® para espécies do gênero *Candida*.

3.6.1 Urease

Para o teste de produção da enzima urease, foi utilizado o meio de Christensen ou meio ureia, que contém em sua composição uma substância indicadora de pH conhecida como Vermelho de Fenol. O meio foi preparado com distribuição em placas de Petri de 60x15 mm, cada amostra foi semeada na superfície do meio, incubando-se as placas a 32 °C, com observações diárias por até 7 dias.

As amostras positivas foram aquelas que, ao hidrolisarem a ureia, alteraram o pH de ácido para alcalino, fazendo com que o indicador de pH se revelasse, modificando a coloração do meio para a cor rosa choque, sendo positivo para a produção enzimática (Figura 5).

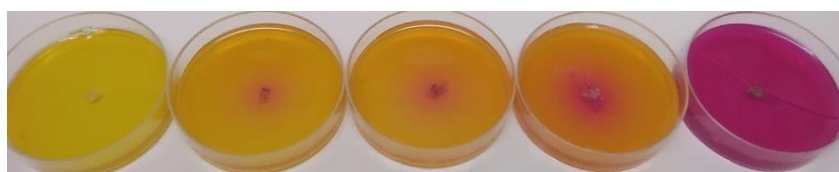


Figura 5. Placas de Petri com amostra negativa e positivas em diferentes escalas de revelação do pH.

3.6.2 Cultivo em ágar arroz

Através de isolados novos, com até 72h de crescimento em meio Ágar Batata Dextrose acrescido com cloranfenicol, foram retiradas porções para execução de microcultivo sob lamínula em substrato pobre nutricionalmente. Para isso, utilizou-se o meio Ágar Arroz ou Ágar Girassol em placas de Petri 60x15 mm, sendo adicionado o inóculo entre a superfície do meio de cultivo e a lamínula, com incubação a 32 °C por até 5 dias.

A partir das primeiras 24 horas, as placas foram focalizadas diretamente com aumento máximo de 400x para verificação da capacidade ou não de produção de clamidoconídios (Figura 6). Em casos positivos, estamos diante da possibilidade das espécies *Candida albicans*, *C. dubliniensis* ou *C. tropicalis*. A presença, no entanto, de estruturas como artroconídios levam-nos à possibilidade dos gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon* (KURTZMAN et al., 2011).

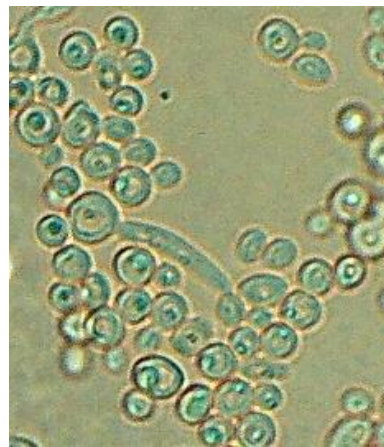


Figura 6. Formação de clamidoconídio por levedura do gênero *Candida* spp., aumento de 400x.

3.6.3 Cultivo em soro sanguíneo

A fim de identificar leveduras da espécie *Candida albicans*, foram semeados pequenas porções de culturas, com até 72h de crescimento, em frascos tipo eppendorf® esterilizados contendo 0,5mL de soro sanguíneo.

A suspensão foi incubada a 37 °C durante 3 horas em estufa microbiológica e, após esse período de incubação, intercalado por breves agitações dos frascos, retirou-se uma gota do soro e colocou-se sobre uma lâmina acrescida de nigrosina e coberta com uma lamínula para observação em microscópio com aumento de até 1000x. A constatação da capacidade de formação de tubo germinativo indica que o teste foi positivo e trata-se da espécie *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* (Figura 7).



Figura 7. Tubo germinativo – filamento fino e cilíndrico, originado de um blastoconídio. Observar que não há zona de constrição ao longo de sua extensão.

3.6.4 Auxanograma

Inicialmente, os inóculos foram colocados em tubos com solução salina estéril até atingir uma concentração final de 4 na escala de McFarland. Para o perfil assimilativo de carbono das leveduras foram utilizadas as seguintes fontes: Lactose, glicose, sacarose, melebiose, maltose, rafinose, trealose, ramnose, celobiose, galactose, inulina, melezitose, inositol, xilose, eritritol, dulcitol e arabinose.

O meio básico, isento de fontes carbonadas, foi vertido em placas de Petri de 90x15 mm com 2mL da suspensão de leveduras com a concentração ajustada. Após a solidificação do meio, em pontos equidistantes, próximos à parede da placa de Petri e específicos, previamente numerados, foram depositadas pequeníssimas porções de cada fonte carbonada descrita anteriormente.

As placas foram mantidas em BOD a 32 °C e as leituras realizadas a cada 24 horas durante 5 dias. Os testes foram considerados positivos para a fonte carbonada que apresentasse a formação de halo opaco, caracterizando assimilação da fonte (Figura 8).

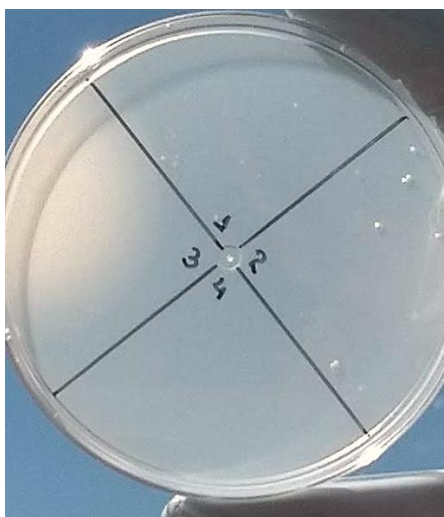


Figura 8. Presença de halo opaco, indicando capacidade de assimilação da fonte de número 3, correspondente à sacarose.

3.6.5 Zimograma

Leveduras variam em sua capacidade de fermentarem ou não fontes carbonadas. Nesta prova empregou-se uma bateria de 7 tubos de ensaio para cada amostra a ser testada. Os tubos receberam um meio base para fermentação acrescido de azul de bromotimol como indicador de produção de ácido e um tubo de Durham invertido, que possui a função de captar o gás, caso seja formado.

Os tubos foram esterilizados e ao final foram inoculados com a amostra a ser identificada. Em seguida, cada um dos 7 tubos, componentes da bateria de cada amostra, recebeu uma fonte carbonada diferente, estas previamente esterilizadas por filtração e, então, foram incubados a 32 °C, durante 15 dias.

A leitura de fermentação, para espécies pertinentes ao gênero *Candida*, levou em consideração a produção de gás visível pela apreensão de bolhas nos tubos de Durham (Figura 9). Para demais leveduras, considerou-se também a produção de ácido, verificada pela mudança da coloração de verde para o amarelo.



Figura 9. Evidência de testes positivos para fermentação, apresentando diferentes graus de formação de gás em tubo de Durham invertido.

3.6.6 CHROMagar® Candida

Este meio diferencial cromogênico foi utilizado a fim de identificar espécies de *Candida* spp. a partir das amostras clínicas, semeadas como estrias em placa de Petri de 60x15 mm contendo meio de cultura específico. A incubação foi realizada em estufa BOD a 32 °C, com leitura realizada em até 72 horas e acompanhamento diário.

A interpretação das cores seguiu o visto por Malik et al. (2018), as colônias de *C. albicans* apresentaram coloração verde de diferentes tonalidades, as colônias de *C. tropicalis* cor azul, as colônias de *C. glabrata* eram malvas, assim como *C. krusei*, que também apresentou tonalidades escuras de malva (Figura 10). As demais espécies possuem difícil diferenciação pelo teste, sendo necessárias outras abordagens.

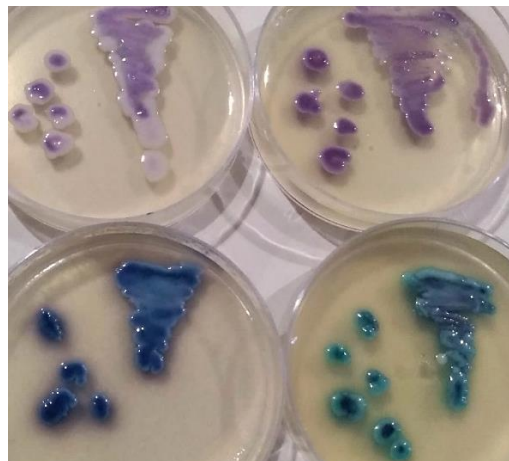


Figura 10. *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente, representadas no meio cromogênico.

3.7 Manutenção das Amostras

As leveduras foram armazenadas em temperatura entre 4 e 12 °C e repicadas em intervalos mensais como sugerido por Kurtzman e Fell (1998). As amostras foram repicadas em tubos contendo Ágar Batata Dextrose com adição de cloranfenicol e mantidas em refrigeração, sendo observadas periodicamente e repicadas até completa identificação.

3.8 Avaliação *In Vitro* de Fatores de Virulência

3.8.1 Protease

A pesquisa foi empregada em placa de Petri de 90x15 mm contendo meio de cultura para detecção de atividade da protease com isolamentos novos, com no máximo 72 horas de crescimento. O inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril, atingindo uma concentração final de 4 na escala de McFarland.

Cada amostra foi semeada na parte central da superfície do meio com auxílio de alça descartável estéril de 10µl, incubadas a 32 °C em estufa BOD e com leituras a partir das primeiras 96 horas a cada intervalo de 48 horas, por até 15 dias ou constância dos dados. A produção de protease foi verificada pela presença de uma zona de degradação proteica em torno da colônia (Figura 11).

O diâmetro da colônia e o diâmetro total compreendido pelo diâmetro do halo de hidrólise formado no entorno da colônia foram mensurados até que a razão entre as duas medidas mostrasse constância. Os valores foram utilizados para posterior cálculo da atividade enzimática (Pz). Todos os testes foram realizados em duplicatas em dias alternados.

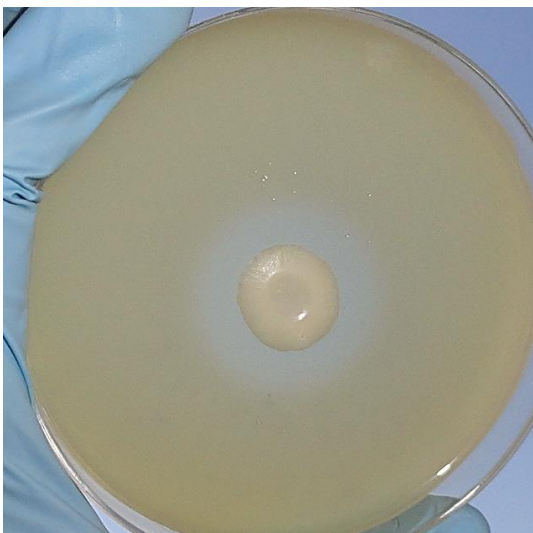


Figura 11. Presença de zona de degradação proteica em torno de uma colônia de *Candida* spp.

3.8.2 Fosfolipase

Para a detecção de atividade da fosfolipase, utilizou-se, em placa de Petri de 90x15 mm, um meio de cultura específico para detecção enzimática com isolamentos novos, com no máximo 72h de crescimento. O inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril, atingindo uma concentração final de 4 na escala de McFarland.

A semeadura das amostras foi feita de modo padronizado na superfície do meio, centralmente ao diâmetro da placa de Petri, com auxílio de alça descartável estéril de 10µl. A incubação ocorreu a 32 °C em estufa BOD com leituras a partir das primeiras 96 horas a cada intervalo de 48 horas, por até 15 dias ou constância dos dados. A produção de fosfolipase foi verificada pela presença de um halo de precipitação de CaCl₂ ao redor da colônia (Figura 12).

O diâmetro da colônia formada e o diâmetro total compreendido pelo diâmetro do halo de precipitação formado no entorno da colônia foram mensurados até que a razão entre as duas medidas mostrasse constância. Tais valores mensurados foram utilizados posteriormente para o cálculo da Pz. Todos os testes foram realizados em duplicatas em dias alternados.



Figura 12. Halo de precipitação de CaCl₂ em amostra de *Rhodotorula* spp.

3.8.3 DNase

A produção da enzima DNase foi identificada em placa de Petri de 90x15 mm com a utilização de meio de cultura específico para detecção enzimática com culturas novas, com no máximo 72h de crescimento. O inóculo das cepas foi preparado em solução salina estéril, atingindo uma concentração final de 4 na escala de McFarland.

As cepas foram semeadas na parte central do meio de modo padronizado com auxílio de alça descartável estéril de 10µl, com incubação a 32 °C em estufa BOD e leituras a partir das primeiras 96 horas a cada intervalo de 48 horas, por até 15 dias ou constância dos dados. O teste foi considerado positivo quando, após a adição de 5 N HCl para acidificação do meio, um halo de degradação com coloração acastanhada foi formado em torno da colônia (Figura 13).

O diâmetro da colônia formada e o diâmetro total compreendido pelo diâmetro do halo de degradação formado no entorno da colônia foram mensurados até que a razão entre as duas medidas mostrasse constância. Os valores mensurados foram utilizados posteriormente para o cálculo da Pz. Todos os testes foram realizados em duplicatas em dias alternados.

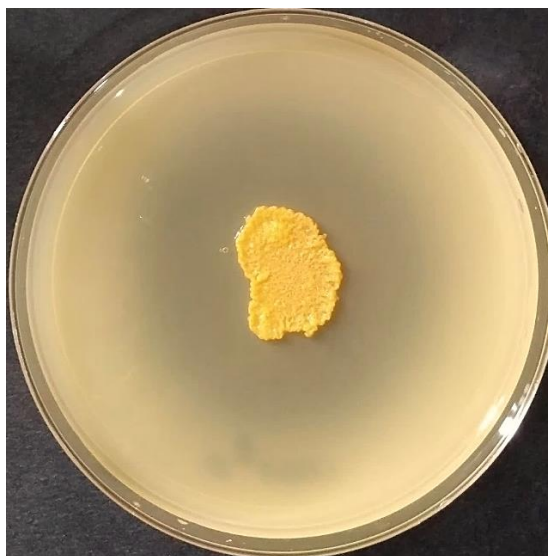


Figura 13. Halo de degradação após adição de acidificante indicando positividade do teste.

3.9 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática, denominada Pz, dos fatores de virulência quantitativos, é expressa através da razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro formado pela zona de precipitação (DCP) ou de degradação (DCD), realizados com as médias dos testes em duplicata. Os resultados definitivos para as enzimas pesquisadas foram classificados de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Atividade enzimática, adaptada de Price et al. (1982) por Ishida et al. (2012).

Pz	Grau de atividade enzimática
≥ 1.0	Negativa
$0.999 \geq 0.700$	Atividade baixa (+)
$0.699 \geq 0.400$	Atividade moderada (++)
$0.399 \geq 0.100$	Atividade alta (+++)

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística do trabalho foi realizada para comparar as atividades enzimáticas de cada fator de virulência realizado no trabalho (protease, fosfolipase e DNase) em cada um dos dois grupos avaliados, sendo o grupo 1 composto por cães sem lesões na cavidade oral e o grupo 2 composto por cães com lesões na cavidade oral.

O Teste T de Student foi utilizado para a avaliação das médias aritméticas de Pz e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para a avaliação da atividade enzimática por qualificação (negativa, baixa, moderada e alta), ambas relacionadas com cada grupo estudado, em conjunto com gráficos de distribuição do tipo em barras com as médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o presente trabalho recolheu amostras de 66 cães, observando o crescimento de leveduras em 54 (81, 82%) dos animais. Foram excluídas das análises as amostras dos 12 (18,18%) cães que não apresentaram leveduras na cavidade oral, por não se alocarem no estudo.

Os 54 cães utilizados no experimento foram divididos em dois grupos após avaliação da saúde da cavidade oral. O grupo 1, sem lesões na cavidade oral, contava com 27 cães e, o grupo 2, com lesões na cavidade oral, contava também com 27 cães. Ao todo foram isoladas e identificadas 68 amostras com leveduras, sendo 33 pertencentes ao grupo 1 (48,53%) e 35 pertencentes ao grupo 2 (51,47%).

O crescimento de leveduras nos animais inicialmente utilizados (81, 82%) foi maior do que o descrito por Santin (2009), que isolou leveduras de 30 (50,85%) das 59 fêmeas caninas errantes utilizadas em seu trabalho. A diferença notável pode ter ocorrido pela divisão dos grupos estudados, sendo utilizadas apenas fêmeas errantes sem raça definida para o trabalho de Santin (2009), enquanto para este foram utilizados cães sem distinção de gênero ou raça e encaminhados para visitas clínicas pelos tutores. Esse acontecimento pode indicar uma predisposição sexual, já que este estudo contou com o isolamento de leveduras predominantemente no gênero oposto 35/54 (72,22%).

O número de leveduras isoladas nos animais utilizados para essa pesquisa também foi maior, Santin (2009) descreveu o isolamento de 61 leveduras, enquanto o presente trabalho isolou 68 leveduras. O número de cães utilizados nos estudos pode ter colaborado para a divergência desses dados, tendo em vista que no trabalho de Santin (2009) a quantidade total das leveduras foi isolada de 30 cães e, no presente estudo, de 54 cães.

Todos os cães, dos quais foram possíveis o isolamento de leveduras da cavidade oral, passaram por uma avaliação clínica para anotação de informações que poderiam ser passíveis às infecções oportunistas. O mesmo cão utilizado nesta pesquisa, representado por um número de amostra, pode apresentar mais de um micro-organismo fúngico, como foi demonstrado a partir do mesmo número de amostra com números complementares em sequência.

A presença de leveduras na cavidade oral do animal sem causar danos é um indicativo de que elas são parte daquela microbiota. São necessários, no entanto, estudos para a caracterização destes micro-organismos com descrições sobre a origem das amostras. De acordo com Sales (2019) os principais fatores de predisposição a infecções oportunistas em animais estão relacionados a fatores nutricionais, sanitários, idade, comorbidades, corticoterapias, antibioticoterapias, uso de dispositivos médicos e procedimentos médicos invasivos, sendo boa parte desses fatores corriqueiros na veterinária.

Embora Rajkowska e Kunicka-Styczynska (2018) e Sales (2019) tenham relatado possível influência alimentar para a constatação de espécies do gênero *Candida* spp., o presente trabalho não demonstrou dados que sugerissem a presença de leveduras por origem alimentar. A ocorrência em produtos comercializados descrita pelos primeiros autores citados pode ser justificada pelo armazenamento ou práticas de higiene, ainda que metade das cepas isoladas tenham apresentado similaridade com espécies clínicas de *Candida albicans*.

O risco desses patógenos oportunistas deve ser avaliado na presença de contaminação pela ingestão comprovada desses produtos. Sales (2019) fez a suposição após evidenciar diferentes prevalências em animais com diferentes hábitos alimentares, o que pode ser influenciado apenas pela microbiota individual desses seres e precisa ser esclarecido.

Deve-se levar em consideração também, quanto à ocorrência desses patógenos, a cultura de visitas às clínicas veterinárias apenas na presença de alterações sintomatológicas. Sendo

assim, os animais recebidos, em sua maioria, já apresentam algum fator de predisposição a infecções oportunistas. Considerando que a maior parte dos isolados deste estudo foram coletados de animais internados em clínicas particulares, deve-se partir do princípio de que eram cães susceptíveis, pois havia comorbidade, dispositivos médicos estavam sendo utilizados e, muitos deles, estavam fazendo uso de antibióticos no tratamento.

Apesar dos relatórios sobre candidíase disseminada em cães relatarem, na maior parte, pelo menos um fator predisponente, Willems et al. (2017) relataram um caso de candidíase gerando inflamação crônica piogranulomatosa necrosante em cão jovem e saudável, sem fatores de predisposição, progredindo ao óbito. Esse fato acende um alerta para infecções oportunistas negligenciadas, que já apresentaram potencial de acometimento de pacientes hígidos e podem ser subdiagnosticadas.

O presente trabalho poderá auxiliar no diagnóstico precoce de afecções fúngicas relacionadas a cavidade oral do cão, porém, pouco contribuirá para a avaliação em animais hígidos, considerando a cultura de visitas às clínicas veterinárias apenas em casos de doenças e a origem das amostras. Por isso, recomenda-se pesquisa mais ampla com estudos de acometimentos em animais saudáveis. Os detalhes da origem de cada amostra clínica coletada nesse trabalho e os isolados de cada grupo estão demonstrados resumidamente na tabela 2.

Tabela 2. Detalhes da origem das amostras clínicas e classificação por grupo (continua).

Animal (gênero)	Raça	Histórico	Idade	Grupo	Amostra	Identificação
Rutra (M)	SRD	Castração	5a	1	C001	<i>C. krusei</i>
Ninito (M)	SRD	Cinomose	4a	2	C002	<i>C. glabrata</i>
Snoopy (M)	Shar-pei	Parvovirose	1a	1	C003	<i>C. albicans</i>
Jhow (M)	Shar-pei	Parvovirose	1a	1	C004-1	<i>C. krusei</i>
				1	C004-2	<i>Rhodotorula spp.</i>
Rex (M)	SRD	Fratura	3a	1	C005	<i>C. albicans</i>
Layka (F)	Rottweiler	Castração	4a	1	C006	<i>Geotrichum spp.</i>
Bardot (F)	Bulldogue francês	Pós-operatório	3a	1	C007-1	<i>C. krusei</i>
				1	C007-2	<i>Rhodotorula spp.</i>
Romeu (M)	Yorkshire	Intoxicação	2a	1	C008	<i>C. krusei</i>
Leão (M)	SRD	Parvovirose	1a	1	C009	<i>M. pachydermatis</i>
Fred (M)	Poodle	Pós-operatório	3a	1	C010	<i>C. lusitaniae</i>
Scott (M)	Yorkshire	Intoxicação	1a	1	C011	<i>M. pachydermatis</i>
Fox (M)	SRD	Melanoma	5a	2	C012	<i>C. lusitaniae</i>
Magrelo (M)	SRD	Cinomose	2a	1	C013-1	<i>C. albicans</i>
				1	C013-2	<i>Rhodotorula spp.</i>
Peludinho (M)	SRD	Hemoparasitose	8a	2	C014-1	<i>C. glabrata</i>
				2	C014-2	<i>M. pachydermatis</i>
Ravena (F)	SRD	Hemoparasitose	2a	1	C015-1	<i>C. glabrata</i>
				1	C015-2	<i>M. pachydermatis</i>
Maylon (M)	Shih-tzu	Pós-operatório	10a	2	C016-1	<i>C. glabrata</i>
				2	C016-2	<i>M. pachydermatis</i>
Pretinha (F)	SRD	Fraturas	2a	1	C017	<i>M. pachydermatis</i>
Hully (F)	AmStaff	Trauma em crânio	3a	1	C018	Levedura negra
Hulk (M)	SRD	Obstrução uretral	5a	1	C019	<i>M. pachydermatis</i>
Flora (F)	Pug	Castração	2a	1	C020	<i>Geotrichum spp.</i>
Kiko (M)	Labrador	Atropelamento	11a	2	C021	<i>C. albicans</i>
Bob (M)	SRD	Ataque/mordida	4a	1	C022	<i>M. pachydermatis</i>
Rosa (F)	SRD	Atropelamento	7a	2	C023	<i>M. pachydermatis</i>
Neném (M)	Pinscher	Cinomose	3a	1	C024	<i>Trichosporon spp.</i>
Rudá (M)	SRD	Gastroenterite	3a	1	C025	<i>M. pachydermatis</i>
Fiora (F)	Pit bull	Corpo estranho	2a	1	C026	<i>M. pachydermatis</i>
SEMEV (M)	SRD	Hérnia cervical	9a	2	C027	<i>Rhodotorula spp.</i>
Spot (M)	SRD	Cinomose	9a	2	C028	<i>C. tropicalis</i>

Meg (F)	Shih-tzu	Ataque/mordida	2a	1	C029-1	<i>Trichosporon</i> spp.
				1	C029-2	<i>M. pachydermatis</i>
Bob (M)	Labrador	Fratura	2a	1	C030	<i>M. pachydermatis</i>
Boiadeiro (M)	Border Collie	Neurológico	4a	1	C031	<i>C. tropicalis</i>
Xexeca (F)	SRD	Neoplasias	12a	2	C032	<i>M. pachydermatis</i>
Mel (F)	SRD	BOG MOG	13a	2	C034	<i>M. pachydermatis</i>
Atena (F)	SRD	Mastectomia	14a	2	C035	<i>M. pachydermatis</i>
Mel (F)	SRD	Castração	6a	1	C036	<i>M. pachydermatis</i>
Hulk (M)	SRD	Traqueostomia/TVT	12a	2	C040	<i>C. albicans</i>
Duque (M)	Dogue alemão	Tartarectomia	8a	2	C041	<i>Geotrichum</i> spp.
Lobinha (F)	Poodle	DPS	5a	2	C042	<i>M. pachydermatis</i>
Baby (F)	Dachshund	Hepatopatia e DRC	12a	2	C043-1	<i>Geotrichum</i> spp.
				2	C043-2	<i>C. lusitaniae</i>
Kiko (M)	SRD	DRC	13a	2	C044	<i>C. famata</i>
Sadan (M)	Pit bull	DRC	7a	2	C045	<i>C. famata</i>
Júnior (M)	Poodle	DRC	9a	2	C046	<i>Geotrichum</i> spp.
Snoopy (M)	SRD	Hemoparasitose	10a	2	C047	<i>Geotrichum</i> spp.
Marley (M)	SRD	Cardiopatia	8a	2	C048-1	<i>C. lusitaniae</i>
				2	C048-2	<i>M. pachydermatis</i>
Beethoven (M)	SRD	DRC	15a	2	C049-1	<i>C. glabrata</i>
				2	C049-2	<i>Geotrichum</i> spp.
Ariel (F)	Terrier brasileiro	DRC	12a	2	C050	<i>Geotrichum</i> spp.
Bily (M)	Dachshund	Hemoparasitose	7a	2	C051-1	<i>C. glabrata</i>
				2	C051-2	<i>M. pachydermatis</i>
Ralf (M)	SRD	Check-up	7a	2	C052-1	<i>M. pachydermatis</i>
				2	C052-2	Levedura negra
Jade (F)	SRD	Atropelamento	4a	2	C053	<i>Geotrichum</i> spp.
Taurus (M)	Pit bull	Check-up	1a	1	C054-1	<i>C. tropicalis</i>
				1	C054-2	<i>M. pachydermatis</i>
Thor (M)	Pit bull	Check-up	6a	2	C055-1	<i>M. pachydermatis</i>
				2	C055-2	<i>Rhodotorula</i> spp.
Jujuba (F)	SRD	Neurológico	2a	1	C056	<i>Geotrichum</i> spp.
Petrus (M)	SRD	DRC	9a	2	C057	<i>M. pachydermatis</i>
Maya (F)	Fila-brasileiro	Atropelamento	4a	2	C058	<i>Geotrichum</i> spp.

*C. = *Candida*; M.= *Malassezia*.

**1 e 2 = grupos de cães estudados.

A antibioticoterapia, um dos fatores de predisposição descritos, aumenta o risco de infecções fúngicas superficiais ou sistêmicas, por alterar o equilíbrio natural da microbiota, permitindo o supercrescimento e a infiltração fúngica, mesmo através da mucosa intacta. Tratamentos que podem danificar a mucosa gastrointestinal também podem permitir a passagem de leveduras através da membrana para a corrente sanguínea e consequente disseminação sistêmica.

Em relação a totalidade de cães utilizados, podendo um cão ter mais de um fator predisponente, foi observado neste estudo que 66,67% dos cães que apresentaram isolamento de leveduras estavam passando por antibioticoterapia no momento da coleta, 68,52% dos cães apresentavam comorbidades e 74,07% passaram por procedimentos invasivos ou utilizaram dispositivos médicos.

Alves et al. (2020) descreveram três acometimentos sistêmicos por *Candida* spp. em cães diagnosticados com cinomose e com sintomatologia neurológica. É provável que o patógeno oportunista tenha se aproveitado da condição viral de imunossupressão para disseminação hematogênica, comprovada pelas extensas lesões vasculares associadas à levedura na luz e parede vascular dos órgãos afetados, causando infartos agudos. Nosso trabalho evidenciou pelo menos 14,81% dos cães com leveduras na cavidade oral e sabidamente com

acometimentos virais, estando esses cães susceptíveis a acometimentos sistêmicos em caráter da imunossupressão.

Muitos anos se passaram desde que Forsblom et al. (1997) e Goldstein (1992) relataram a dificuldade do tratamento das infecções de feridas por mordedura de animais em seres humanos, principalmente devido à falta de conhecimento sobre a composição exata da microbiota comensal da cavidade oral canina. Acredita-se em altos níveis de resistência por micro-organismos comumente encontrados nas lesões, sendo necessária a adoção de terapêuticas adequadas.

Dois cães neste trabalho foram encaminhados para o atendimento por terem sofrido ataques de animais maiores. Montrose et al. (2020) relataram que em metade desses incidentes os tutores dos animais atacados acabam sofrendo ferimentos também. O conhecimento da microbiota oral de cães permite estabelecer prováveis patógenos envolvidos nas infecções de feridas por mordidas em animais e seres humanos, assim como em infecções de feridas cirúrgicas de cães pelo próprio paciente e, conseqüentemente, permite também orientar na escolha do melhor tratamento. Para tanto, são necessários estudos que correlacionem os micro-organismos das feridas do animal ou humano atacado e da cavidade oral do animal que atacou.

É possível afirmar que a maioria dos cães internados em clínicas veterinárias estão em risco de infecções oportunistas devido aos fatores de imunossupressão apresentados por eles. Os cães utilizados nessa pesquisa, em sua maioria, eram pacientes internados ou com comorbidades e, logo, predispostos a acometimentos de micro-organismos comensais inicialmente inofensivos, que podem se tornar patógenos potencialmente fatais.

O grupo dois do nosso trabalho foi composto apenas por cães a partir de quatro anos, fato de acordo com Santin (2009), que descreveu as periodontopatias como as principais enfermidades infecciosas, acometendo cerca de 80% dos cães, geralmente iniciando a partir dos quatro anos de idade. A maior parte dos cães desse grupo já eram animais senis, com mais de sete anos, compreendendo 22/27 (81,48%) dos componentes do segundo grupo.

Embora tenham sido encontrados números consideráveis de isolados leveduriformes nos cães dessa nossa pesquisa, acredita-se que o número de isolamentos possa ser ainda maior. Frias et al. (2018) demonstraram que algumas bactérias presentes na cavidade oral ainda não eram cultiváveis pelos métodos convencionais, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares para a sua identificação. É possível que algumas leveduras não tenham sido identificadas devido aos métodos de cultivo utilizados não serem adequados ao crescimento delas, assim como ocorreu com as bactérias. Existe também a possibilidade de inibição do crescimento microbiano, por fatores individuais ou pela ocorrência de proliferações mistas.

Os estudos sobre leveduras componentes da cavidade oral do cão ainda são escassos, porém, acredita-se numa microbiota diversa, que em condições favoráveis causa acometimentos secundários. Foram identificadas neste trabalho 11 leveduras diferentes em nível de gênero e espécie, quando possível, divididas em *Malassezia pachydermatis* (35,29%), *Geotrichum* spp. (16,18%), *Candida glabrata* (8,82%), Complexo *Candida albicans* (7,35%), *Rhodotorula* spp. (7,35%), *Candida lusitaniae* (5,88%), *Candida krusei* (5,88%), *Candida tropicalis* (4,41%), *Candida famata* (2,94%), leveduras negras (2,94%) e *Trichosporon* spp. (2,94%). As leveduras isoladas estão descritas em quantidade de isolados a seguir, na tabela 3.

Tabela 3. Micro-organismos isolados através de amostras de saliva de cães com e sem lesões na cavidade oral (continua).

Leveduras identificadas	Total
<i>Malassezia pachydermatis</i>	24
<i>Geotrichum</i> spp.	11
<i>Candida glabrata</i>	6
Complexo <i>Candida albicans</i>	5

<i>Rhodotorula</i> spp.	5
<i>Candida lusitaniae</i>	4
<i>Candida krusei</i>	4
<i>Candida tropicalis</i>	3
<i>Candida famata</i>	2
Leveduras negras	2
<i>Trichosporon</i> spp.	2

Quanto à identificação das leveduras, pode-se afirmar, que as características macro e micromorfológicas são insuficientes para a classificação das leveduras, sendo sugerido o implemento de técnicas moleculares, principalmente para um diagnóstico preciso em casos de infecções mistas ou incomuns.

Uma das leveduras que ganha destaque quando falamos sobre fatores de predisposição é *Malassezia pachydermatis*, citada, por exemplo, em problemas relacionados com alterações físicas, químicas e imunológicas do hospedeiro. Além dela, se destacam espécies do gênero *Candida* spp., frequentemente relatadas em casos de infecções em humanos, sendo o agravo, na maioria dos relatos, dependente de fatores imunológicos do hospedeiro. Ambas foram descritas por Brito et al. (2009) como componentes do grupo de leveduras mais comumente isoladas da mucosa de cães saudáveis.

As leveduras *Malassezia pachydermatis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. famata*, *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. e *Aureobasidium pullulans*, uma espécie de levedura negra, já foram descritas anteriormente como componentes da mucosa oral do cão por Brito et al. (2009), Santin (2009) e Navarro (2016). Fatos que estão de acordo com as leveduras encontradas em nosso trabalho.

É importante levar em consideração que a levedura mais encontrada na cavidade oral dos animais nesta pesquisa, *Malassezia pachydermatis*, é isolada quase igualmente em animais doentes e sem sintomas clínicos de doença e foi descrita recentemente por Rhimi et al. (2020) como a espécie mais comum em animais. A mesma levedura já havia sido relatada como frequente na cavidade oral por Ortiz et al. (2013) e por Santin (2009). Esta última autora, assim como nós, demonstrou em sua pesquisa uma maior frequência de *Malassezia pachydermatis* entre os isolados da cavidade oral. O que não foi relatado por Navarro (2016), que demonstrou a mesma levedura como a menos frequente nas amostras testadas, sendo a maioria dos seus isolamentos compostos por espécies do gênero *Candida*.

O diagnóstico preciso das infecções causadas por estas leveduras é um desafio, pois o isolamento pode não equivaler à identificação do agente etiológico da infecção. Entretanto, seu potencial de transmissão zoonótica não deve ser ignorado, como descrito por Marín et al. (2018), que verificaram isolados de *Malassezia pachydermatis* de caninos e de seus proprietários com comportamento semelhante em testes bioquímicos, atividade de fosfolipase, identidades de sequência molecular e proximidade nas árvores filogenéticas, indicando a capacidade dessa espécie de se adaptar a novos hospedeiros.

Reforçando seu potencial zoonótico, existem relatos de infecções sistêmicas em humanos adultos e neonatos com comorbidade e em terapia intensiva. Tendo em vista que os casos não são relatados com presença de contactantes animais, hipoteticamente Huang et al. (2020) sugeriram que estariam associados à utilização de cateter intravascular, infusão lipídica, transmissão da mãe, práticas higiênicas precárias por profissionais de saúde, persistência do patógeno em recintos ou lençóis e uso de antifúngicos para prevenção de *Candida* spp. promovendo infecções resistentes.

Nos cães, embora a espécie seja encontrada frequentemente na microbiota, os métodos de sua manifestação e influência no organismo do hospedeiro precisam de esclarecimentos. Pesquisas sobre a patogenicidade de *M. pachydermatis* não são conclusivas sobre ser

condicionada por fatores dependentes do hospedeiro ou por mecanismos de virulência independentes, sendo assim, Czyzewska et al. (2019) criaram duas hipóteses. A primeira seria a de que a levedura desempenha um papel oportunista típico e a infecção se desenvolve como resultado de distúrbios da homeostase do hospedeiro. A segunda seria a de que cepas tipicamente comensais com características específicas em combinação com condições relacionadas à condição fisiológica do hospedeiro permitem a indução da infecção.

Rhimi et al. (2020) sugeriram que a interpretação da literatura disponível sobre este tópico deve ser feita com cautela, pois a variação entre os estudos pode ser o resultado de diferenças na metodologia adotada, tais como o número de indivíduos estudados, tamanho dos grupos, método de identificação, extração de DNA, seleção da região-alvo e condições de PCR, processamento e interpretação de dados. E, ainda, diferenças geográficas e específicas do hospedeiro poderiam explicar as discrepâncias nos estudos. Múltiplos genótipos de uma espécie podem colonizar o mesmo paciente, mas alguns tipos genéticos podem estar ligados a um determinado local do corpo ou patologia, indicando assim uma afiliação dos genótipos de *Malassezia* spp. com o hospedeiro, origem geográfica e/ou manifestações clínicas.

Neste trabalho, *Malassezia pachydermatis* foi identificada através do substrato de crescimento, tendo em vista que é uma levedura não dependente de lipídio e cresce no meio de cultivo sem adição de fonte lipídica, diferente das demais espécies, que necessitam de adição exógena de lipídios para o crescimento em SDA, como relatado por Lee et al. (2019).

Alguns autores propõem que a densidade do fungo na pele, bem como a competência imunológica do hospedeiro, podem ser fatores determinantes que influenciam seu papel patogênico. Recentemente, o tipo de infusão lipídica, as fontes de luz da fototerapia, a colocação do cateter venoso central e o fluconazol profilático foram propostos por Rhimi et al. (2020) como fatores de risco que afetam a colonização e/ou fungemia por *Malassezia* spp. mais do que *Candida* spp.

Os mesmos autores relataram o fato da população de *M. pachydermatis* aumentar de acordo com a presença de lesões cutâneas, não apenas em áreas afetadas da pele, mas também em outros locais sem lesões cutâneas detectáveis, sugerindo que as leveduras poderiam ser facilmente transmitidas de um local para outro devido ao prurido. Fato que pode ter ocorrido no presente trabalho, já que os cães possuem hábito de se morder e lamber em quadros pruriginosos.

Ainda que o isolamento do patógeno seja semelhante em animais saudáveis e com lesões decorrentes desta levedura, em estudo de Gagana et al. (2021) a espécie *Malassezia pachydermatis* não mostrou, em análise estatística, significância na diferença da formação de biofilme avaliada entre animais doentes e do grupo controle. Logo, concluíram que o micro-organismo independentemente de ter causado infecção no animal ou ter permanecido como comensal mantém o potencial de produzir o fator de virulência em vários níveis.

Dentro do gênero *Candida* spp., *Candida glabrata* foi a espécie mais isolada, seguida do complexo *Candida albicans* e outras espécies de NAC. *Candida glabrata*, terceira levedura mais encontrada no estudo, foi eleita a segunda mais comum do gênero presente em infecções sanguíneas de acordo com Silva et al. (2012). Além disso, é uma levedura caracterizada pela dificuldade terapêutica, por ter a prevalência em infecções justificada pela sua maior tolerância inata aos antifúngicos azólicos. Junto disso, *Candida glabrata* possui o maior potencial para desenvolver resistência aos medicamentos utilizados na rotina clínica, como descrito por Ames et al. (2017), merecendo atenção quanto à transmissão para humanos.

C. krusei também é uma outra preocupação particular nossa como patógeno oportunista por sua resistência intrínseca ao fluconazol, medicamento comumente utilizado para tratamento profilático antifúngico de longo prazo de indivíduos imunocomprometidos, como foi notificado

por Douglass et al. (2018). Sendo assim, é reforçada a necessidade de identificação das espécies dentro do gênero para a melhor escolha terapêutica.

Considerando o surgimento de novas resistências, situação preocupante, a identificação precoce torna-se ainda mais necessária. Além da necessidade de administrar antifúngicos de forma criteriosa, evitando tratamentos anteriores ao diagnóstico ou o uso excessivo, considerando a possibilidade de formação de um patógeno multirresistente, representando uma ameaça global.

Além das técnicas de auxanograma e zimograma realizadas, para auxiliar na identificação, este estudo utilizou para espécies de *Candida* o meio CHROMagar®. Para tanto, foi seguida a interpretação das cores vistas por Malik et al. (2018). As colônias de *C. albicans* apresentaram coloração verde e as colônias de *C. tropicalis* cor azul, sendo ambas facilmente visualizadas. Quando tratava-se das colônias de *C. glabrata* e *C. krusei*, porém, a identificação de cor era mais subjetiva. Portanto, outros testes de identificação devem ser utilizados complementarmente para a divisão das espécies do gênero.

Neste trabalho foi utilizada a classificação complexo *Candida albicans* devido as espécies do complexo apresentarem alto grau de semelhanças morfológicas e bioquímicas, possuindo características como diferenças quanto à termotolerância, assimilação bioquímica e diferentes demonstrações de tonalidades em meio cromogênico, que podem gerar confusão na diferenciação. Portanto, são melhor diferenciadas geneticamente, através de técnicas moleculares, não utilizadas no trabalho.

O complexo *Candida albicans*, quarto mais isolado do estudo e segundo mais isolado do gênero, foi relatado em 2006 por Jadhav e Pal como levedura implicada em casos de estomatite ou gengivite, presente em 11,8% dos 34 cães que apresentavam anorexia, halitose, sangramento oral, disfagia, ptialismo ou adenopatia submandibular. Fato esse que justifica não só a necessidade de uma melhor inspeção e identificação dos micro-organismos da cavidade oral do cão, mas também o fato da possível associação fúngica ligada a sintomas comumente vistos na clínica veterinária, podendo existir um subdiagnóstico por falta de suspeita.

Dentro das espécies de NAC isoladas do gênero *Candida*, *Candida famata* e *C. lusitaniae* são raramente relatadas em casos de fungemia no homem, porém, ganharam espaço no isolamento das leveduras da cavidade oral do cão e devem estar incluídas nas investigações de afecções desta origem.

Candida tropicalis foi apontada como uma espécie de alta patogenicidade em estudos importantes, sendo comparada a *C. albicans*. Esta levedura apresentou diferentes mecanismos de virulência, como a morfogênese para uma forma pseudo-filamentosa, permitindo a adaptação rápida às mudanças no hospedeiro, sendo as cepas incapazes de produzir filamentação causadoras de danos celulares reduzidos como descrito por Silva et al. (2012) e Arias et al. (2019). Foi demonstrado também um grande grau de variação por Deorukhkar et al. (2014), não apenas em sua patogenicidade, mas também em seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos.

Embora geralmente tenha sido assumido que as espécies não-*albicans* de *Candida* spp. são menos patogênicas do que *Candida albicans*, em parte por não filamentosas, faltam evidências definitivas. Kadosh e Mundodi (2020) descreveram em estudo recente que a filamentação de NAC poderia estar associada a uma patogenicidade reduzida, em vez de aumentada. Essas descobertas, por sua vez, desafiam as visões convencionais e sugerem que existem diferenças evolutivas fundamentais na relação morfologia-patogenicidade entre *C. albicans* e as espécies NAC, que precisam ser mais bem observadas.

Em nível de gênero, *Geotrichum* e *Trichosporon* apresentaram semelhança considerável em microscopia, devido a visualização de artroconídios e ramificações em ambos. Em nossa pesquisa, a produção de tubo germinativo único a partir de uma extremidade do artroconídio,

apresentada por De Hoog et al. (2014) como característica de *Geotrichum* não se demonstrou uma simples forma de distinção, embora a incapacidade de produção de urease tenha sido útil.

As leveduras negras não foram distinguidas no presente trabalho devido à falta de técnicas para a caracterização, presente em literatura disponível e adotadas pelo laboratório de identificação. De Hoog et al. (2014) descreveram que o potencial patogênico delas determina em grande parte se a cepa sob consideração é o possível agente etiológico ou se deve ser descartada como um provável contaminante.

Mais tarde, Lavrin et al. (2020) detalharam que infecções típicas pela levedura negra *E. dermatitidis* são vistas em hospedeiros imunocomprometidos e a sua patogenicidade provavelmente se deve a vários fatores de virulência, além da pigmentação da melanina, termotolerância e polimorfismo. Portanto, em nosso trabalho, estudamos o potencial patogênico de todas as leveduras isoladas através dos testes de virulência *in vitro* testados.

A identificação das leveduras negras, apesar de não distinguidas em nosso trabalho, poderia nos levar ao *Aureobasidium pullulans*, já descrito anteriormente como micro-organismo pertencente a cavidade oral do cão por Navarro (2016). Embora essa levedura tenha sido citada como parte da microbiota oral do cão, deve-se considerar a presença em rações, que foi descrita por Zalar et al. (2008) e pode ser uma possibilidade para esse isolamento.

A identificação das leveduras negras poderia nos levar ainda ao responsável pela feohifomicose e cromobastomicose, *Exophiala dermatitidis*. Caso feita, a identificação de *Exophiala dermatitidis* seria um importante achado devido sua característica infecção por inoculação traumática descrita por De Hoog et al. (2014) e Castillo et al. (2020). Fato relevante quando consideramos que os isolados eram originados da cavidade oral de cães, que são animais frequentemente descritos em acidentes de mordeduras de humanos.

Outro gênero identificado pelo trabalho na cavidade oral do cão foi *Rhodotorula* spp., muitas vezes mencionada como contaminante laboratorial ou fungo de baixa virulência. Ressalta-se que a mesma já foi descrita em infecções clínicas em humanos e animais, além de ter no gênero a terceira levedura mais isolada das hemoculturas e ser o micro-organismo mais comum nas mãos de funcionários e pacientes de hospitais segundo Jarros et al. (2020). Nosso trabalho contou com a avaliação dos fatores de virulência das cepas isoladas a fim de esclarecer sua patogenicidade.

Durante a pesquisa foi realizada a contagem colonial do isolamento inicial nas diferentes diluições feitas a partir das escovas de dentes e das lavagens realizadas (tabela 4). Via de regra as unidades formadoras de colônia apresentaram decréscimo no aumento da diluição, como esperado. Em alguns casos, no entanto, essa diminuição não ocorreu. Uma hipótese para o acometimento contrastante se deve ao fato de existirem nestes isolamentos crescimentos de micro-organismos bacterianos e/ou fungos filamentosos, no que poderiam ser infecções mistas ou contaminantes, que culminaram na influência do crescimento das leveduras.

Tabela 4. Contagem por unidade colonial das amostras nas diferentes diluições realizadas, contáveis abaixo de 300 UFC, sendo acima disso consideradas incontáveis/INC (continua).

Amostra	Escova	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
C001	INC	INC	62	5	1
C002	INC	160	14	4	1
C003	INC	INC	INC	176	7
C004-1	156	71	59	0	4
C004-2	0	43	0	167	0
C005	51	5	1	0	0
C006	43	7	1	0	0
C007-1	1	0	0	0	0
C007-2	2	2	0	0	0

C008	1	0	0	0	0
C009	127	31	4	1	0
C010	18	2	2	0	0
C011	33	3	0	0	0
C012	0	12	0	0	0
C013-1	44	16	5	0	0
C013-2	1	0	0	0	0
C014-1	216	45	12	2	0
C014-2	INC	INC	INC	37	6
C015-1	19	10	0	0	0
C015-2	17	14	7	0	0
C016-1	1	0	0	0	0
C016-2	93	35	0	0	0
C017	12	3	0	0	0
C018	1	1	0	0	0
C019	42	21	7	0	0
C020	1	0	0	0	0
C021	INC	INC	131	52	0
C022	15	4	2	0	0
C023	11	1	0	0	0
C024	INC	116	34	8	0
C025	58	9	0	0	0
C026	118	15	10	1	0
C027	INC	INC	27	7	1
C028	1	1	0	0	0
C029-1	6	2	2	0	0
C029-2	47	38	2	2	0
C030	47	9	4	2	0
C031	INC	INC	193	27	8
C032	30	9	0	0	0
C034	INC	30	25	10	0
C035	INC	96	64	2	0
C036	12	3	0	0	0
C040	INC	INC	86	8	1
C041	23	2	1	0	0
C042	INC	INC	36	3	0
C043-1	INC	INC	48	19	1
C043-2	INC	INC	52	38	4
C044	14	7	2	0	0
C045	INC	41	5	0	0
C046	INC	7	2	0	0
C047	INC	12	6	2	0
C048-1	9	7	5	2	0
C048-2	INC	INC	127	18	6
C049-1	INC	INC	INC	58	17
C049-2	0	1	2	0	0
C050	2	0	0	0	0
C051-1	INC	2	0	0	0
C051-2	12	INC	INC	27	3
C052-1	INC	INC	83	38	6
C052-2	0	2	0	0	0
C053	INC	INC	4	0	0
C054-1	2	1	0	0	0
C054-2	0	1	1	0	0
C055-1	3	1	0	0	0

C055-2	1	1	0	0	0
C056	INC	INC	92	37	0
C057	4	2	2	0	0
C058	INC	62	8	0	0

As condições como a interferência bacteriana devem ser consideradas quando se pensa na expressão fúngica, devido a competitividade desses micro-organismos por substratos semelhantes para sobrevivência, por exemplo. Garcia et al. (2020) detalharam os efeitos inibitórios da bactéria *Streptococcus mutans*, notando, *in vitro*, que a bactéria em questão foi capaz de inibir os fatores de virulência abordados, reduzindo a formação de hifas e biofilme de *Candida albicans* e alterando o padrão de organização celular e de aderência. Já *in vivo*, a alteração do seu potencial patogênico veio da diminuição da carga fúngica no modelo de hospedeiro utilizado. Além dessa demonstração de competitividade inibitória entre bactérias e leveduras, as diferentes demonstrações *in vitro* e *in vivo* intensificam a necessidade dessa comparação para a avaliação da patogenicidade dentro das pesquisas.

Após realização dos testes de identificação bioquímicos e cromogênico, as leveduras foram submetidas à avaliação *in vitro* dos fatores de virulência predefinidos (tabelas 5, 6 e 7). Deve-se considerar que algumas amostras foram perdidas após a identificação e, por este motivo, não passaram pela avaliação dos fatores de virulência.

Tabela 5. Atividade enzimática da protease produzida pelas amostras (continua).

Amostra	Protease (Pz)	Grau de Pz	Identificação
C001	0,2	+++	<i>Candida krusei</i>
C002	0,4	+++	<i>Candida glabrata</i>
C003	0,8	+	Complexo <i>Candida albicans</i>
C004-1	0,5	++	<i>Candida krusei</i>
C004-2	1,3	Negativa	<i>Rhodotorula spp.</i>
C005	0,8	+	Complexo <i>Candida albicans</i>
C006	0,3	+++	<i>Geotrichum spp.</i>
C007-1	0,2	+++	<i>Candida krusei</i>
C007-2	0,4	++	<i>Rhodotorula spp.</i>
C008	0,7	+	<i>Candida krusei</i>
C010	0,4	++	<i>Candida lusitaniae</i>
C012	0,5	++	<i>Candida lusitaniae</i>
C013-1	0,4	+++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C013-2	0,2	+++	<i>Rhodotorula spp.</i>
C014-1	0,2	+++	<i>Candida glabrata</i>
C015-1	0,4	++	<i>Candida glabrata</i>
C016-1	0,2	+++	<i>Candida glabrata</i>
C018	0,7	+	Levedura negra
C021	0,4	+++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C024	2,5	Negativa	<i>Trichosporon spp.</i>
C027	0,9	+	<i>Rhodotorula spp.</i>
C028	0,3	+++	<i>Candida tropicalis</i>
C031	0,5	++	<i>Candida tropicalis</i>
C040	0,6	++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C041	0,5	++	<i>Geotrichum spp.</i>
C043-1	0,2	+++	<i>Geotrichum spp.</i>
C043-2	0,4	++	<i>Candida lusitaniae</i>
C044	0,4	++	<i>Candida famata</i>
C045	0,5	++	<i>Candida famata</i>
C046	0,9	+	<i>Geotrichum spp.</i>
C047	0,3	+++	<i>Geotrichum spp.</i>
C048-1	0,3	+++	<i>Candida lusitaniae</i>

C048-2	0,6	++	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C049-1	0,3	+++	<i>Candida glabrata</i>
C049-2	0,3	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C050	0,2	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C051-1	0,5	++	<i>Candida glabrata</i>
C051-2	0,3	+++	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C052-1	1,1	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C052-2	0,2	+++	<i>Levedura negra</i>
C053	0,1	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C054-1	0,4	+++	<i>Candida tropicalis</i>
C054-2	1	+	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C055-1	1,4	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C055-2	1	Negativa	<i>Rhodotorula</i> spp.
C056	1,7	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C057	0,9	+	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C058	0,3	+++	<i>Geotrichum</i> spp.

Tabela 6. Atividade enzimática da fosfolipase produzida pelas amostras (continua).

Amostra	Fosfolipase (Pz)	Grau de Pz	Identificação
C001	2,9	Negativa	<i>Candida krusei</i>
C002	0,7	+	<i>Candida glabrata</i>
C003	0,9	+	Complexo <i>Candida albicans</i>
C004-1	2,7	Negativa	<i>Candida krusei</i>
C004-2	0,5	++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C005	0,8	+	Complexo <i>Candida albicans</i>
C006	1,8	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C007-1	2,9	Negativa	<i>Candida krusei</i>
C007-2	0,6	++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C008	2,7	Negativa	<i>Candida krusei</i>
C010	1,8	Negativa	<i>Candida lusitaniae</i>
C012	0,9	+	<i>Candida lusitaniae</i>
C013-1	0,8	+	Complexo <i>Candida albicans</i>
C013-2	0,5	++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C014-1	0,8	+	<i>Candida glabrata</i>
C015-1	0,6	++	<i>Candida glabrata</i>
C016-1	0,4	++	<i>Candida glabrata</i>
C018	5,3	Negativa	<i>Levedura negra</i>
C021	0,7	+	Complexo <i>Candida albicans</i>
C024	2,5	Negativa	<i>Trichosporon</i> spp.
C027	0,5	++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C028	0,8	+	<i>Candida tropicalis</i>
C031	0,7	+	<i>Candida tropicalis</i>
C040	0,6	++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C041	0,6	++	<i>Geotrichum</i> spp.
C043-1	2,8	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C043-2	0,5	++	<i>Candida lusitaniae</i>
C044	2,3	Negativa	<i>Candida famata</i>
C045	0,7	+	<i>Candida famata</i>
C046	2,8	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C047	2	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C048-1	0,9	+	<i>Candida lusitaniae</i>
C048-2	2,9	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C049-1	2,5	Negativa	<i>Candida glabrata</i>
C049-2	2,3	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C050	2,5	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C051-1	2,7	Negativa	<i>Candida glabrata</i>

C051-2	0,7	+	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C052-1	1,2	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C052-2	0,8	+	Levedura negra
C053	1,1	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C054-1	2,1	Negativa	<i>Candida tropicalis</i>
C054-2	1	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C055-1	1,8	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C055-2	0,8	+	<i>Rhodotorula</i> spp.
C056	0,8	+	<i>Geotrichum</i> spp.
C057	1,2	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C058	2	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.

Tabela 7. Atividade enzimática da DNase produzida pelas amostras (continua).

Amostra	DNase Pz	Grau de Pz	Identificação
C001	0,3	+++	<i>Candida krusei</i>
C002	0,4	+++	<i>Candida glabrata</i>
C003	0,3	+++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C004-1	1,3	Negativa	<i>Candida krusei</i>
C004-2	0,3	+++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C005	0,3	+++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C006	3,2	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C007-1	1,3	Negativa	<i>Candida krusei</i>
C007-2	0,2	+++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C008	0,2	+++	<i>Candida krusei</i>
C010	1,3	Negativa	<i>Candida lusitaniae</i>
C012	1,9	Negativa	<i>Candida lusitaniae</i>
C013-1	1,9	Negativa	Complexo <i>Candida albicans</i>
C013-2	0,3	+++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C014-1	0,4	+++	<i>Candida glabrata</i>
C015-1	0,3	+++	<i>Candida glabrata</i>
C016-1	0,3	+++	<i>Candida glabrata</i>
C018	0,3	+++	Levedura negra
C021	1,8	Negativa	Complexo <i>Candida albicans</i>
C024	0,4	++	<i>Trichosporon</i> spp.
C027	0,3	+++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C028	0,2	+++	<i>Candida tropicalis</i>
C031	0,3	+++	<i>Candida tropicalis</i>
C040	0,4	+++	Complexo <i>Candida albicans</i>
C041	0,4	++	<i>Geotrichum</i> spp.
C043-1	3	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C043-2	0,5	++	<i>Candida lusitaniae</i>
C044	1,4	Negativa	<i>Candida famata</i>
C045	2	Negativa	<i>Candida famata</i>
C046	0,3	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C047	0,2	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C048-1	0,4	+++	<i>Candida lusitaniae</i>
C048-2	1,9	Negativa	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C049-1	0,4	++	<i>Candida glabrata</i>
C049-2	1,5	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.
C050	0,4	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C051-1	0,4	+++	<i>Candida glabrata</i>
C051-2	0,3	+++	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C052-1	0,7	+	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C052-2	0,3	+++	Levedura negra
C053	0,4	++	<i>Geotrichum</i> spp.
C054-1	0,6	++	<i>Candida tropicalis</i>

C054-2	0,2	+++	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C055-1	0,2	+++	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C055-2	0,2	+++	<i>Rhodotorula</i> spp.
C056	0,3	+++	<i>Geotrichum</i> spp.
C057	0,3	+++	<i>Malassezia pachydermatis</i>
C058	1,8	Negativa	<i>Geotrichum</i> spp.

Sabe-se que as tentativas de adaptações para sobreviver e evoluir em um hospedeiro, podem levar a atenuação da virulência de micro-organismos. Jammil e Yehia (2019) descreveram que na cavidade oral o potencial virulento pode ser decisivo para o aparecimento de afecções fúngicas, além do estado imunológico geral, a saúde da mucosa e a resistência do hospedeiro. Além dessa motivação, o estudo do potencial de virulência fúngica das amostras coletadas neste trabalho também foi motivado por uma provável maior troca de micro-organismos devido ao aumento da proximidade entre os cães e as pessoas, com potencial risco para a saúde pública.

Diversas pesquisas sobre virulência estão focadas em *C. albicans*, considerada a espécie mais patogênica do gênero e apontada por Ilkhanizadeh-Qomi et al. (2020) como uma espécie que tem a duração da infecção associada ao número total de fatores de virulência que apresenta. Apesar disso, Rhimi et al. (2020) descreveram que a duração da fungemia por *Malassezia* spp. é maior que a duração da candidemia, provavelmente pela origem da cepa ou pela menor eficácia da terapia antifúngica.

As enzimas hidrolíticas extracelulares desempenham um papel importante na patogênese fúngica, facilitando a adaptação a tipos distintos de infecção, invasão do tecido do hospedeiro, colonização e progressão da infecção, aumentando a sobrevivência do patógeno. A maioria dos estudos sobre exoenzimas concentram-se nas produções de fosfolipases e proteinases, abordadas neste trabalho junto da DNase, não só dentro do gênero *Candida* spp, mas nos gêneros *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., na espécie *Malassezia pachydermatis* e nas leveduras negras isoladas.

A fim de auxiliar no entendimento da patogênese de cada levedura isolada, durante o estudo, 48 amostras foram avaliadas quanto aos fatores de virulência protease, fosfolipase e DNase. Dentro do fator de virulência protease 87,5% das cepas revelaram atividade enzimática (42/48) e 12,5% não tinham atividade enzimática (6/48). Dentro das positivas 50% tinham atividade alta (21/42), 30,95% tinham atividade moderada (13/42) e 19,05% tinham atividade baixa (8/42).

O gênero *Candida* spp. correspondeu a 57,14% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a protease (24/42), não apresentando nenhuma amostra sem atividade dessa enzima. As espécies que apresentaram capacidade de produzir a enzima eram:

- *Candida glabrata* 14,29% (6/42), com atividade enzimática dividida em 66,67% de cepas com atividade alta (4/6) e 33,33% com atividade moderada (2/6);
- Complexo *Candida albicans* 11,90% (5/42), com 40% de atividade alta (2/5), 20% de atividade moderada (1/5) e 40% de atividade baixa (2/5);
- *Candida krusei* 9,52% (4/42), apresentando 50% de atividade alta (2/4), 25% de atividade moderada (1/4) e 25% com atividade baixa (1/4);
- *Candida lusitaniae* 9,52% (4/42), com 25% de atividade alta (1/4) e 75% de atividade moderada (3/4);
- *Candida tropicalis* 7,14% (3/42), com 75% de atividade alta (2/3) e 25% de atividade moderada (1/3);
- *Candida famata* 4,76% (2/42) com expressão apenas de atividade moderada (2/2).

Fotadar e Alhedaihy (2005) demonstraram uma diferença na expressão de proteinase para espécies do complexo *Candida albicans*, constatando que a maioria das espécies de *C. dubliniensis* era não proteolítica, enquanto *Candida albicans* se apresentava proteolítica com forte atividade em sua maioria. Isso pode justificar, em certo ponto, as diferentes expressões de atividade do complexo, tendo em vista que as espécies não foram diferenciadas por técnicas moleculares.

Marcos-Arias et al. (2011) descreveram em trabalho sobre a expressão de proteinase por *Candida* spp. na cavidade oral de humanos, sugerindo que níveis elevados de alguns constituintes da saliva humana poderiam influenciar na atividade, bem como o pH salivar. O trabalho em questão relatou pouco mais de 1/4 das espécies como produtoras da enzima e, também, a falta de associação entre a produção de proteinase e a candidíase em humanos. Acreditamos que os níveis de constituintes da saliva e o pH salivar do cão também podem influenciar na expressão de atividade enzimática nos cães, sendo necessários mais estudos.

Em nosso estudo, o gênero *Candida* demonstrou em todos os seus isolados expressão enzimática para protease. Esse fator de virulência foi descrito por Deorukhkar et al. (2014) como capaz de degradar as proteínas da barreira epitelial e da mucosa do hospedeiro, como o colágeno, a queratina e a mucina, além de ajudar as espécies a resistir à imunidade celular e humoral, degradando anticorpos, complemento e citocinas. Esse potencial enzimático encontrado por nós apresenta um considerável fator contribuinte para infecções oportunistas das espécies do gênero *Candida* em cães.

O gênero *Geotrichum* spp. correspondeu a 21,43% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a protease (9/42) e representou 16,67% (1/6) das leveduras que não demonstraram atividade enzimática. O gênero em questão não foi dividido em espécies no presente trabalho e as leveduras positivas apresentaram 77,78% de atividade enzimática alta (7/9), 11,11% de atividade moderada (1/9) e 11,11% de atividade baixa (1/9).

A espécie *Malassezia pachydermatis* correspondeu a 9,52% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a protease (4/42) e representou 33,33% (2/6) das leveduras sem produção de atividade. As leveduras positivas apresentaram 25% de atividade alta (1/4), 25% de atividade moderada (1/4) e 50% por atividade baixa (2/4).

A produção de protease junto da produção de fosfolipase pelo gênero *Malassezia* spp. foi descrita por Rhimi et al. (2020) como importante contribuinte para a virulência do micro-organismo, desempenhando papel nas interações com o hospedeiro e a comunidade microbiana, fazendo parte da invasão, colonização tecidual, persistência e proliferação no tecido do hospedeiro.

Ortiz et al. (2013) demonstraram em seu trabalho uma atividade mais intensa de protease para *Malassezia pachydermatis* em meio mais alcalino, comprovando estatisticamente a atividade maior em pH 6,8. Embora nosso estudo tenha utilizado pH alcalino para suas cepas, a mesma intensidade de protease não foi encontrada, sendo constatada maior presença de baixa atividade enzimática. A divergência pode ter ocorrido pela diferença de isolados comparados entre os trabalhos ou pela plasticidade fenotípica da espécie.

O gênero *Rhodotorula* spp. correspondeu neste trabalho a 7,14% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a protease (3/42) e apresentou 33,33% (2/6) de leveduras sem produção de atividade. O gênero apresentou dentre as leveduras positivas 33,33% de atividade alta (1/3), 33,33% de atividade moderada (1/3) e 33,33% de atividade baixa (1/3).

Foram isoladas apenas 2 leveduras negras e ambas apresentaram atividade positiva para protease, o que correspondeu a 4,76% (2/42) do total de leveduras que apresentaram esse fator de virulência. Uma das leveduras apresentou baixa atividade enzimática de protease e a outra apresentou atividade alta para a enzima em questão.

A única levedura do gênero *Trichosporon* spp. testada para a produção de protease teve sua atividade enzimática negativa, representando 16,67% (1/6) de todas as leveduras sem produção do fator de virulência.

Dentro das leveduras produtoras de fosfolipase, 50% das cepas revelaram atividade enzimática (24/48) e 50% não apresentaram produção de fosfolipase (24/48). Dentre as positivas não havia leveduras com atividade alta, 37,5% tiveram atividade moderada (9/24) e 62,5% tiveram atividade baixa (15/24).

O gênero *Candida* spp. correspondeu a 62,55% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a fosfolipase (15/24), apresentando 37,5% de amostras sem atividade dessa enzima (9/24). As espécies que apresentaram capacidade de produzir a enzima eram:

- Complexo *Candida albicans* 20,83% (5/24), com 20% de expressão enzimática moderada (1/5) e com 80% de atividade baixa (4/5);
- *Candida glabrata* 16,67% (4/24), com 50% de atividade moderada (2/4) e 50% de atividade baixa (2/4);
- *Candida lusitaniae* 12,5% (3/24), com 33,33% de atividade moderada (1/3) e 66,67% de atividade baixa (2/3);
- *Candida tropicalis* 8,33% (2/24), apresentando apenas atividade baixa (2/2);
- *Candida famata* 4,17% (1/24), apresentando apenas atividade baixa (1/1);

As espécies que não apresentaram capacidade de produzir a enzima eram:

- *Candida krusei* 16,67% (4/24);
- *Candida glabrata* 8,33% (2/24);
- *Candida lusitaniae* 4,17% (1/24);
- *Candida famata* 4,17% (1/24);
- *Candida tropicalis* 4,17% (1/24).

Como descrito por Brilhante et al. (2014), embora as espécies de NAC sejam capazes de produzir fosfolipase, a produção é baixa quando comparada com *Candida albicans*, o que está de acordo com o que foi encontrado neste trabalho, onde *Candida albicans* se demonstrou a espécie do gênero com maior expressão da atividade enzimática e não apresentou nenhuma espécie com ausência da produção do fator de virulência em questão.

Segundo Bath (2009) a produção de fosfolipase por amostras de *Candida* spp. estaria envolvida no processo de patogenicidade exibido pelas espécies, catalisando a quebra das ligações peptídicas em proteínas e aminoácidos. O produto de sua degradação seria utilizado como nutriente para o crescimento da levedura, como foi observado no aumento da aderência ao epitélio bucal de camundongos em amostras de *C. albicans* com alta atividade fosfolipásica.

Nosso trabalho não observou nenhuma espécie com alta atividade enzimática para este fator de virulência, embora o gênero tenha contado com a maior parte das leveduras que apresentaram atividade positiva para fosfolipase, que por si só já corresponde a um fator para a sobrevivência da levedura no hospedeiro e deve ser tratado com a importância necessária.

As enzimas hidrolíticas, como proteinases e fosfolipases, são consideradas fatores de virulência essenciais, sendo a falta delas ou diminuição de atividades contribuintes para a redução da virulência de algumas espécies de *Candida* spp. Ilkhanizadeh-Qomi et al. (2020) encontraram na maioria de seus isolados de *C. albicans* a produção de protease e fosfolipase, assim como Rhimi et al. (2021), que descreveram todas as cepas de *Candida albicans* como produtoras de fosfolipase. Fatos que estão de acordo com o que foi visto neste estudo, o qual todas as espécies de *Candida albicans* isoladas foram produtoras de protease e fosfolipase.

Arita et al. (2020) propuseram que níveis mais baixos de produção de fosfolipase em *C. albicans* estariam relacionados com a expressão de outros fatores de virulência para invadir o tecido do hospedeiro, como por exemplo a transição de levedura para hifas ou expressão de

proteínase. Segundo os autores, a fosfolipase mais elevada estaria relacionada ao aumento da virulência adquirida após contato sucessivo entre a levedura e o hospedeiro, aumentando a expressão e influenciando na resposta imune do órgão infectado do hospedeiro.

Oliveira (2017) descreveu que embora haja maior produção de fosfolipases e proteases em cepas clínicas, a produção dessas enzimas indica que em condições favoráveis, os microorganismos produtores apresentam ferramentas que o ajudam no estabelecimento de infecções, seja em animal ou humanos. Este autor encontrou na espécie *Candida tropicalis* 14,8% de capacidade de produção *in vitro* de fosfolipase e 39,9% de produção enzimática de protease por cepas isoladas de animais. Nosso trabalho demonstrou a expressão de protease por *Candida tropicalis* também maior do que a de fosfolipase, pois todas as cepas produziram protease e o mesmo não foi visto para a expressão de fosfolipase. Apesar disso, o número de isolados desta espécie deve ser considerado na comparação entre os trabalhos.

O gênero *Geotrichum* spp. correspondeu nesse estudo a 8,33% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a fosfolipase (2/24) e representou 33,33% (8/24) das leveduras sem produção de atividade. O gênero em questão, quando produtor enzimático, foi representado por metade (1/2) com atividade moderada e metade (1/2) com atividade baixa.

A espécie *Malassezia pachydermatis* correspondeu a 4,17% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a fosfolipase (1/24) e representou 20,83% (5/24) das leveduras sem produção de atividade. Dentro dessa espécie, quando positiva para a produção enzimática, demonstrou apenas atividade enzimática baixa (1/1).

Machado et al. (2010) descreveram que a expressão de fosfolipase em *Malassezia pachydermatis* era maior em amostras coletadas de animais lesionados. Fato reforçado por Czyzewska et al. (2019), que relataram com compilado de estudos que cepas de *M. pachydermatis* isoladas de cães com otite externa tinham maior atividade de fosfolipase em comparação com as cepas de cães saudáveis.

Este fato não foi encontrado em nossa pesquisa, que apresentou baixa expressão enzimática ou atividade negativa para a produção de fosfolipase, ainda que as amostras tenham sido coletadas de pacientes com lesões na cavidade oral. A divergência de dados poderia ser justificada pela abordagem de múltiplas variantes genéticas da espécie em cães no Brasil, que podem estar relacionadas a fatores ambientais e ecológicos, distintos em áreas geográficas específicas. Sendo assim, diferente do sugerido anteriormente, a expressão de fatores de virulência de *M. pachydermatis* pode estar mais associada a fatores independentes da levedura do que associados ao hospedeiro.

Nosso achado foi contrário também ao encontrado por Ortiz et al. (2013), pois nosso trabalho contou com a maioria das espécies de *Malassezia pachydermatis* sem atividade de fosfolipase em nenhum grau. Acredita-se que isso ocorreu devido ao número inferior de isolados do estudo em questão e devido a perda de muitas cepas após identificação, impossibilitando a avaliação deste fator de virulência em mais amostras.

O gênero *Rhodotorula* spp. correspondeu a 20,83% das leveduras desse trabalho que apresentaram atividade positiva para a fosfolipase (5/24) e não apresentou nenhuma levedura sem produção de atividade. O gênero em questão apresentou 80% de atividade moderada (4/5) e 20% de atividade baixa (1/5).

Bieganska et al. (2018) e Neves et al. (2019) já haviam descrito sobre cepas de *Rhodotorula* spp. apresentarem atividades significativas de fosfolipase. No nosso estudo, o gênero esteve entre os maiores manifestantes da atividade enzimática em questão, junto de *Candida albicans*.

As leveduras negras representaram 4,17% (1/24) do total de leveduras que apresentaram capacidade de produção desse fator de virulência e representaram 4,17% (1/24) das leveduras

sem produção de atividade. Dentre essas leveduras, quando produtora enzimática, demonstrou apenas atividade baixa (1/1).

A levedura do gênero *Trichosporon* spp. isolada e testada para fosfolipase teve sua atividade enzimática negativa, representando 4,17% (1/24) das leveduras sem produção de do fator de virulência.

Dentro das leveduras produtoras de DNase 72,92% das cepas foram produtoras de atividade enzimática (35/48) e 27,08% não apresentaram atividade produtora de DNase (13/48). Dentre as positivas 80% tinham atividade alta (28/35), 17,14% tinham atividade moderada (6/35) e 2,86% tinham atividade baixa (1/35).

O gênero *Candida* spp. correspondeu a 45,71% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a DNase (16/35), apresentando 61,54% de amostras sem atividade dessa enzima (8/13). As espécies do gênero que apresentaram capacidade de produzir a enzima eram:

- *Candida glabrata* 17,14% (6/35), com 83,33% de atividade enzimática alta (5/6) e 16,67% moderada (1/6);
- Complexo *Candida albicans* 8,57% (3/35), demonstrando apenas atividade enzimática alta (3/3);
- *Candida tropicalis* 8,57% (3/35), com 66,67% de atividade alta (2/3) e 33,33% atividade moderada (1/3);
- *Candida krusei* 5,71% (2/35), com apenas atividade alta (2/2);
- *Candida lusitaniae* 5,71% (2/35), com metade da expressão alta (1/2) e metade moderada (1/2);

As espécies que não apresentaram capacidade de produzir a enzima eram:

- *Candida albicans* 15,38% (2/13);
- *Candida lusitaniae* 15,38% (2/13);
- *Candida famata* 15,38% (2/13);
- *Candida krusei* 15,38% (2/13).

O gênero *Geotrichum* spp. correspondeu a 17,14% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a DNase (6/35) e representou 30,77% (4/13) das leveduras sem produção de atividade. O gênero em questão foi representado por 66,67% (4/6) de atividade alta e 33,33% (2/6) de atividade moderada.

A espécie *Malassezia pachydermatis* correspondeu a 14,29% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a DNase (5/35) e representou 7,69% (1/13) das leveduras sem produção de atividade. Dentro dessa espécie, houve 80% de atividade enzimática alta (4/5) e 20% de atividade baixa (1/5).

Chirco et al. (2018) descreveram que não havia diferenças relevantes entre as cepas de *M. pachydermatis* clínicas e de animais saudáveis quando se tratava da produção de protease e fosfolipase, sugerindo que para a avaliação de patogenicidade desta espécie outros fatores de virulência deveriam ser levados em consideração.

Na avaliação da expressão de DNase em nosso trabalho, *Malassezia pachydermatis* demonstrou capacidade produtora em 5 das 6 cepas isoladas, com maior expressão de atividade enzimática alta. A única amostra com baixa atividade era originada de um cão com lesões na cavidade oral, mas sem comorbidade, que chegou para a avaliação de rotina. As demais amostras, que apresentaram atividade alta, eram de cães com lesões em cavidade oral e comorbidades. Poucos estudos avaliam este fator de virulência para a espécie e nosso achado sugere a associação com fatores de imunossupressão, bem como a necessidade de abordagem desse fator de virulência em pesquisas futuras.

O gênero *Rhodotorula* spp. correspondeu a 14,29% das leveduras do trabalho que apresentaram atividade positiva para a DNase (5/35) e não apresentou nenhuma levedura sem

produção de atividade. O gênero em questão apresentou dentre as leveduras positivas apenas atividade alta (5/5). Apenas *Rhodotorula* spp. apresentou todas as leveduras testadas com produção enzimática de DNase e em alto grau de expressão, os demais gêneros e espécies não demonstraram uma padronização.

As leveduras negras representaram 5,71% (2/35) do total de leveduras que apresentaram capacidade de produção desse fator de virulência e não apresentaram nenhuma levedura sem produção de atividade. Dentro dessa espécie, houve apenas atividade enzimática baixa (2/2).

A levedura do gênero *Trichosporon* spp. isolada representou 2,86% das leveduras que apresentaram atividade positiva para a DNase (1/35), com apenas atividade enzimática moderada (1/1). Este foi o único fator de virulência produzido por esse gênero e, embora a produção dos outros fatores estivesse inclusa em outros relatos, Santo et al. (2020) descreveram sobre a oscilação entre as espécies, que em nosso estudo não foram abordadas, podendo justificar a ausência de atividades enzimáticas descritas anteriormente.

Os dados encontrados não condizem com os encontrados por Bentubo e Gompertz (2014), que encontraram uma menor expressão da DNase quando comparada com outras enzimas extracelulares. O que pode ter influenciado na discordância dos resultados, além do baixo número em nosso estudo e a classificação a nível de gênero, é o fato citado pelos autores da temperatura e período de incubação influenciarem na expressão enzimática de cada espécie, sendo ideal a temperatura de 37 °C para protease e fosfolipase e a de 25 °C para DNase.

Ao analisar cepas do gênero *Trichosporon*, *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*, Melville et al. (2011) não encontraram diferenças significativas para a produção de proteases incubadas nas temperaturas de 37 °C e em temperatura ambiente, embora tenham encontrado diferença para fosfolipase, que foi maior na temperatura mais alta. A divergência desses estudos que relacionaram atividade enzimática com temperatura de incubação pode ter ocorrido pela origem das cepas coletadas, tendo em vista que o primeiro utilizou cepas clínicas e o segundo cepas isoladas de produto lácteo.

Não se observou diferença significativa estatisticamente entre as médias das enzimas testadas nos dois grupos estudados. Não houve diferença na produção de protease, fosfolipase e DNase entre os grupos definidos, cães sem lesão na cavidade oral e cães com lesões na cavidade oral, havendo produção ou não em diferentes níveis para ambos os grupos (figura 14).

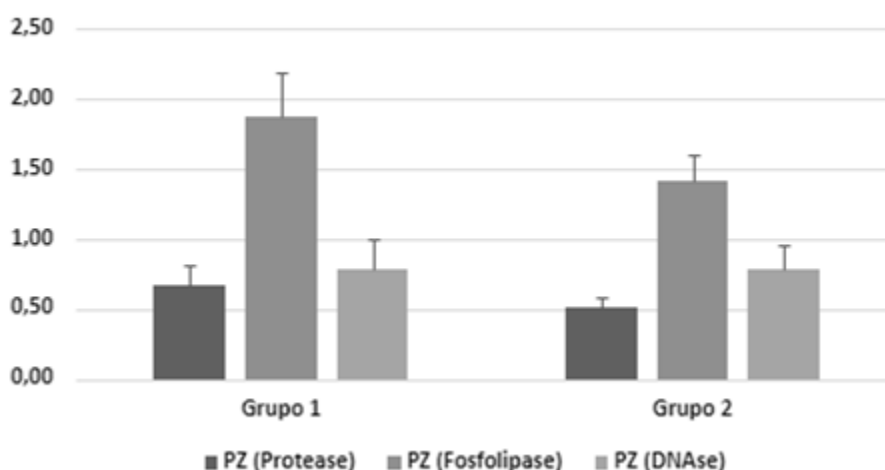


Figura 14. Médias das produções enzimáticas nos diferentes grupos ($P > 0,05$).

Jarros et al. (2020) descreveram sobre o mérito patogênico do gênero *Rhodotorula*, levantando a questão da disseminação estar ligada a uma capacidade patogênica por mecanismos fúngicos ou exclusivamente à debilidade do paciente. Embora esta levedura

apareça como importante produtora de fatores de virulência, as infecções por esse agente ainda não são amplamente estudadas e precisam ser confirmadas em estudos *in vivo*.

As leveduras negras isoladas em nosso trabalho merecem maior atenção em estudos futuros, apesar do baixo número de isolados. Pesquisas que abrangem leveduras que se enquadrem nessa classificação são escassas, bem como as que abrangem a virulência desses possíveis patógenos, dificultando o diagnóstico e o tratamento de doenças que possam surgir.

O gênero *Trichosporon*, apesar dos poucos isolados em nossa pesquisa, merece mais estudos. Bentubo e Gompertz (2014) descreveram as leveduras desse gênero como comuns responsáveis por infecções invasivas, alertando sobre a falta de estudos publicados que caracterizem a virulência desse patógeno. Além disso, um componente de sua parede celular, já descrito como semelhante ao GMX *Cryptococcus neoformans*, contribui para a patogenicidade pelos mecanismos de inibição da resposta imunológica, reforçando a necessidade de estudos mais abrangentes.

Malassezia pachydermatis ainda é descrita com diferentes padrões de expressão quanto aos fatores de virulência estudados, principalmente quando se trata de amostras de animais lesionados ou saudáveis. Os fatores que determinam a presença da virulência e a interferência de comensal ou lesional ainda precisam ser mais bem esclarecidos.

No gênero *Candida* spp. foram avaliados os principais atributos de virulência exibidos pelas espécies. No Complexo *Candida albicans* a expressão de maior atividade enzimática foi encontrada, respectivamente, em fosfolipase, protease e DNase, assim como para *Candida lusitaniae*. *Candida glabrata* expressou maior atividade enzimática para produção de DNase, seguido de fosfolipase e protease, assim como *Candida tropicalis*. *Candida krusei* demonstrou maior atividade para protease, seguido de DNase e não apresentando atividade positiva para fosfolipase. *Candida famata* expressou maior atividade em protease, seguido de fosfolipase e não apresentou atividade positiva para DNase.

Pesquisadores relatam descobertas contraditórias em relação à atividade dos fatores de virulência nas diferentes espécies de *Candida* spp. Essas inconsistências nas observações podem ser pelas diferenças biológicas entre os isolados testados e o número de amostras avaliadas. Neste estudo, todas as espécies de *Candida* spp. foram produtoras de protease e as espécies *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* isoladas foram todas produtoras de DNase. A representação comparativa da porcentagem de produção das exoenzimas estudadas dentro das espécies de *Candida* estão descritas na tabela 8.

Tabela 8. Comparação de produção dos fatores de virulência entre as espécies de *Candida albicans* e NAC.

	Protease (%)	Fosfolipase (%)	DNase (%)
<i>Candida glabrata</i>	14,29%	16,67%	17,14%
Complexo <i>Candida albicans</i>	11,90%	20,83%	8,57%
<i>Candida lusitaniae</i>	9,52%	12,5%	5,71%
<i>Candida tropicalis</i>	7,14%	8,33%	8,57%
<i>Candida krusei</i>	9,52%	0%	5,71%
<i>Candida famata</i>	4,76%	4,17%	0%

O principal atributo de virulência exibido por *Geotrichum* spp. foi protease, seguido de DNase e fosfolipase. *Malassezia pachydermatis* apresentou maior atividade de DNase, seguido de protease e fosfolipase. *Rhodotorula* spp. apresentou maior atividade de fosfolipase, seguido por DNase e protease. As leveduras negras expressaram maior atividade em DNase, depois protease e fosfolipase. O gênero *Trichosporon* spp. só demonstrou atividade positiva para DNase (tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9. Ordem decrescente das amostras com expressão de atividade de protease comparadas entre todas as leveduras que apresentaram atividade dessa enzima.

	Protease %
<i>Geotrichum spp.</i>	21,43%
<i>Candida glabrata</i>	14,29%
<i>Candida albicans</i>	11,90%
<i>Candida lusitaniae</i>	9,52%
<i>Candida krusei</i>	9,52%
<i>Malassezia pachydermatis</i>	9,52%
<i>Candida tropicalis</i>	7,14%
<i>Rhodotorula spp.</i>	7,14%
<i>Candida famata</i>	4,76%
Leveduras negras	4,76%
<i>Trichosporon spp.</i>	0%

Tabela 10. Ordem decrescente das amostras com expressão de atividade de fosfolipase comparadas entre todas as leveduras que apresentaram atividade dessa enzima.

	Fosfolipase %
<i>Candida albicans</i>	20,83%
<i>Rhodotorula spp.</i>	20,83%
<i>Candida glabrata</i>	16,67%
<i>Candida lusitaniae</i>	12,5%
<i>Candida tropicalis</i>	8,33%
<i>Geotrichum spp.</i>	8,33%
<i>Candida famata</i>	4,17%
<i>Malassezia pachydermatis</i>	4,17%
Leveduras negras	4,17%
<i>Candida krusei</i>	0%
<i>Trichosporon spp.</i>	0%

Tabela 11. Ordem decrescente das amostras com expressão de atividade de DNase comparadas entre todas as leveduras que apresentaram atividade dessa enzima.

	DNase %
<i>Geotrichum spp.</i>	17,14%
<i>Candida glabrata</i>	17,14%
<i>Rhodotorula spp.</i>	14,29%
<i>Malassezia pachydermatis</i>	14,29%
<i>Candida albicans</i>	8,57%
<i>Candida tropicalis</i>	8,57%
<i>Candida lusitaniae</i>	5,71%
<i>Candida krusei</i>	5,71%
Leveduras negras	5,71%
<i>Trichosporon spp.</i>	2,86%
<i>Candida famata</i>	0%

Sabe-se que na cavidade oral o potencial virulento pode ser decisivo para o aparecimento de afecções fúngicas e infecções superficiais devem ser consideradas como reservatório para infecções invasivas. Além da virulência e da saúde da mucosa, devem ser considerados estado imunológico e resistência do hospedeiro.

A avaliação dos fatores de virulência dessas leveduras foi estudada com intuito de contribuir para o entendimento da evolução e do acometimento clínico envolvidos com esses patógenos. Dentro dos acometimentos podemos citar acidentes de mordedura e lambedura, bem como uma provável maior troca de micro-organismos pelo aumento da proximidade entre os cães e seus tutores, com potencial risco para a saúde pública.

O não detalhamento em nível de espécies no presente trabalho pode ter influenciado na falta de padronização da produção enzimática de alguns gêneros isolados, por demonstrarem diferenças de expressão entre as espécies. Ademais, os fatores de virulência descritos neste trabalho podem estar associados com fatores de imunossupressão, considerando os cães utilizados.

A fim de compreender melhor a patogênese dessas leveduras *in vivo* sugerimos a continuação da avaliação da virulência em modelos de invertebrados como *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostellium discoideum*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella*, este último com resposta imune semelhante à resposta imune inata dos mamíferos. Ambos os modelos possuem menores implicações éticas, custo reduzido, facilidade de manejo e versatilidade de inoculação.

6 CONCLUSÕES

- As leveduras isoladas da mucosa oral de cães neste trabalho, considerando o número obtido da maioria delas, fazem parte da microbiota oral dos cães;
- O conhecimento dessas leveduras auxilia no diagnóstico precoce, fundamental para o manejo eficaz e para evitar o avanço da resistência fúngica;
- As espécies isoladas (*Malassezia pachydermatis*, *Geotrichum* spp., *Candida glabrata*, Complexo *Candida albicans*, *Rhodotorula* spp., *Candida lusitaniae*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida famata*, leveduras negras e *Trichosporon* spp.) servem como ponto de partida nos casos de investigação de afecções orais e acidentes desta origem;
- Estatisticamente as atividades enzimáticas apresentadas e o grau de expressão das mesmas demonstraram-se independentes da existência ou não de lesões na cavidade oral do cão;
- As atividades das enzimas hidrolíticas relacionadas aos gêneros *Trichosporon* spp. e às chamadas leveduras negras não são concludentes;
- Como as leveduras isoladas são as mesmas da mucosa oral sadia e lesionada, pode-se considerar que elas não estão associadas aos casos de lesões, facultadas pela baixa imunidade e pelos mecanismos individuais das leveduras, como expressão de fatores de virulência enzimáticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; MANCHANDA, V.; VERMA, N.; BHALLA, P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 172, 2011.
- ALMEIDA, G. M. D.; COSTA, S. F.; MELHEM, M.; MOTTA, A. L.; SZESZS, M. W.; MIYASHITA, F.; PIERROTTI, L. C.; ROSSI, F.; BURATTINI, M. N. *Rhodotorula* spp. isolatec from blood cultures: clinical and microbiological aspects. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 547-556, 2008.
- ALVES, R. C.; CARNEIRO, R. S.; KOMMERS, G. D.; SOUZA, A. P.; GALIZA, G. J. N.; DANTAS, A. F. M. Systemic Candidosis in Dogs Associated with Canine Distemper Virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, 2020.
- AMES, L.; DUXBURY, S.; PAWLOWSKA, B.; HO, H.; HAYNES, K.; BATES, S. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1909-1917, 2017.
- ANTONIO, D. S. N.; ABREU, D. P. B.; BONCI, M. M.; MAKITA, M. T.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. *In vitro* virulence of yeasts isolated from the cervicovaginal region of bitches. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 1, p. 61-67, 2018.
- ARIAS, M. J. N.; CHAVEZ, M. J. H.; CARNERO, L. C. G.; HERNANDEZ, D. G. A.; PEREZ, N. E. L.; MATA, E. E.; DUNCKER, I. M.; FRANCO, B.; MONTES, H. M. M. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* and *Candida auris* by human innate imune cells. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 783-794, 2019.
- ARIAS, M. V. B.; BATTAGLIA L. A.; AIELLO, G.; CARVALHO, T. T.; FREITAS, J. C. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, 2008.
- ARITA, G. S.; FARIA, D. R.; SAKITA, K. M.; RODRIGUES-VENDRAMINI, F. A.; CAPOCI, I. R.; KIOSHIMA, E. S.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; SVIDZINSKI, T. I. Impacto of serial systemic infection on *Candida albicans* virulence factors. **Future Microbiology**, v. 15, n. 13, p. 1249-1263, 2020.
- BANDINI, M. S. L'importanza di *Malassezia pachydermatis* nel cane. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Università di Parma, 2020.
- BARRIOS, C. L.; LOPEZ, C. B.; PAVLETIC, C.; PARRA, A.; VIDAL, M.; BOWES, J.; FATJÓ, J. Epidemiology of dog bite incidents in Chile: factors related to the patterns of human-dog relationship. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 96, 2021.
- BATH, F. V. C. Avaliação da virulência *in vitro* de *Candida* spp. isoladas de orofaringe de *Struthio camelus*. 73f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

BAUER, R.; LEMARIÉ, S.; ROY, A. Oral conidiobolomycosis in a dog. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 2, p. 115-120, 1997.

BENTUBO, H. D. L.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the *in vitro* expression of proteases, phospholipases, lipases e DNAses by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2014.

BIEGANSKA, M. J.; RZEWUSKA, M.; DABROWSKA, I.; MALEWSKA-BIEL, B.; OSTRZESZEWICZ, M.; DWORECKA-KASZAK, B. Mixed Infection of Respiratory Tract in a Dog Caused by *Rhodotorula mucilaginosa* and *Trichosporon jirovecii*: A case Report. **Mycopathologia**, p. 637-644, 2018.

BOND, R.; SAJONMAA-KOULUMIES, L. E. M.; LLOYD, D. H. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *Journal of small animal practice*, v. 36, n. 4, p. 147-150, 1995.

BORGES, O. M. M.; ALVES, V. B.; CARNEIRO, R. S.; DANTAS, S. B. A.; MATOS, R. A. T.; VAZ, A. F. M.; FILHO, A. M. L.; SOUZA, A. P. Cryptococcal Sialoadenitis in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-7, 2016.

BRAGA, C. A. S. B.; RESENDE, C. M. F.; PESTANA, A. C. N. R.; CARMO, L. S.; COSTA, J. E.; SILVA L. A. F.; ASSIS L. N.; LIMA, L. A.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 385-390, 2005.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J.; CAVALCANTE, C. S. P.; MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J. J. C. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 131-135, 2005.

BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. G.; GUEDES, G. M. M.; OLIVEIRA, J. S.; ARAÚJO, G. S.; ESPANA, J. D. A.; SALES, J. A.; AGUIAR, L.; PAIVA, M. A. N.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; PINHEIRO, A. Q.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**, v. 220, p. 47-52, 2018.

BRILHANTE, R. S. N.; RODRIGUES, T. J. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; MACEDO, R. B.; BANDEIRA, S. P.; ALENCAR, L. P.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1568-1572, 2014.

BRINGEL, M.; JORGE, P. K.; FRANCISCO, P. A.; LOWE, C.; SABINO-SILVA, R.; COLOMBINI-ISHIKIRIAMA, B. L.; MACHADO, M. A. A. M.; SIQUEIRA, W. L. Salivary proteomic profile of dogs with and without dental calculus. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2020.

- BRITO, E. H.; FONTENELLE, R. O.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 320-326, 2009.
- CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4868-4869, 2004.
- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 437-442, 2000.
- CANNIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A.; VILLAR-VIDAL, M.; BOLLO, E.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J.; VIDOTTO, V.; QUINDÓS, G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 357-361, 2007.
- CARMICHAEL, J. W. *Geotrichum Candidum*. **Mycologia**, v. 49 n. 6, p. 820-830, 1957.
- CARNEIRO, L. P.; REZENDE, C. M. F.; SILVA, C. A.; LARANJEIRA, M. G.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M. External skeletal fixation in dogs: clinical and microbiological evaluation. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 4, p. 437-444, 2001.
- CASTILLO, M. A.; ALVARADO, P.; FERNANDEZ, A.; URDANETA, K. E.; HERNANDEZ, N. S.; MENDEZ, D. M. Neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* in children's gut microbiota. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 8, n. 2, p. 67-69, 2020.
- CHIURCO, E. C.; NARDI, G. H.; LALLO, M. A.; COUTINHO, S. D. Production of Proteinase and Phospholipase by *Malassezia pachydermatis* Originating in Dogs With and Without External Otitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 158, p. 118, 2018.
- CIUREA, C. N.; KOSOVSKI, I. B.; MARE, A. D.; TOMA, F.; PINTEA-SIMON, I. A.; MAN, A. *Candida* and Candidiasis – Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, 2003.
- COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.
- CORRÊA, H. L.; VENTURINI, M.; GIOSO M. A. Registro do exame clínico odontológico – odontograma. **Clínica Veterinária**, v.1, n. 13, 1998.

COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitinsulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 73-76, 2000.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 348p, 2010.

CZYZEWSKA, U.; BARTOSZEWICZ, M.; SIEMIENIUK, M.; TYLICKI, A. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: The dual nature of *Malassezia pachydermatis*. **Modern problems and solutions in environmental protection**, p. 99-109. Białystok, 2019.

DEBOWES, L. J.; MOSIER, D.; LGAN, E.; HAVEY, C. E.; LOWRY, S.; RICHARDSON, D. C. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 57-60, 1996.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2 ed. Utrecht: CBS, 1126p, 2000.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, versão digital 4.0, 2014. Disponível em: <http://www.clinicalfungi.org/>. Acesso em: 27 de março de 2021, 8h.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.

DOUGLASS, A. P.; OFFEI, B.; GALLEANI, S. B.; COUGHLAN, A. Y.; MARTOS, A. A. R.; MERINO, R. A. O.; BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. **PLoS pathogens**, v. 14, n 7, 2018.

ENDERS, A.; VAN DER WOERDT, A.; DONOVAN, T. Endogenous mycotic endophthalmitis in a dog with candiduria and Evans syndrome. **Veterinary Ophthalmology**. v. 20, n. 1, p. 84-88, 2017.

FOLTINOVÁ, D.; TANČINOVÁ, D.; CÍSAROVÁ, M. INHIBITORY EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF *GEOTRICHUM CANDIDUM*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 380-384, 2021.

FORSBLOM, B.; LOVE, D. N.; KESSEL E. S.; SOMER, H. J. Characterization of anaerobic, Gram-negative, nonpigmented, saccharolytic rods from subgingival sites in dog. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n.2, p. 100-106, 1997.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 62-67, 2005.

FREEMAN, L. M.; ABOOD, S. K.; FASCETTI, A. J.; FLEEMAN, L. M; MICHEL, K. E.; LAFLAMME, D. P.; BAUER, C.; KEMP, B. L; VAN DOREN, J. R.; WILLOUGHBY, K. N. Disease prevalence among dogs and cats in the United States and Australia and proportions of

dogs and cats that receive therapeutic diets or dietary supplements. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 4, p. 531-534, 2006.

FRIAS, D. F. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; PRINA, R. M. Identificação da microbiota gengival de cães aparentemente hígidos. **Nucleus**, v. 15, n. 1, 2018.

FRIAS, D. F. R.; LAGES, S. L. S.; CARVALHO, A. A. B. Avaliação da conduta de profilaxia antirrábica humana indicada para pessoas envolvidas em agravos com cães e gatos no Município de Jaboticabal, SP, no período de 2000 a 2006. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 14, n. 4, p. 722-732, 2011.

GAGANA, H. S.; DAVIS, J.; KUMAR, V. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **The Pharma Journal**, v. 10, n. 2, p. 5-8, 2021. Disponível em: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2021/vol10issue2S/PartA/S-10-1-49-382>. Acesso em: 12h de 25 de abril de 2021.

GARCIA, M. T.; SANTOS, J. D.; NAMBA, A. M.; WARD, R. A. C.; GONÇALVES, N. M. F.; PEDROSO, L. L. C.; SOUZA, C. M.; JUNQUEIRA, J. C. Efeitos do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre os fatores de virulência de *C albicans*: estudo *in vitro* e *in vivo*. **Revista de Odontologia da UNESP**, n. 49, p. 159, 2020.

GAVIRIA, M. G.; MONTES, H. M. M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1673, 2020.

GERCEKER, D.; KARASARTOVA, D.; ELYÜREK, E.; BARKAR, S.; KIYAN, M.; ÖZSAN, T.M.; CALGIN, M.K.; SAHIN, F. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 55, n. 4, p. 291-294, 2009.

GIOSO, M. A. **Análise morfométrica óssea e dental e sua relação com características físicas do cão (*Canis familiaris*) como fator predisponente para a doença periodontal**. 1998. 110 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

GHARAGHANI, M.; TAGHIPOUR, S.; MAHMOUDABADI, A. Z. Molecular identification, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Rhodotorula* spp. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 8903-8909, 2020.

GOLDSTEIN, E. J. C. Bite Wounds and Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 633-640, 1992.

HAAS, B.; BONIFAIT, L.; VAILLANCOURT, K.; CHARETTE, S. J.; GOTTSCHALK, M.; GRENIER, D. Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2014.

HANA, S.; LATIFA, M.; CAMILIA, C.; BOUTHEINA, J. Characterization of the ‘*Candida albicans* Complex’: First Report of *Candida africana* in Tunisia. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 9, n. 307, p. 2, 2020.

HARVEY, C. E.; LASTER, L.; SHOFER, F.; MILLER, B. Scoring the Full Extent of Periodontal Disease in the Dog: Development of a Total Mouth Periodontal Score (TMPS) System. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 25, n. 3, p. 176-180, 2008.

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

HENTON, J.; JAIN, A. Cochrane corner: antibiotic prophylaxis for mammalian bites (intervention review). **Journal of Hand Surgery**, v. 37, n. 8, p. 804-806, 2012.

HERCULANO, P. N. **Perfil taxonômico das culturas de *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* estocadas na micoteca URM, Universidade Federal de Pernambuco**. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

HOF, H. *Rhodotorula* spp. in the gut – foe or friend? **GMS Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, 2019.

HUANG, C. Y.; PENG, C. C.; HSU, C. H.; CHANG, J. H.; CHIU, N. C.; CHI, H. Systemic Infection Caused by *Malassezia pachydermatis* in Infants: Case Series and Review of the Literature. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 39, n. 5, p. 444-448, 2020.

ILKHANIZADEH-QOMI, M.; NEJATBAKSH, S.; JAHANSHIRI, Z.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Aspartyl Proteinase and Phospholipase Activities of *Candida albicans* Isolated From Oropharyngeal Candidiasis in Head and Neck Cancer Patients. **Judishapur Journal of Microbiology**, v. 13, n. 9 2020.

ISHIDA, K.; ALVIANO, D. S.; SILVA, B. G.; GUERRA, C. R.; COSTA, A. S.; NUCCI, M.; ALVIANO, C. S; ROZENTAL, S. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 411-416, 2012.

JADHAV, V. J.; PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 23, n. 4, p. 233-234, 2006.

JAMMIL, N. A. N.; YEHIA, M. M. Virulence Factors of Yeasts Isolated From Oral Lesions. **Annals of the College of Medicine**, v. 41, n. 2, p. 170-177, 2019. Disponível em: https://mmed.mosuljournals.com/article_164160_en.html. Acesso em: 18h do dia 25 de abril de 2021.

JARROS, I. C.; VEIGA, F. F.; CORRÊA, J. L.; BARROS, I. L. E.; GADELHA, M. C.; VOIDALESKI, M. F.; PIERALISI, N.; PEDROSO, R. B.; VICENTE, V. A.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 19, p. 687-704, 2020.

JUNIOR, D. P. L.; COSTA, G. L.; DANTAS, E. S. O.; NASCIMENTO, D. C.; MOREIRA, D.; PEREIRA, R. S.; RAMOS, R. T. B.; BONCI, M. M.; MAIA, M. L. S.; GANDRA, R. F.; AULER, M. E.; MELHEM, M. S. C.; PAULA, C. R. The Rise of Fungi: Evidence on the Global Scale. Old Know Silences or Mysterious Threats to the Planet. **Microbiology Research Journal International**, v. 30, n. 10, p. 18-49, 2020.

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.

KEAN, R.; BROWN, J.; GULMEZ, D.; WARE, A.; RAMAGE, G. *Candida auris*: A decade of Understanding of an Enigmatic Pathogenic Yeast. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 30, 2020.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.; CERNÁKOVÁ, M; SLÁVIKOVÁ, E. Morphological changes during the life cycle of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. **Folia Microbiologica**, v. 25, n. 1, p. 56-67, 1980.

KRCMERY, V. e BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. e BOEKHOUT, T. **The Yeasts – a taxonomic study**. 5 ed. USA: Elsevier Science, 1055p, 1998.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. **The Yeasts – a taxonomic study**. 4 ed. USA: Elsevier Science, p, 2011.

LACAZ, C. D. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 1104p, 2002.

LAVRIN, T.; KONTE, T.; KOSTANJSEK, R.; SITAR, S.; SEPCIC, K.; MIHEVC, S. P.; ZAGAR, E.; ZUPUNSKI, V.; LENASSI, M.; ROGELJ, B.; CIMERMAN, N. G. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells in Progressive Cell Death. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 963, 2020.

LEE, J.; CHO, Y. G.; KIM, D. S.; CHOI, S. I.; LEE, H. S. First Case of Catheter-related *Malassezia pachydermatis* Fungemia in an Adult. **Annals of laboratory medicine** v. 39 n. 1, p. 99, 2019.

LEON-ROMAN, M. A. e GIOSO, M. A. Endodontia – anatomia, fisiopatologia e terapia para afecções dos tecidos internos do dente. Medvep – **Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 2, n. 7, p. 195-203, 2004.

MACEDO, J. L. S.; CAMARGO, L. M.; ALMEIDA, P. F. Estudo prospectivo do fechamento primário das mordeduras caninas e humanas na face e no couro cabeludo. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 21, n. 1, p. 23-29, 2006.

MACHADO, M. L.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D.; FERREIRA, R. R.; BIANCHI, S. P.; LATROFA, M. S.; PARISI, A.; FERREIRO, L. Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. **Sabouraudia**, v. 48, n. 6, p. 889-892, 2010.

MALIK, U. M.; KHAN, A. B.; SATTI, M. L. Comparative Evaluation of CHROMagar and API 20C AUX in Isolation and Identification of *Candida* Species. **Journal of Islamic International Medical College**, v. 13, n. 2, p. 85-90, 2018.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; AGUIRRE, J. M.; QUINDÓS, G. Phospholipase and proteinase activitie of *Candida* isolates from denture wearers. **Mycoses**, v. 54, n.4, p. 10-16, 2011.

MARÍN, J. C. G.; ROJAS, F. B.; ESCOBAR, J. G. Physiological and Molecular Characterization of *Malassezia pachydermatis* reveals no differences between canines and their owners. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, n. 7 2018.

MEDRANO, D. J. A; BRILHANTE R. S. N.; CORDEIRO, R. D. A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MENEZES, V. M.; VALE, I. N. F.; MONTEIRO, S. G.; GONÇALVES, L. H. B.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp. em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 3, p. 289-300, 2013.

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

MOHAN DAS, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 4, p. 208- 210, 2008.

MONTOYA, A. M.; MONTESINO, C. A.; CARRÓN-ÁLVAREZ, D.; GONZÁLEZ, G. M.; ROJAS, O. C. A comparative study of extracellular enzymes from chromoblastomycosis agents reveals the potential association of phospholipase with the severity of the lesions. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, 2020.

MONTROSE, V. T.; SQUIBB, K.; HAZEL, S.; KOGAN, L. R.; OXLEY, J. A. Dog bites dog: The use of news media articles to investigate dog-on-dog aggression. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 40, p. 7-15, 2020.

NAVARRO, B. S. **Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo**. 164f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade de São Paulo, 2016.

NEVES, R. P.; CARVALHO, A. M. R.; SILVA, C. M.; MACEDO, D. P. C.; LIMA-NETO, R. G. *Rhodotorula* spp. CRC PRESS: **Pocket Guide to Mycological Diagnosis**, capítulo 7, 2019.

OLIVEIRA, J. S. **Análise da virulência, sensibilidade antifúngica e mecanismos de resistência a azólicos em cepas de *Candida tropicalis* de origem humana e veterinária**. 2017. 156f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

OMRAN, A.; JORDAN, C.; HUQ, S. Appropriate antibiotics in dog bite injuries: an audit study. **International journal of surgery: Short reports**, v. 5, n. 2, 2020.

O'NEILL, D. G.; CHURCH, D. B.; MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; BRODBELT, D. C. Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

ONG, R. K.; RAISIS A. L.; SWINDELLS, K. L. *Candida albicans* peritonitis in a dog. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n.1, p. 143-147, 2010.

ORTIZ, G.; MARTÍN, M. C.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; PAYÁ, M. J. Produção de fosfolipase y proteinase em cepas de *Malassezia pachydermatis* isoladas de perros con otitis i sin otitis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 4, p. 235-238, 2013.

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

PAULA, C. R.; NAVARRO, B. S.; BONCI, M. M.; NASCIMENTO, D. C. Importance of Yeasts in Oral Canine Mucosa. **Canine Medicine**, 2021. Disponível em: www.intechopen.com/online-first/importance-of-yeasts-in-oral-canine-mucosa. Acesso em: 12h de 9 de abril de 2021.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A. Typing and virulence factors of food-borne *Candida* spp. isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, p. 57-63, 2018.

RHIMI, W.; ANEKE, C. I.; ANNOSCIA, G.; CAMARDA, A.; MOSCA, A.; CANTACESSI, C.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. Virulence and *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida catenulata* from laying hens. **International Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 57-63, 2021.

RHIMI, W.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. *Malassezia* spp. Yeasts of emerging concern in fungemia. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, 2020.

ROSA, J. M. A.; MORAES, D. F. S. D.; LIMA, S. R.; NEVES, R. C. S. M.; COLODEL, E. M.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Dermatite fúngica associada à *Rhodotorula glutinis* em cão (*Canis familiaris*): Relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 70, n. 2, p. 437-442, 2018.

ROZA, M. R. **Odontologia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 361p, 2004.

RUI-FENG, C.; LI-SONG, H.; JI-BO, Z.; LI-QIU, W. Emergency treatment on facial laceration of dog bite wounds with immediate primary closure: a prospective randomized trial study. **BMC Emergency Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2013.

SALES, J. A. **O complexo *Candida parapsilosis*: Uma abordagem das estratégias de identificação, cinética de crescimento, virulência e sensibilidade antifúngica.** 2019. 118f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

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, n. 2, p. 288-305, 2012.

SANNA, C.; MARRAS, L.; DESOGUS, A.; MARRAS, B.; MONTERO, N.; BERTOLINO, G.; SCHINTU, M.; CORONEO, V. Evaluation of *Rhodotorula* spp. contamination in hospital environments. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 3, p. 1-6, 2021.

SANTIN, R. **Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Pelotas, 2009.

SANTO, E. P. T. E.; MONTEIRO, R. C.; COSTA, A. R. F.; SILVA, S. H. M. Molecular Identification, Genotyping, Phenotyping and Antifungal Susceptibilities of Medically Important *Trichosporon*, *Apiotrichum*, and *Cutanetrichosporon* Species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 307-317, 2020.

SLEPECKY, R. A. e STARMER, W. T. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 823-832, 2009.

SPARBER, F.; LANDMANN, S. L. Infecting mice with *Malassezia* spp. To study the fungus-host interaction. **Journal of Visualizes Experiments**, v. 153, 2019.

TORRES, M.; PINZON, E. N.; REY, F. M.; MARTINEZ, H.; GIRALDO, C. M. P.; RAMIREZ, A. M. C. *Galleria mellonella* as a novelty in vivo Model of Host-Pathogen Interaction for *Malassezia furfur* CBS 1878 and *Malassezia pachydermatis* CBS 1879. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 934p., 2012.

TULLOCH, J. S. P.; GARSTECKA, S. C. O.; FLEMING, K. M.; VIVANCOS, R.; WESTGARTH, C. English hospital episode data analysis (1998–2018) reveal that the rise in dog bite hospital admissions is driven by adult cases. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

VENTURINI, M. A. F. A. **Estudo retrospectivo de 3055 animais atendidos no ODONTOVET (Centro Odontológico Veterinário) durante 44 meses.** 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, 2006.

WILLEMS, N.; HOUWERS, D. J.; SCHLOTTER, Y. M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Disseminated Candidiasis in a Young, Previously Healthy, Dog and Review of Literature. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5-6, p. 591-596, 2017.

WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHERECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6 ed. São Paulo: Guanabara, 1465p, 2001.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. D. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 456p, 1998.


ZALAR, P.; GOSTINCAR, C.; DE HOOG, G. S.; URSIC, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in mycology**, v. 61, p. 21-38, 2008.

ZHANG S.; GUO, Y.; ZHAO, Q.; XUE, W.; LI, Y.; WU, X.; HUO, S. Study on the bacteriostatic action of Chinese herbal medicine on avian *Trichosporon*. **Poultry Science**, v. 99, n. 9, p. 4530-4538, 2020.

ZHAO, Z.; MAO, L. Skin and soft tissue infections: a clinical overview. **Molecular Medical Microbiology**, v. 2, p. 825-835, 2015.

8 ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento para coleta de amostra no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ

 **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**
Instituto de Veterinária
Hospital Veterinário
Br 465, Km7, Cep 23890-000, Seropédica, RJ, 21 26821637

Confeccionar
em 3 Vias


Requerimento de Execução de Projeto de Pesquisa/Extensão junto ao Hospital Veterinário

Eu, Clara de Almeida Mendes / Francisca Baroni, do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, solicito à Direção do Hospital Veterinário que autorize o desenvolvimento do projeto de pesquisa / extensão, em nível de: Graduação, Mestrado Doutorado Pós-Doutorado, intitulado "Virulência in vitro de componentes da microbiota oral de cães", que será desenvolvido sob minha responsabilidade no período de março de 20 19, a março de 20 21.

Equipe executora:

Nome	Curso	Instituição
<u>Francisca de Assis Baroni</u>	<u>Medicina Veterinária</u>	<u>UFRRJ</u>
<u>Sergio Gaspar de Campos</u>	<u>Medicina Veterinária</u>	<u>UFRRJ</u>
<u>Mário Mendes Bonai</u>	<u>Medicina Veterinária</u>	<u>UFRRJ</u>
<u>Daniel Paiva Barros de Abreu</u>	<u>Medicina Veterinária</u>	<u>UFRRJ</u>
<u>Mário Tatsuo Makita</u>	<u>Medicina Veterinária</u>	<u>UFRRJ</u>

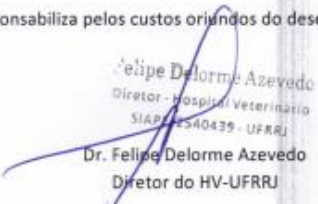
Seropédica, RJ 09/04/2019


Assinatura do Responsável
Médico Veterinário
Professor-DMIV-IV-UFRRJ

.....
Campo reservado à Direção do Hospital Veterinário

Autorizo a execução do projeto nas dependências do Hospital Veterinário da UFRRJ, condicionado à sua aprovação junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IV), quando utilizar animais; animais oriundos da rotina do Hospital Veterinário deverão ter autorização através de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos respectivos responsáveis; animais oriundos de biotérios deverão ter autorização do responsável para o uso dos animais; entrega de cópia impressa do projeto, juntamente com este requerimento, na sala 25 do Hospital Veterinário.

O Hospital não se responsabiliza pelos custos oriundos do desenvolvimento do projeto.


Felipe Delorme Azevedo
Diretor - Hospital Veterinário
SIAP 4540439 - UFRRJ
Dr. Felipe Delorme Azevedo
Diretor do HV-UFRRJ

Seropédica, RJ 09/04/19

Anexo B – Termo de consentimento para coleta de amostra na Clínica Veterinária Vetmaster, Seropédica-RJ.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL CLÍNICO

Pelo presente documento, a **Clínica Veterinária VET MASTER**, localizada à Rua Demétrio de Brito, 180, Seropédica, através de seu representante legal, autoriza a coleta de espécimes clínicos, representados por “swabs” da mucosa oral de animais (caninos) em atendimento aos requisitos da **CEUA** (Comissão de Ética na Pesquisa em Uso de Animais) e exclusivamente para o projeto intitulado “Virulência *in vitro* de componentes da microbiota oral de cães” sob a responsabilidade do prof. **Francisco de A. Baroni**. O projeto encontra-se cadastrado no CEUA sob o protocolo 5677060519 e sob análise, sendo este um dos documentos solicitados.


Dr. Marcelo Carvalho Gomes
Médico Veterinário
CRMV-RJ 6095
(21) 99803-4119
Médico Veterinário Responsável
Carimbo

Anexo C – Termo de consentimento para coleta de amostra na Clínica Emporium Veterinária, Itaguaí-RJ.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL CLÍNICO

Pelo presente documento, o estabelecimento **EMPORIUM VETERINÁRIA**, sito à rua Elvira Ciuffo Cicarino, nº 40B, Vila Margarida, Itaguaí, RJ, através do seu representante legal, autoriza a coleta de espécimes clínicos, representados por escovas dentárias contendo material da mucosa de oral de animais (caninos) em atendimento aos requisitos da **CEUA** (Comissão de Ética na Pesquisa em Uso de Animais) e exclusivamente para o projeto intitulado “Virulência *in vitro* de componentes da microbiota oral de cães” sob a responsabilidade do professor **Francisco de A. Baroni**. O projeto encontra-se cadastrado no **CEUA** sob o protocolo 5677060519 e sob análise, sendo este um dos documentos solicitados.


Médico Veterinário Responsável
carimbo


Aline Almeida Freitas
Médico Veterinário
CRMV-RJ 11135

Anexo D – Modelo do termo de consentimento assinado pelo tutor para coleta de amostra do seu cão.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E AMBIENTAIS

A coleta de material do seu animal objetiva isolarmos micro-organismos da cavidade oral para que possamos conhecer os fatores de virulência destes fungos. O conhecimento destes fatores será de grande auxílio na prevenção e tratamento de patologias orais. Solicitamos sua autorização para a coleta de material e para que os fungos isolados sejam utilizados na pesquisa intitulada “Fatores de virulência *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de cães”, sob responsabilidade do Prof. Francisco de Assis Baroni. A contribuição é voluntária, sendo que na coleta de saliva, não há danos ou sofrimentos ao(s) seu(s) animal(is). A qualquer momento ou fase da pesquisa, o Sr(a). poderá retirar o consentimento, independente de motivo, sem prejuízo a sua pessoa. A publicação futura dos dados preservará o seu nome.

Informações adicionais: Prof. Francisco Baroni - BR 465, Km 7, UFRRJ, Instituto de Veterinária, Sala 90 – Seropédica, RJ (Tel: 21-26821711).

Consentimento Pós-informação

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa e importância em colaborar. Por isso, concordo na utilização do meu animal e dos possíveis fungos obtidos no projeto.

Seropédica, ___/___/_____

Dados do animal:

Nome:	Espécie:	Raça:
Sexo:	Idade:	Solicitante:

Assinatura do proprietário
CPF/RG

Assinatura do pesquisador
SIAPE 0386849

Dados complementares do animal encontram-se na requisição, arquivada no LLPA – DMIV – IV – UFRRJ
Documento emitido em duas vias. Ambas devem ser assinadas, ficando uma cópia com o proprietário.

Anexo E – Meios de Cultura e Soluções

- Meio Ágar Batata Dextrose acrescido de Cloranfenicol com pH modificado

- Fosfato de potássio bibásico até pH 7,2-8,5 no pHmetro digital
- Ágar Batata Dextrose Difco® 39g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- Cloranfenicol 0,02g
- Autoclavar a 120 °C, durante 20 minutos.

- Meio de Christensen

- Glicose 1g
- Peptona 1g
- NaCl 5g
- Fosfato de potássio monobásico 2g
- Ágar 16g

- Água destilada q.s.p. 1000mL
- Vermelho de fenol 0,012g
- Ureia 40% 5mL
- A confecção do meio passa por filtração dos dois últimos componentes. O restante deve ser autoclavado a 120 °C, durante 20 minutos, passar por resfriamento em banho maria a 55 °C para posterior adição dos demais componentes filtrados.

- Meio de Ágar arroz ou semente girassol

- Arroz integral ou semente de girassol 20g
- Ágar 20g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- A confecção do meio passa por banho maria durante 45 minutos, então, a água é filtrada e os grãos/sementes dispensados. O volume deve ser conferido, para, se necessário, completar até 1000mL.
- Autoclavar a 120 °C, durante 20 minutos.

- Meio para auxanograma

- Yeast Nitrogen Base (YNB) HiMedia® 6,7g
- Ágar 18g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- O YNB é misturado e solubilizado em 100mL de água, para então ser filtrado em membrana millipore® 0,22µl. O ágar é misturado nos 900mL restantes de água, fundido e autoclavado a 120 °C, durante 20 minutos. Posteriormente, a mistura do ágar autoclavada é mantida em banho maria à 55 °C para então serem misturadas as partes autoclavada e filtrada. A suspensão de levedura é adicionada junto ao meio em cada placa de Petri e, após solidificação, as fontes carbonadas são adicionadas em pontos equidistantes.

- Meio para zimograma

- Extrato de levedura 4,5g
- Peptona de caseína 7,5g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- Solução estoque de azul de bromotimol 4mL (50mg/75mL de água destilada)
- São utilizados tubos de ensaio de 150x12mm, contendo tubos de Durhan invertidos e com tampas rosqueadas. Os tubos já com a solução são autoclavados a 120 °C, durante 20 minutos. Cada bateria de amostra contém 7 tubos para cada fonte carbonada a ser testada.

- CHROMagar® Candida

- CHROMagar® 47,7g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- A água deve ser autoclavada junto de um bastão de vidro e um frasco Becker a 120 °C, durante 20 minutos. Em seguida, a água é misturada ao substrato no frasco Becker com auxílio do bastão de vidro para fundir. A solução pronta deve ser distribuída em placas de Petri pequenas.

- Meio para protease

- Soroalbumina bovina (fração V – Sigma®) 2g
- Yeast Carbon Base (YCB) Difco® 11,7g
- Cloridrato de tiamina 1g
- Ágar 18g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- Inicialmente deve-se esterilizar por filtração em membrana millipore® 0,22µl a albumina bovina misturada ao cloridrato de tiamina e 100mL da água. O YCB acrescido de ágar nos

900mL restantes de água devem ser autoclavados a 120 °C, durante 20 minutos e resfriados em banho maria a 55 °C. Então, as soluções são unificadas e distribuídas em placas de Petri.

- Meio para fosfolipase

- Gema de ovo 80g
- NaCl 57,3g
- CaCl₂ 0,55g
- Ágar Sabouraud Dextrose 65g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- Os ovos devem imergir por 1 hora em álcool iodado, em seguida as gemas são separadas e colocadas em recipiente estéril. O volume necessário deve ser pipetado para evitar entrada de membrana da gema na composição final. Os demais componentes são autoclavados a 120 °C, durante 20 minutos e resfriados em banho maria a 55 °C, para então serem adicionadas as gemas, para homogeneização e distribuição em placa de Petri.

- Agar teste DNase (Difco®)

- Triptose 20g
- Ácido desoxirribonucleico 2g
- Cloreto de sódio 5g
- Ágar-ágar 15g
- Água destilada q.s.p. 1000mL
- Autoclavar a 120 °C, durante 20 minutos.

Anexo F – Assinaturas digitais (SIGAA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 2021

TERMO Nº 741/2021 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 11/07/2021 16:39)

FRANCISCO DE ASSIS BARONI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matricula: 386849

(Assinado digitalmente em 09/07/2021 12:33)

GLÓRIA MARIA DIREITO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matricula: 387084

(Assinado digitalmente em 12/07/2021 08:58)

SERGIO GASPAS DE CAMPOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matricula: 386268

(Assinado digitalmente em 15/07/2021 10:07)

CLAUDETE RODRIGUES PAULA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 651.826.268-00

(Assinado digitalmente em 13/07/2021 16:06)

RINALDO FERREIRA GANDRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 067.211.108-06

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
741, ano: 2021, tipo: TERMO, data de emissão: 09/07/2021 e o código de verificação: c649666c5a