

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E VIRULÊNCIA "*IN VITRO*"
DE LEVEDURAS DA MICROBIOTA CÉRVICO-VAGINAL DE
CADELAS**

DENISE DOS SANTOS NAVARRO ANTÔNIO

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E VIRULÊNCIA "IN VITRO"
DE LEVEDURAS DA MICROBIOTA CÉRVICO-VAGINAL DE
CADELAS**

DENISE DOS SANTOS NAVARRO ANTÔNIO

Sob a Orientação do Professor
Francisco de Assis Baroni

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Setembro de 2015

Ficha catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca Central
Obs: na parte inferior e centralizada.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

DENISE DOS SANTOS NAVARRO ANTÔNIO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/09/2015

Francisco de Assis Baroni, Dr. Ph.D. UFRRJ (Orientador)

Vera Lúcia Teixeira de Jesus, Prof^a. Dr. UFRRJ

Rosely Maria Zancopé Oliveira, Prof^a. Dr. FIOCRUZ

Glória Maria Direito, Prof^a. Dr. UFRRJ

Sergio Gaspar de Campos, Prof^o. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Wilson e Júlia, e irmãos Daniele e Felipe. Ao meu namorado Adilson, pelo amor, apoio e compreensão. E aos meus amigos por todo o carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos momentos difíceis trouxe paz, tranquilidade, e principalmente, o equilíbrio necessário para prosseguir a jornada.

À minha mãe, Júlia de Fátima Santos Papini sempre presente, que me escutou, acalmou, me fez ir sempre em frente, e me fez quem sou hoje.

Ao meu pai, Wilson Navarro Antônio por, sempre com seu amor imensurável, me apoiar, incentivar e orientar nas mais diversas circunstâncias.

À minha irmã, Daniele dos Santos Navarro Antônio, que foi o meu exemplo e que ajudou nos primeiros passos longe de casa.

Ao meu irmão, Felipe dos Santos Navarro Antônio, que mesmo distante sempre esteve presente, no meu pensamento, mente e coração.

Ao meu tio, Paulo Sérgio Papini, que sempre esteve disposto a me ajudar nas adversidades de minha jornada.

Agradeço ao meu namorado, Adilson José Corrêa Junior, pelo amor e incentivo deste trabalho, que sempre esteve junto em todo o esforço que foi necessário para chegar até aqui.

Agradeço ao meu orientador, Francisco de Assis Baroni por estar presente em todos os momentos, pela dedicação, apoio e paciência durante toda a realização deste trabalho.

Agradeço a professora Vera Lúcia Teixeira de Jesus que sempre esteve me acompanhando e me ajudando no que fosse necessário.

Agradeço a Professora Marta Fernanda Albuquerque da Silva e Rosana Colatino Soares Reis por disponibilizar os animais para realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, que sempre estiveram presentes me ajudando e fazendo com que meus dias fossem mais divertidos, em especial Caroline Cunha Carreiro e Daniel Paiva Barros de Abreu.

Agradeço as cadelas de que colhi amostras, pela colaboração ao meu trabalho.

BIOGRAFIA

Denise dos Navarro Antônio, filha de Wilson Navarro Antônio e Júlia de Fátima Santos Papini, natural de São José dos Campos – SP, Brasil, nasceu no dia 07 de fevereiro de 1985. Coursou o ensino fundamental e médio na E.E.P.S.G. Prof^ª Ayr Picanço Barbosa de Almeida.

Em 2008 deu início à graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, colando grau em 2012. Durante a graduação fez diversos estágios nas áreas de Anatomia Animal, Clínica de Grandes Animais, Reprodução Animal, Clínica de Pequenos Animais, Dermatologia e Projeto Castração. Ainda durante a graduação integrou-se, como monitora da disciplina Micologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária. Ingressou no “Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária na mesma universidade em que cursou a graduação, no ano de 2013, onde sob a orientação do Professor Doutor Francisco de Assis Baroni, desenvolveu o presente trabalho.

RESUMO

ANTÔNIO, Denise dos Santos Navarro. **Identificação, quantificação e virulência “*in vitro*” de leveduras da microbiota cervico-vaginal de cadelas.** Projeto de Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Diferentes problemas são atualmente observados na reprodução canina, dentre os quais se destacam aqueles que levam à infertilidade, anestro persistente ou a uma baixa prolificidade. A presença de micro-organismos ou a contaminação por eles no trato genital pode ser considerada normal. Alguns animais, no entanto, apresentam mecanismos de defesa alterados e, em decorrência, pode-se observar a multiplicação de micro-organismos no trato genital, culminando em infecções clínicas e subclínicas. É parco o conhecimento da microbiota cervico vaginal de cadelas e ainda menor quando consideramos a presença de fungos filamentosos e leveduras. Também não se conhece a virulência destas leveduras, o que leva a um questionamento sobre a capacidade de estas promoverem distúrbios reprodutivos. Objetivou-se verificar as espécies de leveduras presentes na mucosa cérvico-vaginal de cadelas e o poder de virulência “*in vitro*” dos isolados por ensaios de produção de protease e fosfolipase. Foram utilizadas 40 fêmeas caninas a partir de seis meses, sem limite de idade, sem distinção com relação a raça, divididas em dois grupos: Grupo I (cadelas não ovariectomizadas) e grupo II (cadelas gestantes), as quais foram submetidas a exames clínico/comportamental e complementares para verificar a higidez. As amostras foram coletadas por dois métodos distintos, com o “*swab*” e por meio de um lavado cérvico-vaginal, realizado com solução salina estéril. Após a coleta realizou-se mensuração do pH vaginal com fita da Macherey-Nagel. Os lavados relativos a cada animal foram mantidos sob refrigeração, para posterior processamento, incluindo-se, isolamento, identificação, quantificação e avaliação dos fatores de virulência. Para o isolamento, as amostras foram semeadas na superfície de meio de cultura Ágar Infuso Cérebro e Coração, acrescido de cloranfenicol. Em seguida, foram realizadas as provas bioquímicas necessárias para a identificação das leveduras isoladas. A avaliação da produção de protease e de fosfolipase foi realizada “*in vitro*”, utilizando-se os meios específicos, acompanhando-se o desenvolvimento das colônias e o desenvolvimento de halos relacionados com a produção destas enzimas. Das 40 cadelas utilizadas para coleta do material ginecológico, em 33 (82,5%) obteve-se o crescimento fúngico. Foram obtidos 60 isolados, sendo 21 (35,0%) identificados como *Candida* spp, 19 (31,66%) *Malassezia* spp, 13 (21,66%) *Rhodotorula* spp e 7 (11,66%) *Trichosporon* spp. Em relação a contagem de células viáveis, para o primeiro grupo a média foi de aproximadamente $24,10 \pm 01$ e para o segundo de $36,76 \pm 01$. Das 60 cepas testadas para produção de protease 22 (36,66%) foram negativas, 20 (33,33%) positivas e 18 (30,0%) forte positivas, e para produção de fosfolipase 27 (45,0%) foram negativas, 23 (38,33%) forte positivas e 10 (16,66%) positivas. A grande maioria das amostras isoladas apresentou algum grau de virulência se considerarmos a capacidade de produção de protease e fosfolipase. O isolamento das cepas agentes de possíveis distúrbios reprodutivos, a determinação das espécies e a avaliação dos fatores de virulência representam talvez a solução de inúmeros distúrbios ainda pouco explicados e controlados na medicina veterinária.

Palavras-chave: produção enzimática, leveduras, microbiota, trato reprodutivo.

ABSTRACT

ANTÔNIO, Denise dos Santos Navarro. **Identification, quantification and in vitro virulence yeast of microbiota cervicovaginal of bitches.** Dissertation project (Master of Veterinary Medicine, Animal Pathology). Veterinary Institute. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Different problems are currently observed in canine reproduction, among which stand out those that lead to infertility, continuing anoestrus or a low prolificacy. The presence of microorganisms or contamination by them in the genital tract can be regarded as normal. Some animals, however, have changed defense mechanisms and, consequently, can observe the multiplication of microorganisms in the genital tract, culminating in clinical and subclinical infections. It is meager the knowledge of cervical vaginal microbiota of female dogs and even smaller when considering the presence of filamentous fungi and yeasts. Also, the power of virulence of these yeasts is not known, which leads to questions about the ability of these promote reproductive disorders. The objective was to verify the species of yeast present in cervical-vaginal mucosa of female dogs and the “*in vitro*” virulence by the isolated protease and phospholipase production trials. We used 40 bitches from six months with no age limit, no distinction with respect to race, divided into two groups: Group I (not ovariectomized bitches) and group II (pregnant bitches), which were submitted to clinical/behavioral and complementary tests to check the healthiness. Samples were collected by two different methods, with the “swab” and by a cervico-vaginal lavage performed with sterile saline. After the collection was measurement of vaginal pH with ribbon Macherey-Nagel. The samples of each animal were kept under refrigeration for further processing, including, isolation, identification, quantification and evaluation of virulence factors. For isolation, the samples were sown on the surface of a Brain Heart Infusion Agar, plus chloramphenicol. Then the necessary biochemical tests for the identification of yeasts were performed. The evaluation of the production of protease and phospholipase was performed “*in vitro*” using the specific means, accompanying the development of the colonies and the halos development related to the production of these enzymes. Of the 40 dogs used for collection of gynecological material, in 33 (82.5%) was obtained a growth of the fungal. Were obtained 60 isolates, 21 (35.0%) identified as *Candida* spp, 19 (31.66%) *Malassezia* spp, 13 (21.66%) *Rhodotorula* spp and 7 (11.66%) *Trichosporon* spp For viable cell count of the first group average was approximately $01 + 24,10$ and the second $36,76 + 01$. Among the 60 strains tested for protease production 22 (36.66%) were negative, 20 (33.33%) positive and 18 (30.0%) strong positive, and for the production of phospholipase 27 (45.0%) were negative, 23 (38.33%) strong positive and 10 (16.66%) positive. The large majority of the isolates showed some degree of virulence considering the production capacity of protease and phospholipase. The isolation of strains agents of possible reproductive disorders, determination of species and the evaluation of virulence factors represent perhaps the solution of numerous disturbances poorly explained and controlled in veterinary medicine.

Key words: enzymatic production, yeasts, microbiotic, tract reproductive.

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1	Atividade de protease e de fosfolipase conforme o Pz e o código.	25
Tabela 2	Caracterização das 40 cadelas que foram submetidas a análise ginecológica.	26
Tabela 3	Número de unidades formadoras de colônias nos grupos 1 e 2.	32
Tabela 4	Identificação, quantificação, atividade enzimática e correlação da mucosa uterina e cérvico-vaginal.	33
Tabela 5	Atividade enzimática - protease	35
Tabela 6	Atividade enzimática - fosfolipase	39
Tabela 7	Correlação da atividade enzimática entre a protease e a fosfolipase	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Introdução do lavado cérvico-vaginal pela vulva, com membros posteriores levantados.	15
Figura 2	Coleta de amostra ginecológica pelo “swab”.	15
Figura 3	Crescimento de <i>Candida</i> spp, <i>Malassezia</i> spp e <i>Rhodotorula</i> spp após inoculação do lavado cérvico-vaginal.	16
Figura 4	Crescimento de <i>Malassezia</i> spp e fungo filamentoso.	16
Figura 5	Colônias obtidas das amostras mantidas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e extrato de levedura a 1%.	17
Figura 6	Colônias em ágar Potato dextrose, cobertas com óleo mineral após crescimento.	17
Figura 7	Aspecto de colônias do gênero <i>Candida</i>	18
Figura 8	Aspecto de colônias do gênero <i>Rhodotorula</i> spp.	18
Figura 9	Microscopia (400X) de <i>Malassezia pachydermatis</i> , corada com azul de algodão.	18
Figura 10	Microscopia (400X) de <i>Candida</i> spp corada com azul de algodão	18
Figura 11	Tubo germinativo em soro sanguíneo. Lâmina preparada com nigrosina para microscopia (A e B).	19
Figura 12	Produção de clamidoconídeos em meio de cultivo Agar Arroz (Microscopia 400X) (A e B)	19
Figura 13	Prova de auxanograma evidenciando assimilação de sacarose por <i>Rhodotorula</i> spp	20
Figura 14	Assimilação de N-acetil-glucosamina e por peptona por <i>Candida</i> spp.	20
Figura 15	Teste de fermentação de carboidratos (zimograma).	21
Figura 16	Formação de bolhas devido a produção de gás.	21
Figura 17	Amostras suspeitas de <i>Candida</i> inoculada em Chromagar®.	21
Figura 18	Coloração azul nas colônias de <i>Candida tropicalis</i> .	21
Figura 19	Prova positiva de urease em meio Christensen.	22
Figura 20	Crescimento exarcebado de leveduras.	23
Figura 21	Melhor visualização das UFC após diluição.	23
Figura 22	Diluição seriada até 10 ⁻⁵ .	24
Figura 23	Mensuração do precipitado formado e da colônia de <i>Rhodotorula</i> spp.	25

Figura 24	Frequência absoluta e relativa dos isolados fúngicos.	27
Figura 25	Frequência absoluta e relativa dos isolados fúngicos do grupo 1.	29
Figura 26	Frequência absoluta e relativa dos isolados fúngicos do grupo 2.	30
Figura 27	Percentual da atividade proteolítica dos isolados fúngicos.	34
Figura 28	Percentual da atividade proteolítica de <i>Candida</i> spp, <i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Rhodotorula</i> spp e <i>Trichosporon</i> spp.	34
Figura29	Produção de protease em <i>Candida</i> spp (A e B), <i>Rhodotorula</i> spp (C) e <i>Malassezia</i> spp (D).	37
Figura 30	Percentual da atividade fosfolipásica dos isolados fúngicos.	38
Figura 31	Percentual da atividade fosfolipásica de <i>Rhodotorula</i> spp, <i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Trichosporon</i> spp, <i>Candida</i> spp.	38
Figura32	Produção de fosfolipase em <i>Trichosporon</i> spp (A), em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (B), <i>Malassezia pachydermatis</i> (C), <i>Cryptococcus</i> spp (controle positivo) (D).	41
Figura33	Produção de fosfolipase em diferentes cepas de <i>Rhodotorula</i> spp.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivos Gerais	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3	REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1	Microbiota Fúngica Cérvico-vaginal	3
3.2	Fungos Leveduriformes	5
3.2.1	Gênero <i>Candida</i>	5
3.2.2	Gênero <i>Malassezia</i>	6
3.2.3	Gênero <i>Rhodotorula</i>	8
3.2.4	Gênero <i>Trichosporon</i>	9
3.3	Fatores de Virulência	10
3.3.1	Aderência	10
3.3.2	Protease e Fosfolipase	11
3.3.3	Hialuronidase	12
3.3.4	Condroitinsulfatase	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Local de Desenvolvimento	14
4.2	Seleção dos Animais	14
4.3	Coleta do Material	14
4.3.1	Lavado cérvico-vaginal	14
4.3.2	“Swab” cérvico-vaginal	15
4.3.3	Lavado uterino	15
4.4	Processamento das Amostras	16
4.4.1	Isolamento das leveduras dos lavados e dos “swabs”	16
4.4.2	Isolamento das leveduras do lavado uterino	16
4.6	Identificação das Leveduras Isoladas	16
4.7	Análise inicial dos isolados e Manutenção das Amostras	17
4.7.1	Características macromorfológicas	17
4.7.2	Características micromorfológicas	18
4.8	Caracterização dos Gêneros e Espécies dos Isolados	18
4.8.1	<i>Candida</i> spp	18
4.8.1.1	teste do tubo germinativo	18
4.8.1.2	cultivo em ágar arroz	19
4.8.1.3	auxanograma	19

4.8.1.4 zimograma	20
4.8.1.5 chromagar®	21
4.8.1.6 candfast®	21
4.8.1.7 chromid®	22
4.8.2 <i>Malassezia</i> spp	22
4.8.2.1 urease	22
4.8.2.2 catalase	22
4.8.3 <i>Rhodotorula</i> spp e <i>Tricosporon</i> spp	23
4.9 Contagem Total de Leveduras	23
4.10 Fatores de Virulência	24
4.10.1 Produção de protease	24
4.10.2 Produção de fosfolipase	24
4.11 Análise Estatística	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Caracterização dos Animais	26
5.2 Avaliação Fúngica Cérvico-vaginal	27
5.2.1 Isolamento e identificação fúngica	27
5.2.2 Correlação do "swab" e do lavado cérvico-vaginal com o crescimento fúngico	30
5.2.3 Correlação do pH vaginal com o crescimento fúngico	31
5.3 Contagem Total das Leveduras	31
5.4 Avaliação Fúngica Uterina	33
5.5 Avaliação dos Fatores de Virulência	33
5.5.1 Protease	33
5.5.2 Fosfolipase	37
5.5.3 Correlação da protease e fosfolipase	42
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8 ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

O crescimento significativo da população canina nas últimas décadas tem levado a um aumento e a uma diversificação da atuação do Médico Veterinário, principalmente pelo aumento da popularidade de cães de raça, bem como pela valorização afetiva e comercial dos animais de companhia. A reprodução de pequenos animais é um campo da Medicina Veterinária que muito tem se desenvolvido, embora diversos aspectos reprodutivos ainda necessitem ser esclarecidos para que as biotécnicas possam ser aplicadas com sucesso, ampliando assim, o ganho reprodutivo das espécies domésticas, principalmente de cães e gatos.

Diferentes problemas são atualmente observados na reprodução canina, dentre os quais se destacam aqueles que levam à infertilidade verdadeira, anestro persistente ou a uma baixa prolificidade, relacionados aos distúrbios hormonais, afecções uterinas e ovarianas, defeitos congênitos ou adquiridos do aparelho reprodutivo e doenças infecciosas.

Estas alterações possuem grande influência na reprodução e o conhecimento relativo aos agentes microbianos que habitam contínua ou ocasionalmente o ambiente vaginal e da cérvix é relevante para melhor entender esses distúrbios reprodutivos.

O conhecimento do ciclo estral canino, por sua vez, é de grande importância na abordagem dos problemas de fertilidade, sendo o da fêmea canina o mais longo de todas as espécies domésticas, com duração de quatro a dez meses.

As alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral em cadelas causam modificações morfológicas, clínicas, citológicas e vaginais, podendo estas influenciar o desenvolvimento de micro-organismos na mucosa vaginal.

Essa microbiota pode ser considerada de residente para transitória, ligada diretamente ao ambiente e manejo. Em condições normais, a microbiota vaginal tem composição e número variável, podendo apresentar um crescimento exacerbado em animais com o sistema imunitário comprometido, culminando em infecções clínicas e subclínicas.

No campo da microbiologia do trato reprodutivo feminino, conhecer os micro-organismos saprófitas e diferenciar um agente patogênico de um constituinte normal da microbiota pode ser considerado um requisito básico, uma vez que eles podem tornar-se responsáveis por processos infecciosos. Além disso, o isolamento de micro-organismos da microbiota endógena, geralmente considerada pouca virulenta, não pode ser desprezado automaticamente, pois é possível que seus constituintes sejam agentes etiológicos de afecções ou que tenham alguma importância clínica.

Dentre os fungos, leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Malassezia* e *Rhodotorula* entre outras, já foram descritas como pertencentes à microbiota de mucosas e pele de mamíferos (RIPPON, 1988), podendo tornar-se patogênicas, pela exacerbação de seu crescimento e/ou por mecanismos de defesa comprometidos (LACAZ et al., 2002).

É parco o conhecimento acerca da microbiota cervico vaginal de cadelas e é ainda menor quando consideramos a presença de fungos filamentosos e leveduras, desconhecendo-se o poder de virulência destas leveduras. Tais fatos levam-nos ao desenvolvimento deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Identificar e quantificar as espécies de leveduras presentes na mucosa cérvico vaginal de cadelas e o poder de virulência “*in vitro*” dos isolados.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1- Isolar e Identificar os componentes da microbiota fúngica, em nível de gênero e espécie, presentes na mucosa cérvico-vaginal de cadelas.

2.2.2- Estimar os índices de presença (total, sem distinção de espécie) nas diferentes fases do ciclo estral.

2.2.3- Avaliar alguns fatores de virulência “*in vitro*” por ensaios de produção de protease e fosfolipase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microbiota Fúngica Cérvico-vaginal

A microbiota vaginal representa um dos mais importantes mecanismos de defesa do aparelho reprodutivo feminino, mantendo o ambiente saudável e impedindo a proliferação de micro-organismos patogênicos (LINHARES et al., 2010). Sua composição não é constante, sofrendo variações em respostas a fatores exógenos e endógenos (PRIESTLLEY et al., 1997; ESCHENBACH et al., 2000). As alterações que ocorrem no meio vaginal podem aumentar ou diminuir as vantagens seletivas para micro-organismos específicos (LINHARES et al., 2010).

Os micro-organismos encontrados neste ambiente também podem estar presentes na pele, fezes e cavidade oral (SANTIN, 2009; MACHADO, 2010; MENEZES et al., 2014). Embora algumas barreiras físicas impeçam que patógenos oportunistas colonizem o trato genital, as fêmeas podem se tornar susceptíveis a certos micro-organismos que passam pela cérvix e alcançam o útero, instalando as infecções clínicas e subclínicas (ROCHA et al., 2004).

Micro-organismos habituais da vagina tornam-se patogênicos quando os animais em cujas mucosas estão presentes apresentam o sistema imunológico comprometido, em decorrência do estresse causado por fatores variados tais como súbitas mudanças de temperatura, nutrição deficiente, final de gestação e parto (VERMA et al., 1994, KUNTZE; AURICH 1995, LIANJUAN et al., 1995).

Stout (2008) verificou, em um estudo envolvendo 128 casos de éguas com endometrite fúngica, que os fatores mais frequentes associados a este tipo de infecção foram: prévio tratamento uterino com antibióticos (85%), pneumovagina (39%) e grande acúmulo de fluido intrauterino (33%). No mesmo estudo, a incidência de endometrite fúngica foi significativamente maior em éguas idosas com afecções (74%), comparada com éguas jovens (9%).

Os fungos são relatados no trato genital de animais desde 1919. Smith (1919) isolou *Mucor rhizopodiformis*, a partir de membranas fetais de útero bovino. A partir daí, estes micro-organismos têm sido descritos como habitantes naturais ou patogênicos dos órgãos genitais de diferentes espécies (MORAES, 2004). Em caninos observa-se que os fungos, principalmente as leveduras, fazem parte da microbiota vaginal normal, com variações de acordo com as fases do ciclo estral, podendo assim constituir uma fonte endógena de infecção (CLEFF et al., 2001).

Devido ao risco em potencial que os fungos representam como fonte endógena de infecção, é necessária a identificação dos fungos filamentosos e leveduras na microbiota vaginal, contribuindo para o conhecimento do seu papel na vaginite e conseqüentemente na reprodução animal (MORAES, 2004).

As enfermidades fúngicas têm grande importância nos animais domésticos, tanto pela dificuldade na prevenção como na obtenção de um tratamento adequado (GARCIA & BLANCO, 2000). Poucos trabalhos são descritos na literatura sobre a microbiota vaginal fúngica potencialmente patogênica que pode estar associada direta ou indiretamente a distúrbios reprodutivos.

O aborto micótico por *Aspergillus* spp, Zygomycetos, *Candida* spp, *Geotrichum candidum*, outros fungos filamentosos e leveduras já foi descrito em bovinos e bubalinos (AINSWORTH; AUSTWICK, 1973; ANTONIASSI et al., 2013), bem como descreveram-se

casos de endometrites e cervicites também determinadas por fungos (PETRITES-MURPHY et al., 1996; BATISTA et al. 2008).

Diferentes estudos da microbiota vaginal em caninos tem relatado que diferentes fungos são isolados desta região, sendo considerados componentes de um ambiente em equilíbrio. Assim como relatado por Gunay et al. (2010) onde citam o isolamento de leveduras da vagina de cadelas, em associação com bactérias (*Streptococcus* spp, *Staphylococcus* e *Escherichia coli*) e por Baba et al. (1983) em estudo realizado com cadelas adultas, em que foi feito o isolamento microbiano de 82 amostras vaginais e 78 amostras uterinas, sendo verificado o crescimento de fungos, sem, contudo, identificá-los.

Os fungos também foram relatados em cadelas com afecções, porém em menor frequência, como verificado por Moreno et al. (1973), que ao utilizarem 100 fêmeas caninas com alterações reprodutivas em pesquisa, obtiveram 5,0 % dos isolados de *Candida albicans*.

Em estudos mais recentes, realizou-se a identificação a nível de gênero ou espécie como o de Cleff et al. (2005) que isolaram *Candida* spp da microbiota vaginal de cadelas saudáveis em 37% das 224 amostras analisadas sendo *Candida parapsilosis* a espécie mais frequentemente isolada (21,7%), seguida por *C. guilliermondii* (8,4%), *C. kefír* (6%) e *C. albicans* (4,8%). Assim como o realizado por Cleff et al. (2007) onde examinaram muco da cavidade vaginal de 89 cadelas, em diferentes fases do ciclo estral, e as leveduras foram identificadas como *Candida* spp, *Malassezia pachydermatis* e *Rhodotorula* spp.

A presença de leveduras como *Candida* spp e *Malassezia pachydermatis* na microbiota vaginal de fêmeas caninas também foi citada por Stein et al. (2009).

Com relação aos felinos, os estudos são mais restritos. Em 2006, Santos realizou o isolamento fúngico e mostrou que gatas não castradas apresentaram maior frequência para o isolamento de *Candida* spp do que as castradas que obtiveram maior frequência para *Penicillium* spp.

Em animais de produção existe um maior número de relatos com o envolvimento fúngico no trato reprodutivo, devido as perdas econômicas que ocorrem quando estes fungos se tornam patogênicos.

Em estudo realizado por Garoussi et al. (2007), foram isolados fungos de cérvix e vagina de vacas de 27,14% e 28,57% do grupo tratamento para doenças reprodutivas, 26,56% e 31,25% de vacas gestantes e 33,3% e 21,42% de vacas não gestantes saudáveis, respectivamente.

Verma et al. (1999) mostraram que diferentes fungos incluindo espécies de *Aspergillus*, como *A. pullulans*, *Penicillium* spp, *Acremonium* spp, *Cladosporium* spp, *Mortierella* spp, Zygomycetos, e *Candida* spp podem causar infecções genitais em vacas e búfalos.

Florião e Fraga (2014) realizaram um estudo a partir de 189 isolados oriundos de fluido cérvico-vaginal de vacas. Entre esses isolados foram obtidas 28 diferentes espécies de fungos e o gênero *Aspergillus* foi o mais representativo seguido pelo gênero *Penicillium*.

Chaves (2011) correlacionou achados microbiológicos vaginais e uterinos de 77 éguas doadoras de embriões, verificando que *Candida* spp estava presente em 6% das amostras vaginais, em 9% nas amostras uterinas e em 9% nas amostras vaginais concomitantemente presentes no útero.

As espécies fúngicas que se apresentaram com maior frequência em fluido cérvico-vaginal de cabras, cadelas e gatas, segundo Fraga et al. (2008) foram *Cladosporium cladosporioides* (11,43%), *Aspergillus flavus* (11,07%), *Rhodotorula* spp (6,43%), *Candida glabrata* (6,43%), *C. oxysporum* (3,93%) e *Fusarium* spp. (3,57%).

Outras espécies menos referenciadas também já foram relatadas. Shokri et al. (2009) coletaram amostras de diferentes partes do trato genital de 50 camelos fêmeas. Foram obtidos

454 isolados pertencentes a 8 diferentes gêneros: *Candida* (73.1%), *Trichosporon* (10.1%), *Geotrichum* (7.5%), *Kluyveromyces* (3.5%), *Rhodotorula* (2.4%), *Aureobasidium* (1.4%), *Cryptococcus* (1.1%) e *Prototheca* (0.8%).

Leveduras, ainda que não identificadas quanto a gênero e espécie, foram citadas como presentes em conjunto com bactérias no material vaginal de cutias por Martins et al. (2012).

3.2 Fungos Leveduriformes

3.2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, taxonomicamente enquadrados na classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Candidaceae*, e atualmente este gênero é constituído de mais de 300 espécies (KURTZMAN et al., 2011).

De acordo com Kurtzman e Fell (1998), as espécies de *Candida* são classificadas em 12 grupos com base em suas características fisiológicas, principalmente no que se refere à assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas, fermentação, crescimento em determinadas temperaturas e outros aspectos fisiológicos. No entanto, a maioria das espécies de *Candida* de interesse clínico, no que se refere ao homem e aos animais, pertencem ao grupo VI, tais como *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Nos meios de cultura de rotina, *Candida* spp forma colônias variáveis em coloração, de brancas a creme. São lisas, viscosas ou secas e com relevo convexo, podendo ser evidenciadas após 24-48 horas de cultivo (HOOG et al., 2000; MORIS et al., 2008)

À microscopia, as células são globosas, elipsoidais, cilíndricas e ocasionalmente ogivais, triangulares ou lunares. A reprodução é assexuada por brotamento holoblástico, podendo formar pseudohifas e hifas septadas. Arthroconídios podem ser formados, mas não extensivamente (KURTZMAN et al., 2011).

Determinadas espécies, como *C. albicans*, podem apresentar-se como formas leveduriformes (blastoconídios) ou filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), sendo classificadas por alguns autores como fungos dimórficos (LACAZ et al., 1991; ROMANI et al., 2003).

Em condições nutricionais desfavoráveis de crescimento, pode ocorrer a formação de clamidoconídios, que podem ser vistos como uma estrutura de resistência, já que apresentam paredes duplas e espessas, estando localizados no final dos filamentos do fungo (LACAZ et al., 2002; MORIS et al., 2008), sendo esta uma das características morfológicas utilizada para diferenciação das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* das demais.

O diagnóstico laboratorial das espécies do gênero *Candida* consiste, inicialmente, da confecção de lâminas com base na amostra clínica para exame direto, que permita melhor visualização de estruturas, utilizando clarificante, lactofenol azul de algodão ou coloração de Gram, bem como de posterior repique da amostra em meios de cultura clássicos como ágar Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e ciclohexamida (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Na rotina laboratorial, diferentes testes são utilizados para diferenciar bioquimicamente e morfológicamente as espécies de *Candida*, tais como: assimilação de nitrogênio e de carboidratos (auxonograma), fermentação de carboidratos (zimograma), prova de produção de urease e teste de produção de tubo germinativo (SIDRIM; ROCHA, 2004), assim como o microcultivo em ágar arroz ou ágar fubá etc acrescidos de tween 80 para estimular a produção de clamidoconídios e de outras estruturas que auxiliem na identificação.

O auxanograma consiste na capacidade que uma levedura apresenta de crescer aerobiamente na presença de determinados carboidratos, fornecidos individualmente como fontes únicas de carbono. As espécies do gênero *Candida* apresentam perfis de assimilação de carboidratos diferentes. A leitura é feita, durante 24 a 96 horas, mediante visualização de

halos de crescimento que se formam em volta do carboidrato assimilado (SIDRIM; ROCHA, 2004). Já o zimograma, baseia-se na capacidade das leveduras de fermentarem determinados carboidratos produzindo gás carbônico, na ausência de oxigênio (LARONE et al., 2002; BARBEDO; SGARBI, 2010).

Candida albicans, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitanae* são as principais espécies de interesse médico. Entretanto, casos de infecções invasivas e superficiais pelas espécies emergentes *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspícua*, *C. dubliniensis* e *C. pelliculosa* são reportados na literatura (MORIS et al., 2008).

Estas leveduras são componentes da microbiota de humanos e animais clinicamente saudáveis e são descritas como agentes oportunistas causadores de micoses em todo o mundo. Estão amplamente distribuídas no ambiente e, frequentemente colonizam pele e mucosas, como cavidade oral, trato gastrointestinal e mucosa genital de mamíferos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SÓRIA et al., 2002; CLEFF et al., 2005; ANDRADE, 2006; SANTIN, 2009). Em cães, estas leveduras preferem colonizar áreas úmidas, que favorecem maceração tecidual, tais como superfícies mucosas, junções muco-cutâneas, áreas intertriginosas, subestruturas das unhas, região interdigital, conduto auditivo e face lateral da orelha (CLEFF et al., 2005).

Distúrbios nas proteções físicas, químicas e imunológicas, no entanto, fazem com que essas leveduras tornem-se patogênicas e causem enfermidades denominadas candidíases (BRITO et al., 2009). Mesmo não sendo indicativa de doença, a presença da levedura é fundamental para instalação da infecção clínica, sendo que a concentração do micro-organismo está relacionada à maior probabilidade de desenvolvimento de qualquer forma de candidíase (SCOTT et al., 1996).

São fatores predisponentes a infecções por *Candida*: idade, *Diabetes mellitus*, uso de corticosteróide, antibioticoterapia, cateterismo venoso e urinário e administração de nutrição parenteral (VELASCO, 2000; HESELTINE et al., 2003; MORETTI et al., 2004; KIVARIA; NOORDHUIZEN, 2007)

O primeiro relato de candidose, em cães, data de 1949 e se tratou de um caso de dermatomicose por *C. albicans* (REICH; NECHTOW, 1949). No Brasil, há relatos da presença de espécies do gênero, causando quadros de otite (DUARTE et al., 2001), infecção intestinal em bovinos (SOUZA; SIQUEIRA, 2003) e dermatomicose em cães (RAPOSO et al., 1996).

Em um estudo realizado por Santos (2006), foi verificado que na secreção vaginal de gatas inteiras, *Candida* spp estava presente em 30,50% das amostras e em 16,66% das gatas castradas.

John et al. (2011) avaliaram a microbiota vaginal de cadelas inférteis e revelaram que das 17 amostras de descargas vaginais submetidas ao cultivo, *Candida* spp estava presente em 7,7% dos isolados.

3.2.2 Gênero *Malassezia*

As leveduras do gênero *Malassezia* pertencem a subdivisão *Ustilaginomycotina*, classe *Exobasidiomycetes*, ordem *Malasseziales* e à família *Malasseziaceae* (KURTZMAN et al., 2011).

Por décadas o gênero *Malassezia* foi limitado a duas espécies, *M. furfur* e *M. pachydermatis*, uma lipodependente (*M. furfur*) e outra não lipodependente (*M. pachydermatis*). Posteriormente foi descoberta a *M. sympodialis* e desde esta descoberta ocorreram várias mudanças taxonômicas para esta levedura (SCHLOTTFELDT et al., 2002).

Recentemente, o gênero *Malassezia* passou a incluir 13 espécies. Destas, *M. pachydermatis* é a única não-lipodependente, característica de todas as outras doze (KURTZMAN et al., 2011). As espécies incluídas foram: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae* e *M. equina*, sendo as duas últimas identificadas após um estudo realizado por Ashbee (2007).

O gênero *Malassezia* pode ser dividido em dois grupos. Primeiramente aquele capaz de crescer em meios de culturas tradicionais sem adição de ácidos graxos, representado por *Malassezia pachydermatis* (GUILLOT; GHÉHO, 1995), e o segundo grupo representado pelas leveduras lipídependentes, que necessitam de adição de ácidos graxos de cadeia longa para o seu crescimento, no qual se inserem todas as demais espécies. Devido a essa característica, a exigência lipídica é o primeiro critério para a identificação desse gênero.

A parede celular de *Malassezia* spp. é mais espessa em comparação com outras leveduras, e constitui cerca de 26 a 37% do volume total da célula. Apresentam múltiplas camadas e pregas oferecendo uma vantagem no que diz respeito a proteção sobre outras espécies comensais da pele (ASHBEE; EVANS, 2002).

À morfologia podem ser caracterizadas como constituintes de um grupo de fungos leveduriformes, de aspecto globoso, ovoide ou cilíndrico, cuja reprodução assexuada se dá através de brotamento monopolar, com exceção da *M. sympodialis*, que também produz brotamentos simpodiais. Cada brotamento é separado a partir da célula mãe por um septo, seguido por fissão. A formação e separação de brotos geralmente deixam uma cicatriz pronunciada podendo ser observado um tipo de “colarete” que é bem visível à microscopia óptica. *M. furfur*, *M. globosa* e *M. obtusa* são espécies que se caracterizam por também formarem estruturas filamentosas, além das células leveduriformes (CRUZ, 2010; KURTZMAN et al., 2011).

M. pachydermatis cresce bem em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol produzindo colônias caracteristicamente convexas, pastosas, com uma superfície lisa e seca, inicialmente brancas a marfim e que escurecem para tons de castanho com o tempo. Apresentam-se com 3 a 5 mm de diâmetro ao sétimo dia de incubação; podem crescer entre 25°C e 41°C (sendo 37°C a temperatura ótima), são muito sensíveis ao frio, e o seu desenvolvimento é favorável em condições aeróbicas e microaerofílicas (GUILLOT; BOND, 1999).

Morfologicamente observa-se a levedura como células isoladas ou em grupos, com formato oval ou com germinação unipolar de base larga, adquirindo o formato de garrafa, estando, normalmente, ausentes as hifas e pseudohifas (GUÉHO et al., 1996; SCOTT et al., 1996).

As características macro e micromorfológicas não são suficientes para identificar as espécies de *Malassezia*. Elas apenas sugerem o gênero, de forma que é necessária a união entre morfologia, critérios bioquímicos e moleculares para identificação (GUILLOT et al., 1996; MAKIMURA et al., 2000; MIRHEND et al., 2005).

Alguns testes são utilizados para identificação e caracterização fisiológica de *Malassezia* spp, como: capacidade de crescer em meio de cultura isento de suplementação lipídica e à temperatura de 40°C; de assimilar Chremophor EL e Tweens 20, 40, 60, 80 e também capacidade de produzir catalase, urease e β -glicosidase (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT et al., 1996; HOOG et al., 2000; CABAÑES et al., 2007).

Doenças causadas por estes organismos estão associadas com fatores predisponentes como imunossupressão, dermatite alérgica, orelhas pendulares e peludas levando a uma alta umidade e acúmulo de cera no canal auditivo (MARKEY et al., 2013).

A maioria dos casos de malasseziose está associada com otite externa e dermatite seborréica em cães. Também estão associados com otite e acne no queixo em felinos (MARKEY et al., 2013). A otite externa em cães apresenta formações excessivas de cerume e prurido, determinando eritema do meato acústico externo (HIRAI et al., 2004).

Em um estudo de isolamento de leveduras da cavidade oral e vaginal de cadelas hígdas realizado por Sória et al. (2002) verificaram que 12 (85,71%) das 14 amostras eram leveduras. Das 30 colônias obtidas da mucosa vaginal 63,8% foram identificadas como *Malassezia pachydermatis*, 23,4% *Candida* spp e 12,8% *Rhodotorula* spp.

Brito et al. (2009), observaram que das 110 amostras da mucosa vaginal de cadelas hígdas 40,90% eram positivas para *Malassezia pachydermatis*, 6,36% para *Candida parapsilosis*.

3.2.3 Gênero *Rhodotorula*

As leveduras do gênero *Rhodotorula* constituem um grupo heterogêneo de fungos pertencentes à família *Sporidiobolaceae*, ordem *Sporidiales* (HOOG et al., 2000). A maioria das espécies pertence a classe *Microbotryomycetes*, e a classe *Cystobasidiomycetes* compreende as demais. Estas duas classes pertencem ao subfilo *Pucciniomycotina*. Três espécies são classificadas no subfilo *Ustilaginomycotina* (KURTZMAN et al., 2011).

São frequentemente isoladas de fontes naturais, superfícies úmidas, equipamentos médicos, e de outras fontes ambientais, incluindo cortinas de banheiros, banheiras e escovas de dente (WINN et al., 2008; MATTEI et al., 2014).

Rhodotorula spp é um gênero que também está representado por contaminantes transportados pelo ar e que podem se tornar comensais na pele e ser isoladas de urina e das fezes. O isolamento das secreções respiratórias em geral, tem pouca importância (WINN et al., 2008).

Apesar de considerado anteriormente um micro-organismo não patogênico, o agente já foi reconhecido como potencialmente nocivo à saúde, especialmente em pacientes imunossuprimidos (SAMONIS et al., 2001). Pode estar associada diretamente com catéteres (TUON et al., 2007), próteses e enxertos, (SAVINI et al., 2008; GOYAL et al., 2008) com casos de endocardite, (MAEDER et al., 2003) peritonite, (UNAL et al., 2009) e meningite (BARADKAR; KUMAR, 2008). Também é reconhecido como um agente causador de onicomicose (DA CUNHA et al., 2009).

Em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a 28-37°C, as colônias apresentam-se lisas, mucóides, brilhantes, arredondadas e com coloração variável de rósea ao avermelhado, devido aos pigmentos carotenóides (BISWAS et al., 2001). Muitas colônias apresentam aspecto mucóide devido à formação da cápsula, enquanto outras são pastosas ou secas e rugosas. Na microscopia observam-se blastoconídeos unicelulares ovóides ou alongados com reprodução por brotamento multilateral ou polar. Pseudohifas ou hifas verdadeiras podem se desenvolver. Não assimila inositol, hidrolisa a uréia e não possui capacidade fermentativa (LACAZ et al., 2002; KURTZMAN et al., 2011).

O gênero *Rhodotorula* inclui quarenta e sete espécies, sendo que apenas três têm sido relacionadas a infecções no homem: *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta*. A diferença entre estas espécies reside no perfil de assimilação de carboidratos e nitrato (WARREN; HAZEN, 1999; KURTZMAN et al., 2011)

Segundo Holanda et al. (2007), *Rhodotorula* spp têm sido apontadas como emergente em quadros de infecção humana. A presença de *Rhodotorula* spp é relatada com pouca frequência entre amostras clínicas provenientes de lesões de animais.

Em animais, já foi isolada do meato acústico externo (AMARAL et al., 1998), cavidade oral de cães (SANTIN, 2009), mucosa vaginal de gatas e de fêmeas caninas hígdas

(ANDRADE, 2006; CLEFF et al., 2007), da região perianal de cães saudáveis (BRITO et al., 2008) e do trato respiratório e digestório de caprinos e ovinos (SILVA, 2013).

Bentubo et al. (2010) avaliaram o pelame de 21 cães adultos. *Candida albicans* foi isolada de 95,2% dos animais (20/21), enquanto *R. mucilaginosa* foi identificada em 4,8% (1/21).

Santin et al. (2013) obtiveram da cavidade oral de cães sadios e com doenças orais, 61 isolados. A levedura encontrada com maior frequência foi *Malassezia* spp (50, 8%) e em quarto lugar *Rhodotorula* spp (13,1%).

Em 1992, Bourdeau et al. relataram um caso de dermatite por *R. mucilaginosa* em um gato, que apresentou lesões crostosas, vermelho-alaranjadas na ponte nasal e no nariz. O felino foi tratado com cetoconazol (via oral) por quatro meses e ainda estava em remissão após 18 meses.

Gomes (2006) isolou de mucosa vaginal de 27 cabras no período pós-parto, e 1,14% das amostras obtidas pertenciam ao gênero *Rhodotorula*.

Shokri et al. (2010) identificaram leveduras no trato genital de dromedários fêmeas saudáveis. Foram obtidas 454 colônias de leveduras que pertenciam a oito gêneros diferentes. *Candida* foi o gênero mais frequente (73,1%) e *Rhodotorula* apareceu em quinto lugar com 2,4%.

3.2.4 Gênero *Trichosporon*

Os fungos leveduriformes do gênero *Trichosporon* pertencem ao Filo *Basidiomycota*, Subfilo *Agaricomycotina*, Classe *Tremellomyceles*, Ordem *Tremellales*, Família *Trichosporonaceae* (KURTZMAN et al., 2011). São amplamente distribuídos em regiões de clima tropical e temperado. Podem ser encontrados no solo, materiais em decomposição, leite e derivados, regiões hipersalinas, excreta de pombos. Em humanos podem constituir a microbiota da pele, unhas, trato respiratório, digestivo e trato genital (KONTOYIANNIS et al., 2004; STURSOVÁ et al., 2012)

À microscopia, o gênero pode ser identificado por suas hifas hialinas e septadas que se fragmentam em atroconídeos, os quais podem ser retangulares, ovóides ou redondos. Ao se reproduzirem também por meio de blastoconídeos, podemos fazer a sua diferenciação do gênero *Geotrichum*, que não é capaz de produzir esse tipo de estrutura reprodutiva (CRUZ, 2010).

A distribuição entre as espécies tem por base as seguintes características: capacidade de crescimento a 37° C, a produção de apressórios (estruturas de aderência a superfícies), sensibilidade à ciclohexamida e assimilação de carboidratos (CRUZ, 2010).

Trichosporon spp pode ser semeado em ágar Sabouraud dextrose e incubado entre 25 e 30° C. As colônias crescem rapidamente, apresentando uma coloração creme. Podem ser úmidas ou secas, com ou sem cobertura de aspecto farináceo, com superfície lisa, tornando-se rugosas e cerebriformes mais tarde (MEZZARI, 2001; KURTZMAN et al., 2011).

Apesar de mais demorados, os métodos clássicos de identificação laboratorial de leveduras patogênicas ainda são mais eficientes do que os meios comerciais cromogênicos para diferenciação das espécies de *Trichosporon* (BENTUBO et al., 2013).

Trichosporon asahii, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* são consideradas espécies que essencialmente ocupam nichos ecológicos não vertebrados, mas que possuem habilidade relativamente pronunciada de sobreviver em tecidos de organismos vertebrados, onde são capazes de desenvolver micoses oportunistas superficiais e profundas (HOOG et al., 2000)

Além das infecções superficiais (pedra branca, dermatites e onicomicoses) às quais o gênero *Trichosporon* pode ser relacionado, quadros de tricosporonose disseminada também

têm sido observados. Esses casos de infecção invasiva são mais comuns em pacientes imunossuprimidos, como portadores da síndrome da imunodeficiência (COPPOLA et al., 1993); transplantados (MORETTI-BRANCHINI et al., 2001) e aqueles com doenças hematológicas malignas (MEYER et al., 2002). As taxas de mortalidade podem chegar a 80%, mesmo após o início da terapia antifúngica (NUCCI et al., 2010; COLOMBO et al; 2011)

Santos (2006) isolou fungos filamentosos e leveduriformes da mucosa vaginal de 40 cadelas, onde 3,6% das amostras obtidas eram *Trichosporon* spp.

Victoria e Langoni (2006) relataram a ocorrência de mastite clínica e subclínica causada por *Trichosporon beigeli* em um rebanho leiteiro, sendo que o fungo foi isolado em quatro animais com mastite clínica e três com mastite subclínica.

3.3 Fatores de Virulência

Os micro-organismos expressam mecanismos que permitem a colonização ou infecção do hospedeiro, e neste contexto, expressam uma série de estratégias específicas, para se estabelecer, colonizar, causar a doença e superar as defesas do hospedeiro susceptível (NAGLIK et al., 2003). Estas estratégias específicas, em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos micro-organismos quando submetidos a certas condições.

Nas últimas décadas, as enzimas dos patógenos microbianos têm merecido atenção pelo seu potencial papel na patogênese, e como possível alvo para confecção de inibidores sintéticos que possam tratar as infecções. Essas enzimas desempenham papel importante no metabolismo dos fungos, porém podem estar envolvidas na patogênese da infecção, causando dano ao hospedeiro e suprindo nutrientes necessários para o fungo (CASADEVALL; PIROFSKI, 2007).

A aderência, formação de tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa, variabilidade fenotípica, variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e hidrofobicidade de superfície celular, constituem os principais fatores que conferem a habilidade de colonizar e posterior desencadeamento de infecções (GHANNOUM; RADWAN, 1990; CALDERONE; FONZI, 2001).

3.3.1 Aderência

A aderência se deve a características químicas e estruturais da parede celular. O agente possui um composto químico que permite a união, composto este que é uma manoproteína, enquanto que a estrutura é uma capa fibrilar que recobre a parede. Outras moléculas de aderência foram descritas, como as adesinas (lectinas e glicoproteínas de superfície), que tem a capacidade de identificar vários tipos de açúcares e receptores para a fração C3b do sistema complemento. Por parte do hospedeiro, os receptores protéicos (laminina, fibronectina e fibrina) presentes na superfície celular das mucosas, favorecem a colonização da matriz extracelular. Um micro-organismo pode expressar uma ou mais adesinas e esta interação pode ser influenciada por fatores ambientais ou do hospedeiro, tais como temperatura, pH, nutrientes, IgA secretória e hidrofobicidade superficial celular. (GHANNOUM; RICE, 1999).

A aderência é o primeiro passo nos processos infecciosos e sendo assim, é necessário que o fungo expresse diferentes moléculas na superfície, que serão responsáveis por esse processo. Essas moléculas apresentam uma expressão diferencial na fase levedura e na fase hifa. O processo de adesão é importante para a colonização e posterior invasão dos fungos no tecido hospedeiro (CASADEVALL, 2007).

Kimura e Pearsall (1980) mostraram a correlação entre a germinação e o aumento da adesão de *Candida albicans* de células epiteliais bucais de humanos, indicando que a

germinação ou outras alterações relacionadas a germinação dos fungos foram responsáveis por um aumento da adesão.

3.3.2 Protease e fosfolipase

Muitos fungos secretam proteases extracelulares que estão relacionadas com a patogênese. Estas enzimas hidrolisam ligações peptídicas de importantes proteínas do tecido do hospedeiro (colágeno), digerem proteínas de importância imunológica (anticorpos e complementos), e facilitam a aderência e a sobrevivência do patógeno em superfícies mucosas (CHEN et al., 1996; KUROKAWA et al., 1998).

Segundo Staib et al. (2000), proteases ácidas produzidas por leveduras do gênero *Candida* estão envolvidas no processo de invasão tecidual bem como associadas à aderência nos tecidos do hospedeiro. *C. albicans* e *C. tropicalis* causam infecção em animais imunocomprometidos por produzirem inclusive uma aspartato-proteinase extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência.

A secreção de proteinases ocorre pelos genes denominados Saps (Secreted aspartyl proteinases), muito importantes e bem conhecidos em *C. albicans*. As proteinases facilitam a invasão e colonização de tecidos dos hospedeiros pela ruptura das mucosas e degradam importantes proteínas de defesa imunológica e estrutural (SILVA, 2010), como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucina, lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas como as da classe IgA (NAGLIK et al., 2003; COSTA et al., 2009;). Já foram identificados dez genes Saps em *C. albicans* (NAGLIK et al., 2008), quatro em *C. tropicalis*, três em *C. parapsilosis* (MERKEROVA, 2006) e nenhum em *C. glabrata* (SILVA, 2010) e em outras espécies (BRANCO et al., 2012).

A produção de proteinase extracelular tem sido apontada como relevante na virulência de determinadas cepas. Muitos micro-organismos patogênicos possuem enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou danificam a integridade da membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção ou interrupção das suas atividades, representando importante mecanismo de patogenicidade de *C. albicans*, possivelmente por facilitar sua penetração nos tecidos (MARTINS et al., 2002).

Batista (2009) encontrou 91,0% de positividade para proteinase em amostras de *C. parapsilosis* provenientes de catéter e do sangue de neonatos.

As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de hidrolizar uma ou mais ligações ésteres de glicerofosfolipídeos. As ações das fosfolipases podem resultar em desestabilização de membranas, lise celular e liberação de lipídeos (SCHMIEL; MILLER, 1999; GHANNOUM, 2000).

A atividade da fosfolipase já foi detectada em *C. albicans*, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula rubra*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii* (WITT et al., 1984; MAYSER et al., 1996; RICIPUTO et al., 1996; VIDOTTO et al., 1996; CHEN et al., 1997; PEDROSO et al., 2004; BARONI, et al., 2006).

Pugh e Cawson (1975), demonstraram através de microscopia eletrônica que a atividade lipolítica da fosfolipase, apesar de presente na célula na forma de levedura, encontra-se concentrada na extremidade da levedura, facilitando a adesão tecidual e agindo sobre os constituintes lipídicos das membranas das células.

As fosfolipases são possuidoras de dupla importância na ação infecciosa de *C. albicans*, mediante participação no controle de crescimento do fungo, em decorrência da sua presença nas extremidades das formas miceliais e atuação também na danificação dos constituintes lipídicos das estruturas celulares integrantes da superfície da mucosa infectada (PRINCE et al., 1982; GHANNOUM, 1990;).

A fosfolipase produzida é considerada um fator de virulência já que pode digerir membranas celulares e promover lise celular (SANTAGELO et al., 1999), além de destruir substância surfactante nos pulmões, facilitando, com isso, a adesão da levedura (VIDOTTO et al., 1996; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

Segundo Casadevall (2007) para *Candida albicans*, a atividade da fosfolipase detectada nos meios de cultura, e foi devido a fosfolipase B (PL B). A expressão dessa enzima pode ser regulada por suplementação nutricional, temperatura, pH e fase de crescimento das células de *C. albicans*. As funções das PLs durante a infecção não são precisamente entendidas, mas acredita-se que estejam envolvidas na penetração na célula hospedeira, adesão e invasão à célula epitelial. Cepas de *C. albicans* que não possuem atividade de fosfolipase, apresentam uma menor virulência (CASADEVALL, 2007).

De 61 amostras de *Candida* spp. isoladas por Kumar et al. (2006), provenientes de pacientes com câncer e soropositivos para o HIV, 42 (68.85%) produziram fosfolipase e a atividade da proteinase foi detectada em 51 (83.6%). Neste mesmo estudo, dos 34 isolados de *C. albicans*, em 100% foi observada a atividade da fosfolipase e em 94.1% (32/34) também a atividade de proteinase.

Um estudo realizado por Corrêa et al. (2009) foram detectadas as enzimas fosfolipase e protease em cepas isoladas da mucosa vaginal de mulheres adultas, comprovando a alta patogenicidade de *Candida albicans*, especialmente nas do grupo não sintomático.

D'êça Junior et al. (2011) observaram que de 82 isolados, oriundos de sítios diversos de pacientes hospitalizados, 56 (68,3%) apresentaram atividade de fosfolipase positiva e 16 (44,4%) foram positivos para atividade de proteinase. *C. tropicalis* foi a espécie que apresentou o maior número de isolados positivos para fosfolipases (91,7%). Quanto à produção de proteinases ácidas, os isolados de *C. parapsilosis* testados foram os maiores produtores (69,2%).

Branco et al. (2012) verificaram a produção das exoenzimas proteinase, fosfolipase, gelatinase e hemolisina de amostras bucais de *Candida* isoladas de 49 pacientes com Aids (grupo teste) e de 26 indivíduos hígidos (grupo controle). *C. albicans* foi a espécie mais prevalente no grupo teste (59,2%) e *Candida parapsilosis* (53,8%) no grupo controle. *C. albicans* apresentou resultados significativos para a produção de proteinase em ambos os grupos.

Sachin et al. (2012) isolaram 110 espécies de *Candida* spp, provenientes de diversas amostras clínicas. A atividade da fosfolipase foi detectada em 60,9% dos isolados, enquanto 59,1% produziram proteinase e a atividade da hemolisina foi demonstrada em 51,8% dos isolados de *Candida*.

No trabalho realizado por Ortiz et al. (2013), foi observado que 75,8% das cepas de *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com otite apresentaram atividade da fosfolipase em pH 6,3, 81% apresentaram atividade da protease em pH 6,3 e 97,9% em pH 6,8. Detectou-se uma maior atividade da fosfolipase em cepas isoladas de cães com otite.

Bentubo e Gonpertz (2014) verificaram a atividade enzimática em diferentes espécies de *Trichosporon*. As proporções das amostras que produziram cada tipo de enzima foram as seguintes: lipases (95.5%), fosfolipases (56.8%), proteases (50,0%) e DNases (38.6%). A temperatura de incubação foi um fator importante para a expressão da atividade enzimática, e que influencia o período de incubação de cada espécie.

3.3.3 Hialuronidase

Hialuronidase é um termo geral utilizado para descrever as enzimas que são capazes de quebrar o ácido hialurônico. No entanto, algumas destas enzimas são também capazes de clivar o sulfato de condroitina, embora a um ritmo mais lento (KREIL, 1995). As

hialuronidases são um grupo de enzimas que predominantemente promovem a degradação do ácido hialurônico, aumentando assim a permeabilidade de tecidos conjuntivos, promovendo significativamente a diminuição da viscosidade e facilitando a proliferação celular entre os tecidos, resultando na degradação da matriz extracelular, favorecendo a expansão de processos inflamatórios, e também decresce a viscosidade dos fluídos corporais (MADIGAN et al., 1997).

A produção da exoenzima hialuronidase por micro-organismos pode afetar a permeabilidade do epitélio do hospedeiro por agir nos espaços intercelulares. Acredita-se que esta enzima desempenha um papel na patogenicidade de vários fungos, principalmente espécies do gênero *Candida* (SHIMIZU et al., 1995).

De acordo com Bornstein e Sage (2002), a degradação da matriz extracelular é um evento essencial em muitos processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos. Entretanto, quando ocorre um descontrole, principalmente da enzima hialuronidase, podem se instalar condições patológicas como artrite reumatóide, osteoartrite, doenças autoimunes e alterações estruturais na derme.

Shimizu e Almeida (1989), verificaram a produção de hialuronidase e demais enzimas em diferentes amostras bacterianas, isoladas da cavidade bucal. Hialuronidase foi produzida por 20 das 30 amostras de *Staphylococcus aureus*, 18 das 21 amostras de *Streptococcus pyogenes* e todas as 4 amostras de *Actinomyces viscosus*.

Coutinho e Paula (2000) comprovaram a produção de hialuronidase e outras enzimas por *Malassezia pachydermatis* de amostras oriundas de cães com otite e dermatite. A hialuronidase foi produzida por todos os isolados da pele (15/15) e 14 dos 15 isolados do canal auditivo.

3.3.4 Condroitinsulfatase

Condroitinsulfatase é considerada um fator de virulência para qualquer disseminação ou penetração nos tecidos, favorecendo a dispersão de micro-organismos. Este factor de virulência catalisa a despolimerização do sulfato de condroitina, um dos constituintes básicos do tecido hospedeiro (SCHAECHTER et al., 1993).

Hershon (1971) comparou amostras do sulco gengival de dois grupos: um com envolvimento periodontal e o outro sem evidências de doença periodontal. Em 96% dos sulcos amostrados em pacientes "normais" não conseguiu demonstrar qualquer atividade da condroitinsulfatase, enquanto que esta atividade mostrou um aumento acentuado em pacientes com doença periodontal.

Linares et al. (2007) compararam condroitinsulfatase com outras enzimas de 18 amostras de *C. dubliniensis* e de 30 amostras de *C. albicans* obtidas de pacientes com AIDS. Todas as cepas de *C. dubliniensis* expressaram atividade da condroitinsulfatase, mas nenhuma delas mostrou-se significativamente diferente daquelas observadas em *C. albicans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Desenvolvimento

A coleta de material da mucosa cérvico-vaginal foi realizada em locais distintos: Projeto Castração, Projeto S.O.S. da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e propriedades particulares do município do Seropédica.

O processamento do material, envolvendo isolamento, identificação, caracterização fenotípica e testes de virulência foi realizado no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA)- do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária no Instituto de Veterinária da UFRRJ – (DMIV-IV-UFRRJ).

4.2 Seleção dos Animais

Foram utilizadas 40 fêmeas caninas a partir de seis meses de idade e sem distinção com relação a raça, sendo um grupo constituído de cadelas não castradas (n=20) e outro de cadelas gestantes (n=20).

Para inclusão no estudo os animais foram previamente submetidos a exames clínicos e complementares (hemograma com pesquisa de hemoparasitos e bioquímica renal e hepática) para verificar a higidez.

4.3 Coleta do Material

Todas as coletas foram realizadas no período de agosto de 2013 a março de 2015. O material cérvico-vaginal foi obtido por meio de duas coletas consecutivas, a primeira por um lavado cérvico-vaginal e a segunda com o auxílio de “swabs” estéreis. Posteriormente, mensurou-se, em cada animal o pH da mucosa vaginal com fita de pH da Macherey-Nagel.

4.3.1 Lavado cérvico-vaginal

Com o animal em estação e a cauda levantada, realizou-se prévia limpeza da região vulvar com solução fisiológica. Os membros posteriores foram levantados suavemente, separando-se os lábios vulvares gentilmente com uma das mãos e com a outra introduzindo-se por meio de seringa descartável, solução salina estéril em volume variando de 10 a 20 ml, conforme o peso do animal. A região perivulvar foi massageada e, em seguida o líquido injetado foi resgatado em um recipiente estéril, retornando o animal para sua postura inicial. Este procedimento foi adaptado de Fraga et al. (2008) (Figura 1).

Os lavados relativos a cada animal foram transportados sob refrigeração ao Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia Veterinária – IV - UFRRJ para processamento.



Figura 1 – Introdução do lavado cérvico-vaginal pela vulva, com membros posteriores levantados.

4.3.2 “Swab” cérvico-vaginal

A amostra foi coletada com o animal contido em estação. Com a cauda elevada realizou-se limpeza da região vulvar com solução fisiológica, seguida da introdução do “swab” esterilizado e umedecido previamente com solução salina a 0,9% estéril, o qual foi introduzido em ângulo, inicialmente, de 45° e depois 180°, girando-o gentilmente contra a parede cérvico-vaginal. Em seguida, removeu-se o swab mantendo-o refrigerado até o processamento (Figura 2).



Figura 2 – Coleta de amostra ginecológica pelo “swab”.

4.3.3 Lavado uterino

A análise uterina foi realizada em cinco animais do grupo I (cadelas não ovariectomizadas).

Após a ovariosalpingohisterectomia, o útero foi colocado em placa de Petri (14x14mm) esterelizada e levada imediatamente ao Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia Veterinária – IV - UFRRJ para processamento.

4.4 Processamento das Amostras

4.4.1 Isolamento das leveduras dos lavados e dos “swabs”

Os lavados cérvico-vaginais armazenados sob refrigeração, após homogeneização, foram semeados na superfície de meio de cultura Ágar Infuso de Cérebro e Coração (BHIA), acrescido de cloranfenicol, contido em placas de Petri de 90 mm x 10 mm (15ml/placa). Efetuou-se a distribuição de 1,0 ml da amostra pela técnica “pour plate”. Para cada material foram empregadas três placas, sendo as mesmas incubadas a 25°C, 32°C e 37°C. As leituras foram realizadas a partir do terceiro ao quinto dia de inoculação. O restante da amostra foi armazenado sob refrigeração.

Com relação aos “swabs” coletados, os mesmos foram estriados na superfície de meio de cultura em placas de Petri, seguindo-se os mesmos procedimentos já especificados para os lavados.

4.4.2 Isolamento das leveduras do lavado uterino

Inicialmente o útero foi lavado com solução salina estéril a 0,9%, com auxílio de uma seringa e agulha estéril. Realizou-se prévia limpeza com álcool etílico 70% da extremidade do útero onde foi introduzida a seringa, em seguida, injetou-se um volume variando de 5 a 10 ml de acordo com o tamanho do útero, este líquido foi resgatado em um recipiente estéril e inoculado em meio de cultura (BHIA), o mesmo procedimento foi realizado para o isolamento do lavado cérvico-vaginal.

As figuras 3 e 4 exemplificam os isolamentos ocorridos nas placas semeadas após o período de incubação. A partir de então, iniciou-se a identificação.



Figura 3 – Crescimento de *Candida* spp, *Malassezia* spp e *Rhodotorula* spp após inoculação do lavado cérvico-vaginal.

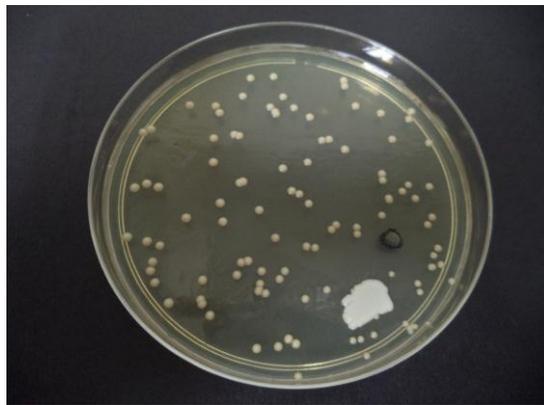


Figura 4 – Crescimento de *Malassezia* spp e fungo filamentosos.

4.6 Identificação das Leveduras Isoladas

A identificação foi realizada prioritariamente segundo Kurtzman e Fell (1998), e complementarmente utilizando o protocolo de identificação de leveduras do LLPA (anexo 10). As diferentes colônias foram estudadas quanto aos aspectos macro e micromorfológicos, bem como as características fisiológicas e bioquímicas. Em adição, em alguns casos, utilizamos Chromogar® e Chromid® e o Sistema Candfast®, os dois primeiros, meios cromogênicos e o terceiro um método de identificação comercial, como auxiliares no processo de identificação.

4.7 Análise Inicial dos Isolados e Manutenção das Amostras

Inicialmente foram realizados exames macromorfológicos das colônias isoladas. As colônias inicialmente com coloração branca, creme ou mesmo rósea e com aspecto cremoso, mucóide, pastoso, brilhantes ou secas, mas com características de leveduras foram selecionadas para estudo. Nas placas em que as colônias não estavam isoladas, realizou-se a técnica do esgotamento por estrias, visando facilitar o isolamento (WINN et al., 2008).

Para a manutenção e caracterização de leveduras presumivelmente pertencentes aos gêneros *Malazzesia*, *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* etc, foram realizadas culturas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e extrato de levedura a 1% (Figura 5). Os cultivos foram incubados a 32°C por até 48 horas e posteriormente, refrigerados. As amostras eram observadas periodicamente e repicadas com intervalos mensais até completa identificação. Objetivando a manutenção das culturas em coleção, as mesmas foram também repicadas para PDA (Potato dextrose Agar), acrescentando-se óleo mineral após o desenvolvimento da colônia (Figura 6).



Figura 5 – Colônias obtidas das amostras mantidas em ágar Sabouraud cloranfenicol e extrato de levedura a 1%.



Figura 6 – Colônias em PDA, cobertas com óleo mineral após crescimento.

4.7.1 Características macromorfológica

A caracterização macromorfológica das colônias leveduriformes foi realizada por meio da observação destas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol acrescido de extrato de levedura a 1%. Foram avaliadas características do anverso e reverso das colônias, bordas, consistência, coloração e textura. Considerando que, as leveduras apresentam colônias circulares ou ovais, frequentemente convexas, mas podendo ser planas e de consistência pastosa, cremosa ou mucóide, com crescimento limitado. A coloração pode ser branca a creme, levemente amarelada ou ocre, alaranjada ou mesmo escuras. Podem ser brilhantes ou opacas (Figura 7 e 8).



Figura 7 – Aspecto de colônias do gênero *Candida*



Figura 8 – Aspecto de colônias de *Rhodotorula* spp

4.7.2 Características micromorfológicas

Para avaliação dos aspectos micromorfológicos foi realizado exame direto através da utilização de parte da colônia corada com lactofenol azul de algodão, entre lâmina e lamínula, de acordo com as figuras 9 e 10. Esta etapa foi realizada com a finalidade de identificar células com morfologia compatível com leveduras. As características observadas foram quanto ao formato das células, tipo de brotamento e presença ou não de micélio.

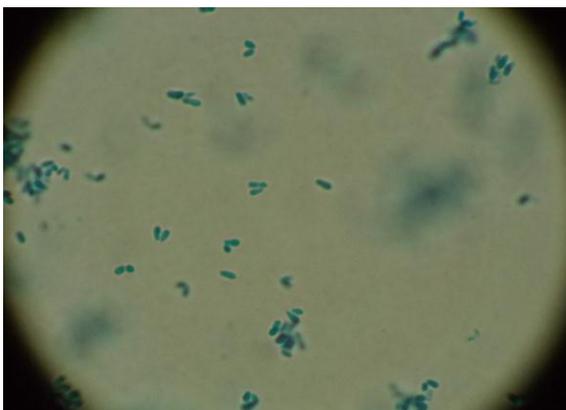


Figura 9 – Microscopia (400X) de *Malassezia pachydermatis*, corada com azul de algodão.

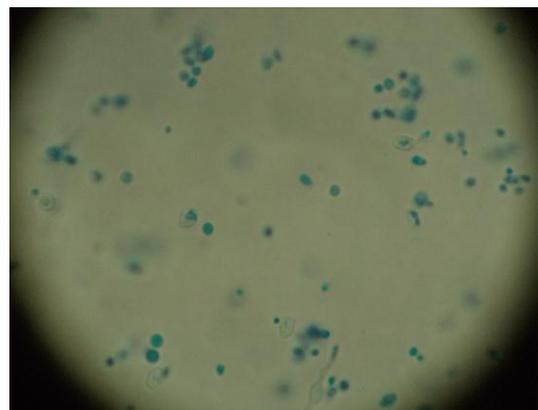


Figura 10 – Microscopia (400X) de *Candida* spp, corada com azul de algodão.

4.8 Caracterização dos Gêneros e Espécies dos Isolados

4.8.1 *Candida* spp

4.8.1.1 teste do tubo germinativo

Repiques recentes (48horas) das amostras a serem identificadas foram inoculados em tubos do tipo *ependorf* esterilizados, contendo soro sanguíneo equino, esterilizado por filtração em membrana milipore 0,22 μ . Os tubos inoculados foram incubados em estufa microbiológica a 37°C por um período de duas a três horas, com agitação periódica e, posteriormente, foi realizada a observação em microscópio óptico do material, para verificar ou não o desenvolvimento do tubo germinativo. Para tal, empregou-se duas a três gotas do soro cultivado com uma gota de nigrosina (Figura 11).

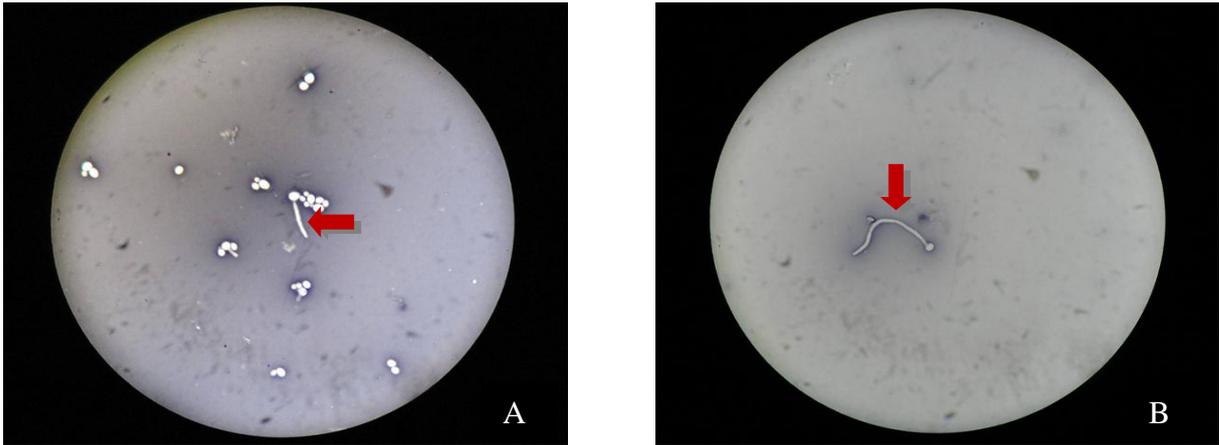


Figura 11 – Tubo germinativo em soro sanguíneo. Lâmina preparada com nigrosina para microscopia (400X) (A e B).

4.8.1.2 cultivo em ágar arroz

Para a produção de clamidoconídios e blastoconídios, foram utilizadas placas de Petri descartáveis com 50 mm de diâmetro e com baixa camada de meio Ágar Arroz semeadas com repiques recentes dos isolados. Após a semeadura, as superfícies semeadas foram cobertas com lamínulas estéreis e as placas incubadas a 32°C, com observação ao microscópio óptico a partir das primeiras 48 horas, diretamente sobre o meio, sem retirar a lamínula, conforme o ilustrado pela figura 12.

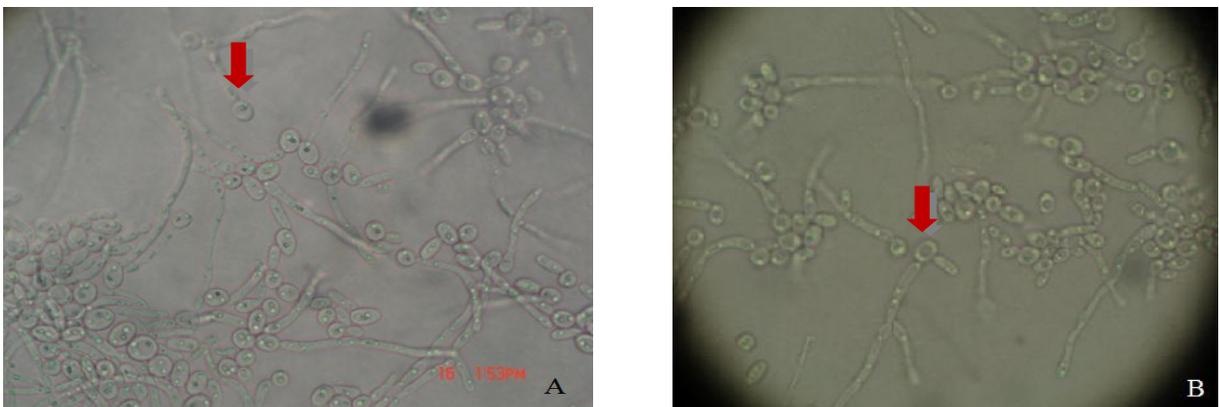


Figura 12 – Produção de clamidoconídeos em meio de cultivo Agar Arroz (Microscopia 400X) (A e B).

4.8.1.3 auxanograma

Em sequência, foram realizadas provas de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas (auxanograma), disponibilizadas no anexo 10, objetivando identificação das amostras.

Foram utilizados os meios YNB (Yeast Nitrogen Base) – Difco® e YCB (Yeast Carbon Base) – Difco®, para fontes carbonadas e nitrogenadas, respectivamente. Os meios foram preparados conforme as especificações do fabricante (anexo 7 e 8).

Das colônias, de leveduras, recém-cultivadas em meio ágar Sabouraud enriquecido com extrato de levedura, preparou-se uma suspensão equivalente ao grau 4 da Escala de McFarland.

Uma alíquota de 1 ml da suspensão foi transferida para placas de Petri, que foram imediatamente cobertas pelo meio YNB, em um volume de 18 ml por placa, previamente fundido, autoclavado, resfriado e mantido a temperatura de 50°C em banho Maria.

Em seguida, foi realizada a sua homogeneização e resfriamento em temperatura ambiente, para que o meio pudesse solidificar. Cada placa foi identificada de acordo com o número da amostra e com as fontes carbonadas utilizadas.

As fontes carbonadas foram depositadas (0,001g) na superfície do meio solidificado, na proximidade da parede de cada placa, totalizando quatro fontes por placa. Terminando este procedimento, o material foi incubado a temperatura ambiente, e a primeira leitura foi realizada em 24 horas se estendendo até o 4º dia. Os resultados positivos eram computados de acordo com o crescimento das leveduras na região onde a fonte específica foi depositada (figura 13 e 14).

Para os testes com fontes nitrogenadas, foi utilizado o meio YCB, e o procedimento foi igual ao descrito para as fontes carbonadas.

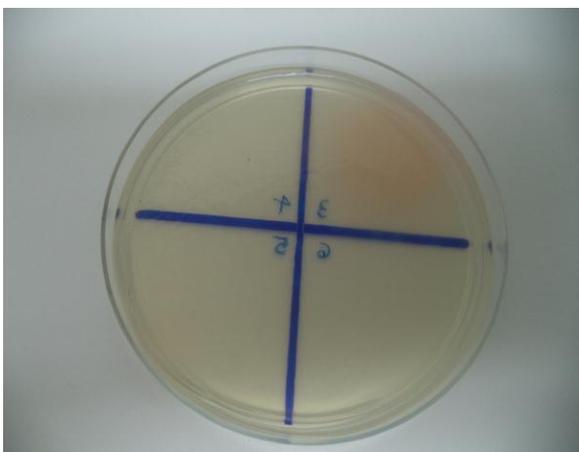


Figura 13 - Prova de auxanograma evidenciando assimilação de sacarose por *Rhodotorula* spp

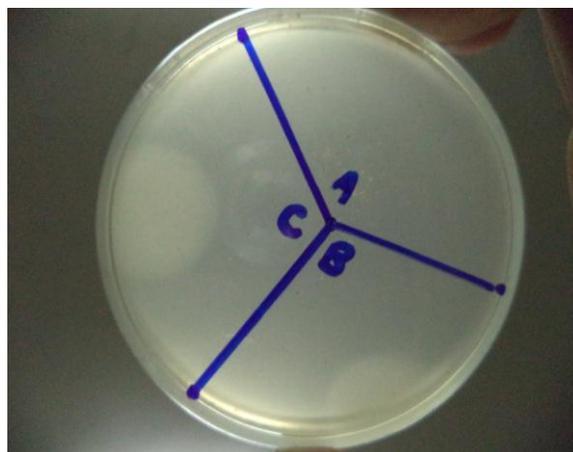


Figura 14 - Assimilação de N-acetil-glucosamina e por peptona por *Candida* spp.

4.8.1.4 zimograma

A fermentação foi realizada para as seguintes fontes carbonadas: maltose, galactose, sacarose, rafinose, dextrose, lactose e trealose. No procedimento, igual volume de água destilada peptonada (peptona de caseína 1%) foi distribuída em iguais volumes de 03 ml, em tubos de ensaio com tampa rosqueável de baquelite. Um tubo invertido (tubo de Durham) foi colocado no fundo de cada tubo de ensaio a fim de detectar possível produção de gás. O processo de autoclavação dos tubos foi realizado a uma temperatura de 121°C por 20 minutos.

Para realização dos testes de fermentação, uma alíquota da amostra a ser identificada foi semeada em sete tubos, que foram acrescidos dos açúcares mencionados, previamente esterilizados. As leituras, considerando a produção de gás (figuras 15 e 16), foram realizadas a partir das primeiras 48 horas, estendendo-se até o 15º dia.



Figura 15 – Teste de fermentação de carboidratos (zimograma).



Figura 16 – Formação de bolhas devido a produção de gás.

4.8.1.5 chromagar®

Chromagar® é um meio de cultura diferencial cromogênico. Foi utilizado como auxiliar na identificação presuntiva de espécies de *Candida*, partindo do princípio do desenvolvimento de cores diferentes para as principais espécies, ilustrado conforme as figuras 17 e 18. As amostras suspeitas de *Candida* foram inoculadas neste meio, e incubadas a temperatura de 32°C por até 72 horas.



Figura 17 – Amostras suspeitas de *Candida* inoculada em Chromagar®.



Figura 18 – Coloração azul nas colônias de *Candida tropicalis*

4.8.1.6 candfast®

O Candfast® é um teste comercial de identificação das principais leveduras patogênicas, e foi utilizado como um teste complementar. Consiste em uma bandeja-teste e cada bandeja possui duas fileiras de 8 poços, uma para identificação e a outra para o teste de resistência. Na fileira da identificação, o poço 1 contém o reagente (vermelho de fenol, actidione e glicose). Os poços de 2 a 8 contêm vermelho de fenol e cada um com um açúcar diferente (glicose, galactose, trealose, maltose, celobiose, rafinose e lactose). Cada bandeja é recoberta por uma fita transparente e aderente. O *kit* apresenta ainda um frasco com um reagente identificado como “reagente 1”. Com o uso de pipeta tipo Pasteur, uma colônia isolada foi adicionada ao “reagente 1” que foi submetido a homogeneização.

A bandeja teste foi marcada para identificar a amostra que foi analisada. Levantou-se a fita adesiva e em cada poço da primeira fileira foi adicionado 100 µl do reagente 1 após o inóculo e 2 gotas de óleo mineral. A fita adesiva foi recolocada e a bandeja incubada a 37°C, com leitura realizada em 24 a 72 horas após incubação.

4.8.1.7 chromid®

O Chromid® é um meio cromogênico utilizado para o diagnóstico rápido de *Candida albicans*, cujas colônias são azuis, pela hidrólise específica de um substrato cromogênico hexosaminidase. A hidrólise de um segundo substrato (coloração rosa) diferencia culturas mistas e orienta a identificação de outras espécies. Este meio foi utilizado apenas como um teste complementar, em algumas situações. As amostras suspeitas de *Candida* foram inoculadas neste meio, e incubadas a temperatura de 32°C por até 24 horas.

4.8.2 *Malassezia* spp

As amostras compatíveis macro e micromorfológicamente com o gênero *Malassezia* foram avaliadas quanto às características bioquímicas como crescimento em meio de cultura sem adição de ácidos graxos de cadeia longa, como o meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol para comprovação da não lipodependência e através dos testes de produção de urease e catalase.

4.8.2.1 urease

O teste da hidrólise da uréia foi realizado através da semeadura da levedura com 24 horas de prévio cultivo, com auxílio da alça de platina, em meio de Christensen sólido. O material foi incubado a 37°C por 48 horas com observação da troca da coloração do meio provocada pelo indicador de pH, quando ocorre a hidrólise. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram mudança da coloração inicial, de amarela para rosa, conforme figura 19.



Figura 19 – Prova positiva de urease em meio Christensen.

4.8.2.2 catalase

A reação de catalase, que detecta a presença desta enzima, foi avaliada a partir da reação de uma alçada da colônia em estudo (obtida através de subcultura de 24-48h) com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de microscopia. Nos casos positivos, o contato produz o desdobramento da H₂O₂ em H₂O e em O₂ e apresenta formação de bolhas.

4.8.3 *Rhodotorula spp* e *Trichosporon spp*

Para a identificação das leveduras do gênero *Rhodotorula* e *Trichosporon* foram consideradas as características macro e micromorfológicas das colônias, e os testes bioquímicos como o auxanograma e o zimograma, cujas metodologias já foram descritas.

4.9 Contagem Total de Leveduras

Nas placas de Petri em que o lavado cérvico vaginal foi inoculado (1,0ml) foi realizada a contagem total de leveduras com auxílio da lupa. As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contabilizadas, tendo seu resultado multiplicado pelo volume total do lavado adquirido, e posteriormente foi calculada a média simples entre as placas.

Nos casos em que houve um crescimento exacerbado da levedura (> 300 UFC/ placa), conforme figura 20, procedeu-se à feitura de diluições seriadas, efetuando-se plaqueamento destas diluições e, posteriormente, multiplicando-se o número de colônias emergentes pelo fator de diluição e, então pelo volume total da amostra (MARKEY et al., 2013).

Foi transferido 1 mL da amostra (mantida sob refrigeração) para tubo de ensaio contendo 9 mL do diluente cloreto de sódio a 0,9%, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Esse processo foi repetido para obtenção das diluições 10^{-2} até a 10^{-6} (Figura 22).

As leveduras foram determinadas, com inoculação de 1 ml de cada diluição, na superfície de placas de Petri contendo Agar Infuso de Cérebro e Coração (BHIA) e posterior incubação a 32°C por até 4 dias. Após o crescimento, as placas nas quais houve número de colônias entre 30 e 300 foram separadas para contagem, como exemplificada na figura 21.



Figura 20 – Crescimento exacerbado de leveduras.



Figura 21– Melhor visualização das UFC após diluição.



Figura 22 – Diluição seriada até 10^{-5}

4.10 Fatores de Virulência

4.10.1 Produção de protease

Para a pesquisa de produção de protease, foi empregado um meio de cultura composto de uma parte básica, autoclavada, e de uma porção contendo soroalbumina bovina esterilizada por filtração (anexo 12), sendo estas partes misturadas após resfriamento da parte autoclavada a 50°C , com distribuição em placas de Petri estéreis.

As amostras testadas foram previamente repicadas em meio Sabouraud dextrose 4% sendo cultivadas por 48 horas para ativação.

A semeadura foi feita na parte central da superfície do meio. Todas as culturas foram testadas em duplicata e incubadas a 32°C com leituras do 3^o ao 15^o dia.

A produção de protease foi verificada pela presença de um halo translúcido ocorrente em torno do ponto de crescimento da colônia. A atividade proteolítica enzimática (Pz) da cepa testada, foi estimada pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp), ou seja $Pz = dc/dcp$. Assim, após observação visual da presença do halo, uma régua graduada em milímetros e transparente, foi empregada para medições dos diâmetros das colônias e dos halos. Os valores obtidos foram anotados a cada leitura, considerando-se a última como leitura definitiva. A leitura definitiva foi considerada aquela em que não mais se verificou alterações nos valores dos diâmetros dos halos. Os resultados considerados como definitivos foram classificados conforme tabela I.

4.10.2 Produção de fosfolipase

Para o teste de produção de fosfolipase, foi utilizado o meio Agar fosfolipase (PRICE et al, 1982) que apresenta em sua composição, gema de ovo e CaCl_2 . O meio preparado foi vertido para placas de Petri.

As amostras, antes do teste, foram previamente cultivadas em meio Sabouraud dextrose 4% por 48 horas com o objetivo de ativá-las. As amostras ativadas foram semeadas assepticamente em um ponto único, centrado na superfície do meio de cultivo. Os testes foram realizados em duplicata e a incubação foi feita em estufa regulada para 32°C .

As cepas produtoras de fosfolipase, ao promoverem sua difusão no meio, propiciam a formação de uma área de precipitação de cloreto de cálcio, opaca, bastante visível, em torno da colônia atingindo o fundo da placa.

O valor da atividade fosfolipásica (Pz) foi obtido pela razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia acrescido da zona de precipitação (dcp) ou seja, $Pz = dc/dcp$.

Os resultados obtidos só foram registrados e considerados como definitivos, quando os valores dos diâmetros dos halos de precipitação apresentarem-se estabilizados.

As avaliações dos diâmetros dos halos foram obtidas através de medições com régua transparente, graduada em milímetros (Figura 23).

Os resultados foram classificados conforme a tabela I, abaixo.

Tabela I - Atividade de Protease e de Fosfolipase conforme o Pz e o código		
Pz	Atividade Enzimática	Código
= 1,0	Negativa	1
$\geq 0,64 < 1,0$	Positiva	2
$< 0,64$	Fortemente Positiva	3

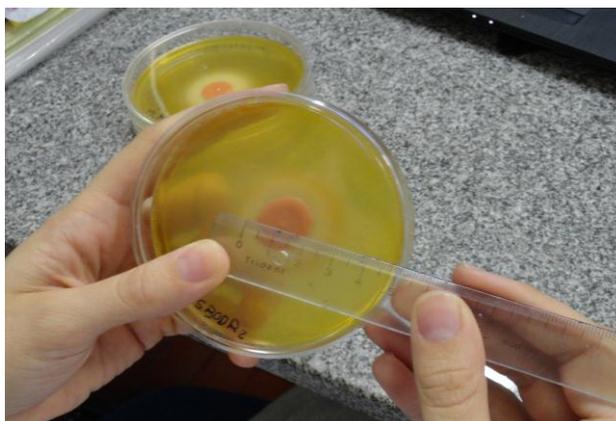


Figura 23- Mensuração do precipitado formado e da colônia de *Rhodotorula* spp.

4.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram colocados em planilha Excel e analisadas pelo X^2 (quiquadrado) e para permitir a análise estatística foi utilizado o programa Graph Test, 2005. Quando necessário utilizou-se o Fischer exato em parcelas menores que cinco e o teste de Tukey para a comparação das médias entre o crescimento micológico comparando “swab” e lavado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos Animais

Para o estudo foram utilizadas 40 cadelas não castradas (grupo I) e gestantes (grupo II), nas quais foram realizadas avaliações visando o isolamento fúngico que compreenderam exame citológico e determinação do pH da mucosa vaginal. Todos os dados relacionados aos dois grupos estudados foram obtidos nas entrevistas com os proprietários dos animais (Tabela 2).

Dentre os 20 animais pertencentes ao Grupo 1, observou-se que a maioria das cadelas tinha idade variando de 6 a 24 meses (55,0%). Os animais deste grupo pertenciam ao Projeto Castração e a alta frequência observada pode ser justificada pelo procedimento de castração, que geralmente ocorre quando as cadelas são mais jovens. Em relação ao grupo 2 a maior frequência foi no intervalo de 6 a 48 meses (90,0%), sendo que os intervalos de 6 a 24 meses e 25 a 48 meses apresentaram mesma frequência (45%), correspondendo ao período de maior atividade reprodutiva das fêmeas dessa espécie.

Com relação às raças estudadas, foi verificado que a maioria dos animais não apresentava raça definida (SRD) para ambos os grupos, com 85,0 % para o primeiro e 65,0 % para o segundo grupo. Levando-se em consideração que a maioria das cadelas utilizadas para este estudo pertenciam ao Projeto Castração, o qual é destinado para a população mais carente e animais abandonados, pode-se entender estes resultados, pois a maioria dos animais pertencentes à população mais carente são animais sem raça definida.

Quanto ao controle profilático de viroses e verminoses nota-se que o grupo I apresentou maior frequência para animais somente vermifugados (40,0%) e o grupo 2 para animais não vacinados e não vermifugados (60,0%). Estes dados demonstram que a maioria dos proprietários das fêmeas selecionadas não adotavam as medidas profiláticas adequadas.

Foi observado durante as coletas, o local de permanência dos animais. Verificou-se que a grande maioria era proveniente de domicílios particulares. Este dado se refere a ambos os grupos, sendo: Grupo 1 (90,0%) e Grupo 2 (80,0%). Isto deve-se provavelmente ao fato que cães pertencentes a canis são de proprietários com maior poder aquisitivo que, em consequência possuem menor necessidade de procura por serviços gratuitos.

Tabela 2 - Caracterização das 40 cadelas que foram submetidas a análise ginecológica

Variáveis	Grupo 1 Cadelas não Ovariectomizadas	%	Grupo 2 Cadelas gestantes	%
Faixa etária				
6 a 24 meses	11	55%	9	45,0%
25 a 48	3	15%	9	45,0%
49 a 72	5	25%	2	10,0%
>73	1	5%	0	0%
Raças				
S. R. D.	17	85%	13	65,0%
Raça definida	3	15%	7	35,0%

Cont. Tabela 2 - Caracterização das 40 cadelas que foram submetidas a análise ginecológica

Vacinação e Vermifugação				
Sim	7	35%	5	25,0%
Não	5	25%	12	60,0%
Somente vermifugados	8	40%	0	0%
Somente vacinados	0	0%	2	15,0%
Tipo de criação				
Canis	2	10%	4	20,0%
Domicílios particulares	18	90%	16	80,0%

Verificou-se a associação das variáveis de caracterização entre os animais dos grupos 1 e 2. Observando-se as diferenças de sigificância pelos testes do X², ou de Fisher quando recomendado. Das variáveis analisadas, apenas a do controle profilático de doenças infecciosas e parasitárias constatou sigificância ($p=0,1194$) entre os grupos 1 e 2.

5.2 Avaliação Fúngica Cérvico-vaginal

5.2.1 Isolamento e identificação fúngica

Das 40 cadelas utilizadas para coleta do material ginecológico, em 33 (82,5%) obteve-se o crescimento fúngico. Foram obtidos 60 isolados, sendo 21 (35,0%) identificados como *Candida* spp, 19 (31,66%) como *Malassezia* spp, 13 (21,66%) como *Rhodotorula* spp e 7 (11,66%) como *Trichosporon* spp. Dos 19 isolados obtidos do gênero *Malassezia*, todos foram identificados como *Malassezia pachydermatis*, e foi a levedura mais representativa em número de espécies (Figura 24).

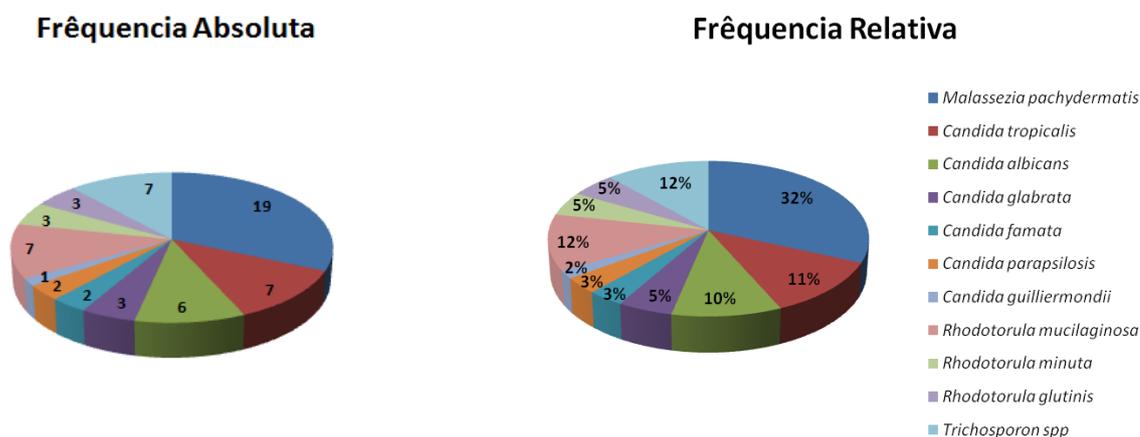


Figura 24 - Frequência absoluta e relativa dos isolados fúngicos.

Cleff et al. (2007) isolaram leveduras da secreção vaginal de cadelas e obtiveram *Candida* spp em um número maior de isolados, seguido de *Malassezia pachydermatis* e de *Rhodotorula* spp. Os nossos resultados, então, são concordantes com estes autores e discordam parcialmente de Stein et al. (2009) que observaram que das amostras positivas, *Malassezia pachydermatis* (50%) foi a levedura mais isolada, seguida de *Candida* spp

(21,5%), *Rhodotorula* spp + *Candida* spp (14,3%), *Trichosporon* spp (7,1%) e *Malassezia pachydermatis* + *Candida* spp (7,1%). Santos (2006) e Fraga et al. (2008) relataram a presença de leveduras na mucosa vaginal, porém as frequências encontradas por eles diferem dos achados do presente estudo.

Em relação às espécies de *Candida*, dos 21 isolados, 7 (33,33%) pertenciam a *C. tropicalis*, 6 (28,57%) a *C. albicans*, 3 (14,28%) a *C. glabrata*, 2 (9,52%) a *C. famata* e *C. parapsilosis* e 1 a *C. guilliermondii*. Dos 13 isolados de *Rhodotorula* spp, 7 (53,84%) pertenciam à espécie *R. mucilaginosa* e 3 (23,07%) à espécie *R. minuta* e *R. glutinis*. Para 5 cepas (38,46%) não foi possível a realização de identificação. Estes dados diferem parcialmente de outro estudo, realizado por Cleff et al. (2005) que isolaram *Candida* spp em 37% das amostras coletadas da microbiota vaginal de cadelas saudáveis. *Candida parapsilosis* foi a espécie mais isolada (21,7%) seguida de *Candida guilliermondii* (8,4%), *Candida kefir* (6%) e *Candida albicans* (4,8%). Não há relatos na literatura de identificação de *Rhodotorula* isoladas da microbiota vaginal de cadelas, em nível de espécie.

Com relação a *Candida* spp, considerando os nossos achados, verificou-se que embora não haja uma concordância absoluta em percentuais encontrados por outros autores, existe uma concordância com relação aos gênero. Desta forma, podemos inferir que leveduras do gênero *Candida* pertencem à microbiota cérvico-vaginal de cadelas hígdas. Por estarem presentes, em situações de queda da imunidade, em cães diabéticos, em animais sob corticoterapia ou em outras condições debilitantes, podem exacerbar seu crescimento e virem a se desenvolver em maiores taxas e promovendo candidíases. São poucos os relatos que mencionam o envolvimento de *Candida* spp no trato genital de cadelas, porém na maioria dos casos de distúrbios reprodutivos em animais de companhia, os possíveis agentes etiológicos, não são investigados.

Outro aspecto a ser considerado é que a presença exacerbada de *Candida* spp pode originar quadros de candidídes, quadro clínico também conhecido como candidíde. Neste caso, trata-se de uma reação do tipo erupção dérmica secundária à presença de *Candida* spp ocorrente sempre distante do local ou locais onde a levedura encontra-se presente, por hipersensibilidade a toxinas produzidas pela mesma. Existe hoje, na dermatologia veterinária, várias situações em que não se chega a um diagnóstico definitivo e que os animais sempre apresentam uma aparente recidiva no quadro clínico. Como estas lesões são estéreis, livres do micro-organismo, pode-se pensar nelas como uma possibilidade.

Malassezia pachydermatis é a espécie mais estudada em animais, e é considerada como parte da microbiota de vários sítios anatômicos de cães e gatos, sendo inclusive já relatada por alguns autores como parte da microbiota vaginal (CLEFF et al., 2007; STEIN et al., 2009). Embora *M. pachydermatis* apresente grande implicação em problemas dermatológicos em cães e inclusive quadros clínicos de otites, são poucos os relatos de seu crescimento no trato reprodutivo feminino de cães.

Leveduras como *Rhodotorula* spp e *Trichosporon* spp apesar de menor incidência na região estudada, não devem ser desconsideradas uma vez que podem ser possíveis patógenos sob diferentes condições, desde o momento que o animal apresente uma susceptibilidade no sistema imunológico.

Rhodotorula spp, por exemplo, é relatada como agente de dermatites em leões marinhos, frangos e gatos e também promovendo infecções pulmonares e otites em ovinos e no gado bovino. Este fungo anteriormente considerado não patogênico, é hoje considerado um emergente oportunista com habilidade de colonizar e infectar pacientes suscetíveis. Embora não existam estudos em animais, sabe-se que em humanos tem a capacidade de promover infecções na corrente sanguínea. Os fatores de risco incluem doenças malignas hematológicas ou não, pacientes que recebem fármacos corticoides e citotóxicos, uso de antibióticos de largo

espectro etc. Da mesma forma, acreditamos que esta levedura possa promover patologias em cães, a partir de um ponto em que passe a apresentar-se em grande quantidade. É sabido que toda a microbiota normal do trato reprodutivo pode eventualmente tornar-se patogênica e *Rhodotorula* é apenas um destes agentes, tendo sido, inclusive relacionada a casos de abortamentos e infertilidade, assim como também já foram implicados *Candida* e *Trichosporon* (AINSWORTH; AUSTWICK, 1973, VERMA et al., 1999). Portanto, devido aos relatos destas leveduras como causadoras de distúrbios em animais, o conhecimento de sua presença na região estudada fornece subsídios para compreendermos melhor situações de alterações nas mucosas do trato reprodutivo quando estas forem numéricas ou relativas à composição microbiana.

No grupo 1, obteve-se o isolamento fúngico em 16 (80,0%) das 20 cadelas, totalizando 22 isolados, enquanto que no grupo 2, o isolamento foi em 17 (85,0%) cadelas, totalizando 38 isolados.

As leveduras isoladas são as mesmas em ambos os grupos, porém se diferem em relação a sua frequência. No grupo 1 *Malassezia* spp teve maior frequência (54,54%), seguida de *Candida* spp (22,72%), *Rhodotorula* spp (18,18%) e *Trichosporon* spp (4,54%), já no grupo 2 a maior prevalência foi de *Candida* spp (42,10%), seguida de *Rhodotorula* spp (23,68%), *Malassezia* spp (18,42%) e *Trichosporon* spp (15,78%) (Figura 25).

Na literatura consultada foram poucos os estudos avaliando a microbiota cérvico-vaginal de cadelas gestantes. Cleff et al. (2005) correlacionaram amostras de secreção vaginal de 14 cadelas onde 2 eram gestantes. Das 224 amostras, 37% foram positivas para *Candida* em cadelas hígdas e 71,4% em cadelas gestantes. A baixa amostragem deste estudo não permite concluir que fungos estão normalmente presentes na cavidade vaginal de cadelas gestantes.

A frequência de *Candida* spp observada no grupo 2 pode ser justificada pelo fato de ser uma levedura oportunista, estando associada com a imunossupressão que ocorre no trato reprodutivo feminino no momento da implantação do feto e durante toda a gestação.

Por estímulo hormonal, várias modificações no trato genital inferior feminino ocorrem na gestação, tais como: hipertrofia das paredes vaginais, aumento do fluxo sanguíneo e da temperatura, bem como uma maior exposição do epitélio colunar do colo por causa da hiperplasia glandular, com formação da ectopia característica da gestação. Essas alterações fisiológicas, apesar de terem função protetora ao útero, à gravidez e ao organismo materno, podem tornar a gestante mais suscetível às infecções vaginais (TEDESCO et al, 2006).

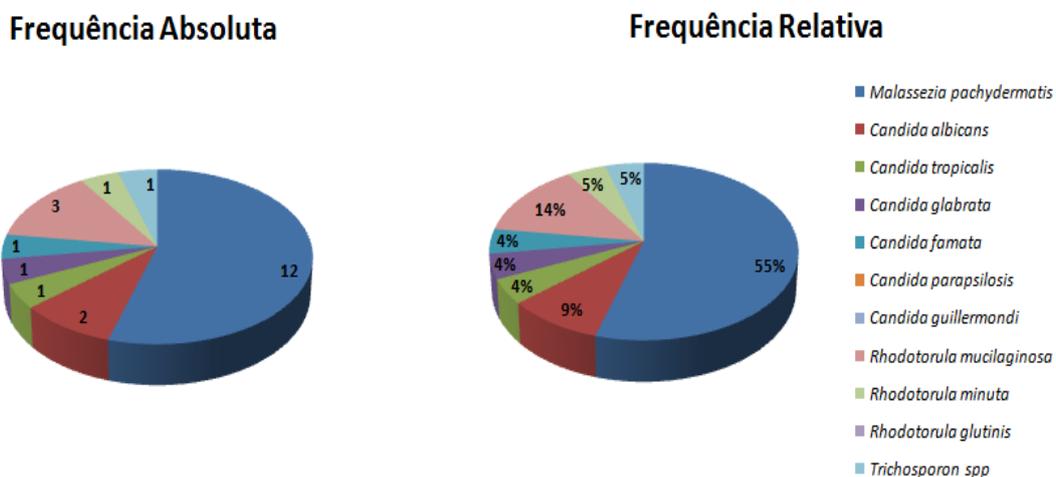
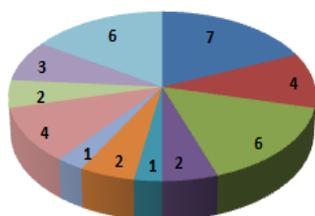


Figura 25 – Frequência absoluta e relativa dos isolados fúngicos do grupo 1.

Frequência Absoluta



Frequência Relativa

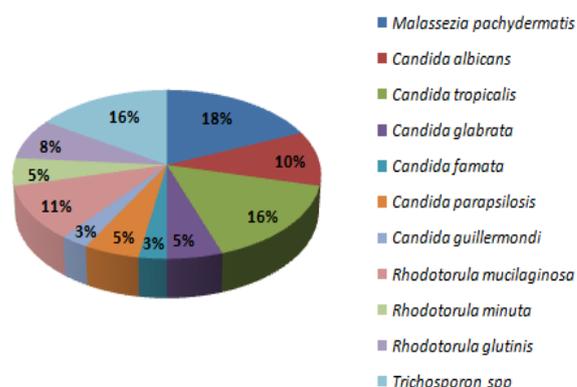


Figura 26 – Frequência absoluta e relativa dos isolados fúngicos do grupo 2

Um aspecto que deve ser considerado é a oscilação numérica com relação à presença de algumas leveduras quando compara-se com achados de outros autores e mesmo a ausência de isolamento de alguns, como é o caso de *Pichia* spp. Pode-se considerar a possibilidade de inibição de alguns micro-organismos face a presença de outros que produzam toxinas. Um dos fenômenos que levam-nos a estes casos é a presença das chamadas toxinas “killer” produzidas por algumas leveduras e que atuam nas membranas celulares de outras leveduras, promovendo a diminuição da integridade pela formação de canais permeáveis e levando à morte celular. Neste nosso experimento, por exemplo, não houve o isolamento de *Pichia* spp, sendo que algumas espécies desta levedura apresentam efeito deletério sobre *Malassezia pachydermatis*. Sendo assim, vale especular que se tivéssemos isolado *Pichia* spp, talvez não tivéssemos isolado a levedura *Malassezia pachydermatis* ou isto ocorresse em número reduzido.

Verificou-se a correlação das variáveis referentes aos animais caracterizados com o isolamento fúngico, e as diferenças de significância foram realizadas pelo teste do Qui-Quadrado. Foram utilizadas as variáveis, faixa etária, raça, tipo de criação, e controle profilático de doenças infecciosas e parasitoses, porém estas não tiveram significância quando foram comparadas com as leveduras encontradas.

5.2.2 Correlação do “swab” e do lavado cérvico-vaginal com o crescimento fúngico

Para a coleta do material ginecológico foram utilizados dois métodos distintos para cada animal, o lavado cérvico-vaginal e o “swab”.

Foram obtidos pelo “swab” um total de 31 isolados enquanto que pelo lavado foram obtidos 46 isolados.

Em relação a contagem de células viáveis, das 40 coletas realizadas com o “swab”, obteve-se uma média de aproximadamente $2,86 \pm 01$ UFC por placa estriada para o grupo 1, enquanto que para o grupo 2 a média foi de aproximadamente $17,79 \pm 01$ UFC. Na coleta realizada com o lavado, a média para o grupo 1 foi de aproximadamente de $24,10 \pm 01$ UFC e de $981,22 \pm 01$ UFC para o grupo 2.

Para a associação da quantificação das leveduras com os dois diferentes métodos de coleta foi utilizado o teste t (Tukey). Não foi observada diferença significativa para o grupo 1 ($p=0,4221$), enquanto que para o grupo 2 constatou-se significância, quando comparada a técnica do “swab” com o lavado.

Segundo Kristensen et al. (1989), o material recuperado com swab de algodão é de baixa qualidade no que diz respeito a quantidade e preservação do material quando comparado aos outros métodos de coleta.

A técnica de lavado cérvico-vaginal obtém amostras de micro-organismos de uma maior área de superfície da vagina e fornece elevada representatividade deste conteúdo, opostamente ao “swab”. O “swab” possivelmente absorve limitadamente o líquido presente na mucosa em conjunto com micro-organismos. Ao utilizar-se lavado, o líquido pode ser infundido e abranger uma maior área e, com isso, captar um número maior de micro-organismos. Portanto, o lavado cérvico-vaginal demonstrou ser um método de maior qualidade no que diz respeito ao isolamento e a quantificação de leveduras.

5.2.3 Correlação do pH vaginal com o crescimento fúngico

O aumento da acidez vaginal é influenciado por diversos fatores, favorecendo o estabelecimento de leveduras na mucosa vaginal. Logo, pretendeu-se verificar se os valores de pH da mucosa vaginal das cadelas também influenciavam o crescimento fúngico.

O pH da mucosa vaginal das cadelas pertencentes ao grupo 1 apresentou uma média de 6,49, enquanto que no grupo 2 observou-se uma média de 6,93. Em ambos os grupos o pH se manteve relativamente próximo do neutro. Fraga et al. (2008) isolaram Lactobacilos em cadelas, onde o pH vaginal se manteve em uma faixa de 6 a 7,5, e Delucchi et al. (2008) também em cadelas, verificaram a mesma faixa de pH, estando de acordo com o encontrado no presente trabalho.

Candida spp e *Rhodotorula* spp apresentaram melhor crescimento em faixa de pH 6,78, *Malassezia pachydermatis* em pH 6,87, e *Trichosporon* spp em pH 6,83. Observou-se pouca variação do pH nas espécies fúngicas encontradas, portanto não houve diferença significativa.

Em estudo realizado por Matousek et al. (2003), demonstraram que *M. pachydermatis* teve ótimo crescimento entre os valores de pH 4,0 e 8,0, e inibida em pH de 1,0 a 3,0 e 9,0 a 10,0. Em relação as espécies de *Candida*, observa-se um melhor crescimento em pH ácido entre 3,9 e 5,0 (MONIF-GRG, 1985).

Wang et al. (2007) observaram o pH ideal para o crescimento de algumas leveduras de ambiente marinho, dentre elas, *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou uma faixa de pH 6 ideal para crescimento.

Portanto, a maioria dos fungos cresce bem quando o pH inicial é ajustado na faixa de 4 a 7 apresentando pouco efeito no crescimento dentro desta faixa (GRIFFIN, 1994). E neste estudo, observou-se um maior crescimento de *Malassezia pachydermatis* e *Candida* spp. Entretanto, as leveduras do gênero *Candida* e principalmente *Candida albicans* são consideradas exemplo de adaptação em estados fisiológicos extremos, podendo estar presentes em diversos sítios anatômicos (DIGNAMI et al., 2003).

5.3 Contagem Total das Leveduras

Foi realizada a quantificação das amostras coletadas pelo lavado cérvico-vaginal. Na contagem de células viáveis, das 38 amostras detectou-se média de aproximadamente 474,05 ± 01 unidades formadoras de colônias (UFC) por ml da amostra (Tabela 3).

As médias das UFC entre os grupos apresentaram uma diferença significativa. Para o primeiro grupo a média foi de aproximadamente 24,10 ± 01 e para o segundo de 981,22 ± 01.

Tabela 3 - Número de unidades formadoras de colônias nos grupos 1 e 2.

Cadelas	Grupo 1 (Não castradas) UFC/mL	Cadelas	Grupo 2 (Castradas) UFC/mL
ML13	225,5	ML10	∞
ML15	∞	ML14	17.000
ML16	10	ML20	∞
ML17	∞	ML21	4
ML18	17,33	ML24	27
ML19	49	ML28	41,6
ML22	10,6	ML37	12
ML23	1	ML38	16
ML25	12	ML39	201,3
ML27	2	ML40	12,6
ML29	∞	ML41	130
ML30	42,66	ML42	13
ML31	∞	ML44	41
ML32	∞	ML47	∞
ML33	2	ML48	103,3
ML35	67,33	ML50	380.000
ML43	10	ML51	5,3
ML45	∞	ML52	5,3
ML46	∞	ML53	38
ML49	31,66	ML54	11,3
Média	24,10	Média	981,22

Em apenas duas amostras, foram observadas o crescimento exacerbado de leveduras havendo a necessidade de se realizar a diluição seriada para a contagem das UFC. Essas duas amostras foram oriundas de cadelas gestantes. Portanto para a realização da média de UFC do grupo 2 foi retirado duas amostras para o cálculo, e de menor e a de maior valor.

O grupo 2 teve um maior número de UFC em relação ao grupo 1, devido ao fato de serem cadelas gestantes, ou seja, durante a gestação ocorrem varias mudanças fisiológicas, modificações essas que afetam todo o organismo modificando seu metabolismo. A placenta é fonte de muitos fatores imunossupressivos; além dos hormônios estradiol e progesterona, algumas proteínas do soro fetal são imunorreguladoras, como isoformas da fetoproteína- α , e também da placenta, como macroglobulina- α e interferon placentário. O líquido amniótico, por sua vez, é rico em fosfolipídeos imunossupressivos (TIZARD, 1998).

Das duas amostras em que houve o crescimento exacerbado, pelo histórico das cadelas verificou-se que uma delas não fazia o uso de medicações no período da coleta, entretanto, possui alterações dermatológicas, e diversas vezes fez o uso de corticoesteróides. A outra cadela teve o histórico relatado pelo proprietário, que há alguns meses atrás teve Doença do Carrapato e que fez o uso de doxiciclina por 28 dias seguidos.

Portanto, a imunossupressão é uma característica do final da gestação, e além disso, os animais podem apresentar deficiências menores na reatividade imune, mediada por células contra antígenos não fetais. Isso é notório em animais parasitados, nos quais a resposta imune pode não controlar o parasita, como nas cadelas com ácaros do gênero *Demodex*, cujas populações se elevam e eles, então, podem ser transmitidos aos filhotes (TIZARD, 1998)

5.4 Avaliação Fúngica Uterina

Foi realizada avaliação da microbiota fúngica no útero de 5 cadelas, cedidos pelo Projeto Castração da UFRRJ, e pertencentes ao grupo 1. Dos cinco lavados uterinos, houve crescimento em 2 (40,0%), e os 2 isolados obtidos foram identificados como *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Na contagem viável de células, *C. tropicalis* apresentou um crescimento exacerbado enquanto que *Candida glabrata* apresentou média de 9,33 UFC por ml do lavado (Tabela 4).

A produção enzimática de protease e fosfolipase, foi negativa por *Candida tropicalis* e positiva pra protease e negativa para fosfolipase por *Candida glabrata*.

Observou-se que não houve associação da microbiota uterina com a cérvico-vaginal, e o poder de virulência das leveduras presentes no útero foi baixo, uma vez que apenas a protease se mostrou positiva em uma das cepas, e seu valor de Pz foi de 0,87. Entretanto, devido a baixa amostragem uterina, não podemos concluir o real poder de virulência destas leveduras.

Tabela 4 – Identificação, quantificação, atividade enzimática e correlação da mucosa uterina e cérvico-vaginal

Espécies fúngicas isoladas do útero	Espécies fúngicas isoladas da cérvix e vagina	UFC/ml do lavado uterino	Atividade protease	Atividade fosfolipase
<i>C. tropicalis</i>	<i>M. pachydermatis</i>	270.000	Negativa	Negativa
Sem crescimento	<i>M. pachydermatis</i>			
Sem crescimento	<i>M. pachydermatis</i>			
<i>C. glabrata</i>	<i>R. mucilaginoso/ R. minuta</i>	9,33	Positiva	Negativa
Sem crescimento	Sem crescimento			

5.5 Avaliação dos Fatores de Virulência

Os efeitos das enzimas fosfolipase e protease são importantes fatores a serem avaliados, pois promovem a degradação dos componentes da membrana celular, o que facilita a adesão do fungo à parede vaginal, permitindo a invasão tecidual (LACAZ et al., 2002).

5.5.1 Protease

Das 60 cepas testadas para produção de protease 22 (36,66%) foram negativas, 20 (33,33%) positivas e 18 (30,0%) forte positivas, ou seja 38 (63,33%) das amostras são produtoras de protease, com índices de Pz variando de 0,52 a 0,92 (Figura 27).



Figura 27 – Percentual da atividade proteolítica dos isolados fúngicos.

O gênero *Candida* foi o mais representativo para a produção de protease, pois das 21 cepas avaliadas, 10 (47,61%) eram forte positivas, 6 (28,57%) positivas e 5 (23,80%) negativas. Na sequência, 15 (78,94%) das 19 cepas de *Malassezia pachydermatis* foram produtoras de protease, sendo 5 (26,31%) forte positivas. Para o gênero *Rhodotorula*, das 13 cepas analisadas 2 (15,38%) eram forte positivas e 3 (23,07%) foram positivas. Menos representativo foi o gênero *Trichosporon* com apenas 2 (28,57%) produtoras das 7 cepas testadas, sendo 1 (14,28%) forte positiva (Figura 28). A atividade proteolítica dos isolados fúngicos esta disposta conforme a tabela 5.

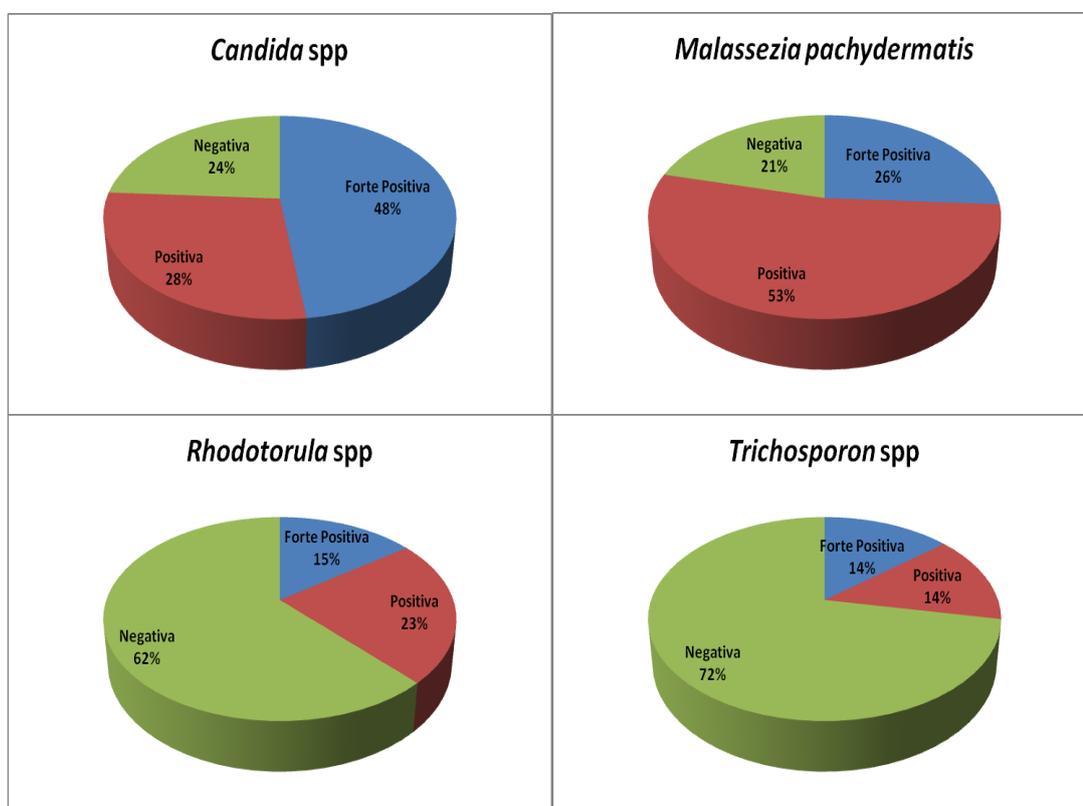


Figura 28 – Percentual da atividade proteolítica em *Candida spp*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula spp* e *Trichosporon spp*.

Tabela 5 – Atividade enzimática – protease

Código	Identificação	PZ	Código	Atividade Enzimática
ML1313BOD	<i>C.albicans</i>	0,59	3	Forte Positiva
ML131337	<i>C. tropicalis</i>	0,86	2	Positiva
ML1313R	<i>R. mucilaginosa</i>	1	1	Negativa
ML1413C	<i>C. albicans</i>	0,62	3	Forte Positiva
ML1514M	<i>M. pachydermatis</i>	0,58	3	Forte Positiva
ML1614R	<i>R. mucilaginosa</i>	1	1	Negativa
ML16 14M	<i>M. pachydermatis</i>	0,66	2	Positiva
ML1714M	<i>M. pachydermatis</i>	0.8	2	Positiva
ML1814M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML1914M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML2114T	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML2114M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML2214T	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML2314SBODR	<i>R. mucilaginosa</i>	1	1	Negativa
ML2314BODR	<i>R. minuta</i>	0,81	2	Positiva
ML2414M	<i>M. pachydermatis</i>	0,73	2	Positiva
ML25143M	<i>M. pachydermatis</i>	0,827	2	Positiva
ML2714M	<i>M. pachydermatis</i>	0,92	2	Positiva
ML2814R	<i>R. minuta</i>	1	1	Negativa
ML281432C	<i>C. glabrata</i>	0,55	3	Forte Positiva
ML281437C	<i>C. tropicalis</i>	0,66	2	Positiva
ML2814T	<i>Trichosporon spp</i>	0,88	2	Positiva
ML2814BODT	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML2914S32M	<i>M. pachydermatis</i>	0,66	2	Positiva
ML3014M	<i>M. pachydermatis</i>	0,59	3	Forte Positiva
ML3314M	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	2	Positiva
ML3514M	<i>M. pachydermatis</i>	0,79	2	Positiva
ML3514C	<i>C. famata</i>	1	1	Negativa
ML3714M	<i>M. pachydermatis</i>	0,58	3	Forte Positiva
ML3814R1	<i>R. mucilaginosa</i>	1	2	Negativa
ML3814C	<i>C. guilliermondii</i>	0,61	3	Forte Positiva
ML391437C	<i>Candida tropicalis</i>	1	1	Negativa
ML391437T	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML3914R1	<i>R. glutinis</i>	1	1	Negativa
ML3914R2	<i>R. mucilaginosa</i>	0,86	2	Positiva
ML4014R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,73	2	Positiva
ML4014C	<i>Candida albicans</i>	0,52	2	Positiva
ML4014SBOD1	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML411432C	<i>C. albicans</i>	0,62	3	Forte Positiva
ML411432M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML4214S37C	<i>Candida tropicalis</i>	0,60	3	Forte Positiva
ML4214T	<i>Trichosporon spp</i>	0,54	3	Forte Positiva
ML4315M	<i>M. pachydermatis</i>	0,5	3	Forte Positiva
ML4415C	<i>C. parapsilosis</i>	0,61	3	Forte Positiva
ML4415M	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	3	Forte Positiva

Cont. Tabela 5 – Atividade enzimática – protease

ML4815C	<i>Candida tropicalis</i>	0,59	3	Forte Positiva
ML4915C	<i>Candida albicans</i>	0,7mm	2	Positiva
ML4915C2	<i>Candida glabrata</i>	1	1	Negativa
ML5015R1	<i>R. glutinis</i>	0,59	3	Forte Positiva
ML5015R2	<i>R. minuta</i>	0,42	3	Forte Positiva
ML5015C1	<i>C. albicans</i>	0,65	2	Positiva
ML5015C2	<i>C. famata</i>	1	1	Negativa
ML5015C3	<i>Candida tropicalis</i>	0,92	2	Positiva
ML5115M	<i>M. pachydermatis</i>	0,80	2	Positiva
ML5215C	<i>C. parapsilosis</i>	0,59	3	Forte Positiva
ML5215R	<i>R. glutinis</i>	0,59	1	Negativa
ML5315M	<i>M. pachydermatis</i>	0,89	2	Positiva
ML5315C	<i>Candida tropicalis</i>	0,58	3	Forte Positiva
ML5415C	<i>C. glabrata</i>	1	1	Negativa
ML5415R	<i>R. mucilaginosa</i>	1	1	Negativa

As proteases são consideradas também um importante fator de virulência fúngico, uma vez que podem auxiliar o fungo na invasão tecidual e disseminação dentro do hospedeiro (KUMAR et al., 2006). Diversos estudos têm relatado a forte correlação entre a secreção de protease e o grau de virulência das cepas (CORRÊA et al., 2009; BONA et al., 2012; KALKANCI et al., 2012).

Coutinho e Paula (2000) avaliaram a produção de quatro tipos enzimáticos de diferentes sítios anatômicos de cães com afecções, e das 30 cepas avaliadas todas foram produtoras de protease, com média para Pz de 0,30.

Em outro estudo realizado por Coutinho (2005), pesquisou-se possível relação entre produção de enzima e patogenicidade. Avaliou 30 cepas oriundas de cães com (15) e sem afecções (15), e verificou alta produção da enzima protease, não havendo diferença entre os grupos.

A produção de protease por leveduras oriundas de cães com e sem afecções também foi avaliada por Bona et al. (2012), não sendo observada a produção desta enzima em cães saudáveis, enquanto que em cães com afecções a enzima foi produtora em 12 (31%) amostras.

Devido ao não estabelecimento total do papel exercido pelas proteinases “*in vivo*” existe um questionamento sobre a ação desta enzima como um fator de virulência, e frente a estes resultados, alguns autores (LIMA et al., 2004; COUTINHO, 2005; MOREIRA, 2012), não observaram diferença significativa entre os grupos sintomáticos e assintomáticos, concluindo que possivelmente existam outros fatores que contribuam para a agressão do hospedeiro, enquanto que outros autores detectaram este tipo enzimático e comprovaram a alta patogenicidade dessas espécies, especialmente nas de origem do grupo sintomático (BERNADIS et al., 1990; BONA et al., 2012; KALKANCI et al., 2012).

Neste estudo, em relação aos grupos, não houve diferença significativa para produção de protease. Das cepas avaliadas foram produtoras, 13 de 22 (59,09%) do grupo 1 e 24 de 38 (63,15%) do grupo 2.

Ortiz et al (2013) avaliaram a atividade da fosfolipase e protease de leveduras isoladas de cães sadios e com afecções e verificaram que das 95 cepas avaliadas para produção de protease 93 (97,89%) apresentaram atividade em pH 6,8 e 77 (81,05%) em pH 6,3, com diferentes valores de Pz.

No presente trabalho, foram detectadas médias de pH para o grupo 1 e 2, de 6,82 e 6,93 respectivamente. Apesar de não ser observada diferença significativa de pH entre os grupos, verificou-se melhor atividade da protease em menor pH, uma vez que o grupo 1 apresentou maior atividade desta enzima em relação ao grupo 2. Entretanto, fungos podem produzir proteases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas numa ampla faixa de pH de 4,0 a 11,0 e atuam em ampla variedade de substrato (ALEKSIEVA; PEEVA, 2000). Ganesh Kumar et al. (2008) relataram ótima taxa de pH entre 5,5 – 6,5 para produção de protease ácida.

Neste trabalho, foi verificada a presença de cepas com capacidade de produção de protease (Figura 29) e, portanto com relativo potencial patogênico em mucosa cérvico-vaginal de cadelas híginas. Entretanto, em cadelas não castradas o número de unidades formadoras de colônias presentes na cavidade vaginal foi relativamente baixo, justificando a sua presença em cadelas não portadoras de afecções. Além disso, devemos lembrar que para que determinado patógeno possua virulência deve-se levar em consideração o estado imunológico, bem como outros fatores de virulência.

Em cadelas gestantes o número de UFC também foi relativamente baixo, com exceção de duas amostras, as quais apresentaram um crescimento exarcebado, porém não foi detectada a produção desta enzima nestas amostras.

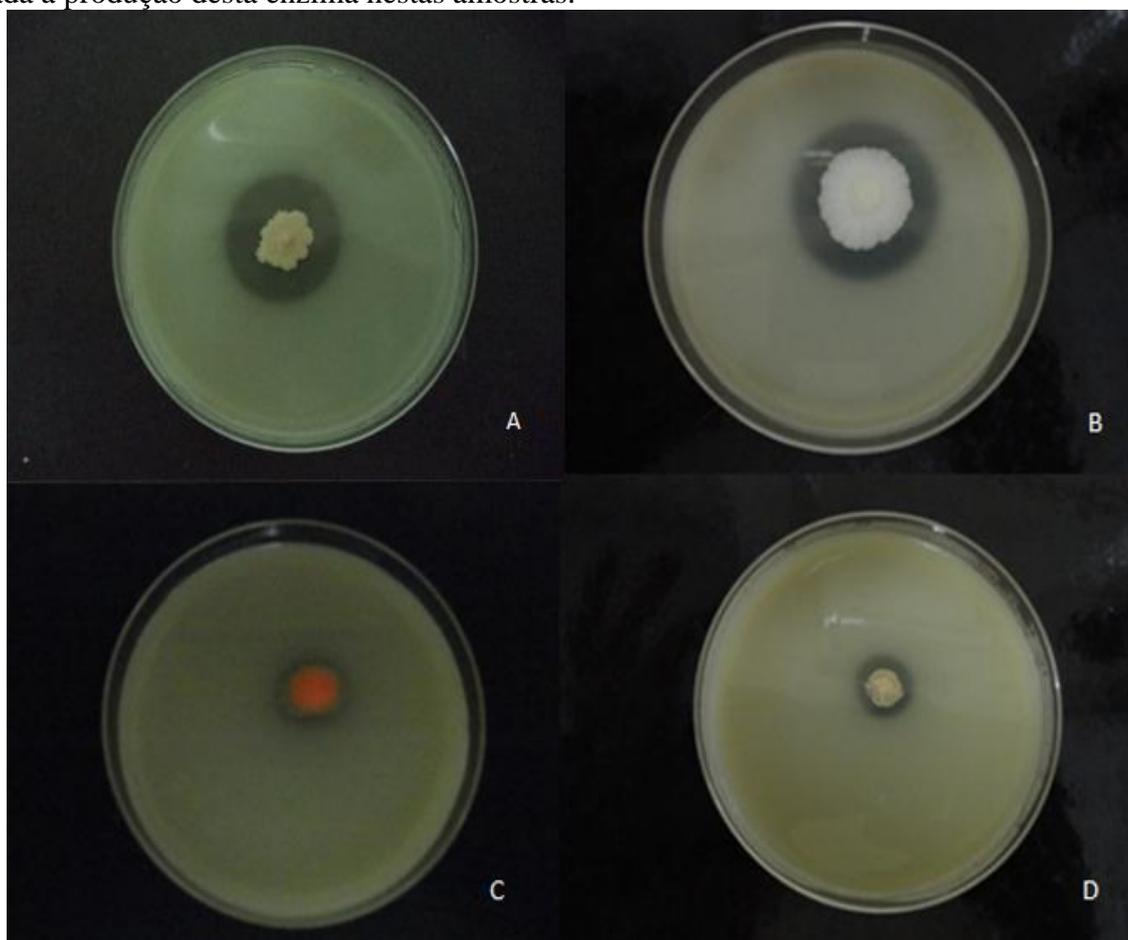


Figura 29 – Produção de protease em *Candida* spp (A e B), *Rhodotorula* spp (C) e *Malassezia* spp (D).

5.5.2 Fosfolipase

Dos 60 isolados testados para produção de fosfolipase 28 (46,66%) foram negativas, 22 (36,66%) forte positivas e 10 (16,66%) positivas, ou seja, 32 (53,33%) amostras são produtoras de fosfolipase, com índices de Pz variando de 0,22 a 0,937 (Figura 30).



Figura 30 – Percentual da atividade fosfolipásica dos isolados fúngicos.

O gênero *Rhodotorula* foi o mais representativo para a produção de fosfolipase, pois das 13 cepas testadas todas foram produtoras de fosfolipase, e 12 (92,30%) apresentaram-se como forte positivas. O gênero *Malassezia* apresentou positividade em 9 (47,36%) das 19 cepas, sendo 8 (42,10%) forte positivas. Na sequência, o gênero *Trichosporon* produziu a fosfolipase em 3 (42,85%) das 7 cepas avaliadas, sendo 2 (28,57%) forte positivas, e a menos representativa foi a *Candida* spp que apenas 7 (33,33%) cepas foram positivas (Figura 31). A atividade fosfolipásica está disposta conforme a tabela 6.

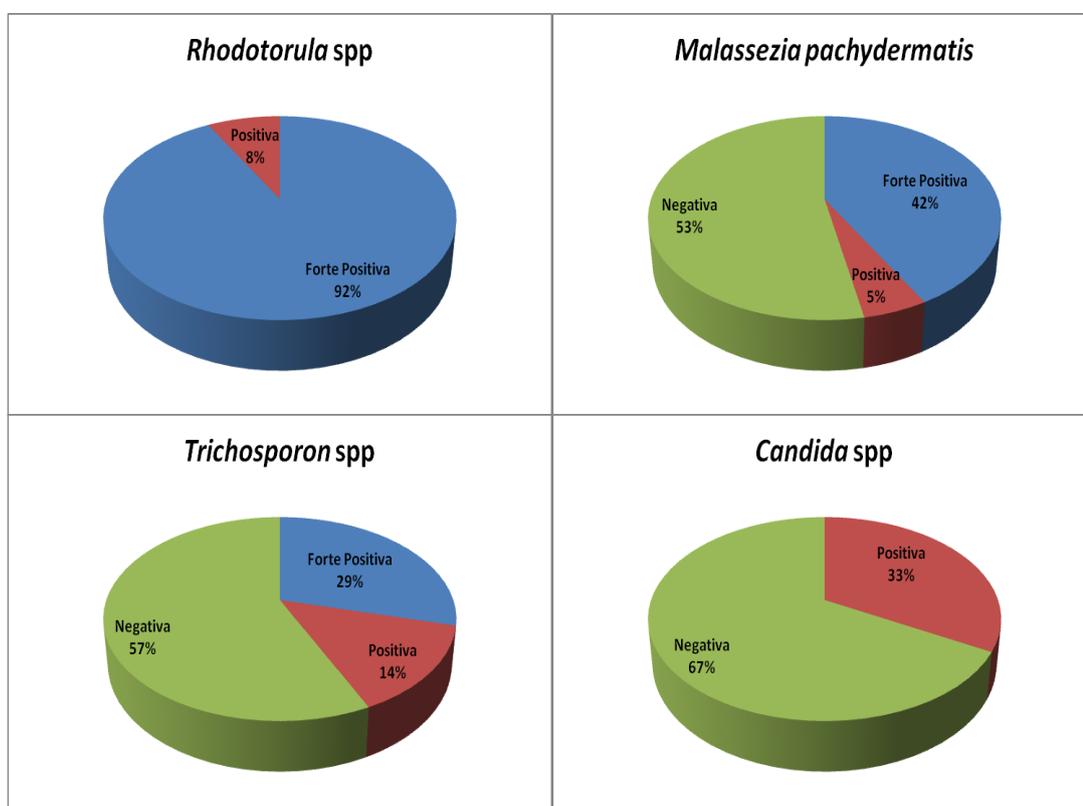


Figura 31 – Percentual da atividade fosfolipásica de *Rhodotorula* spp, *Malassezia pachydermatis*, *Trichosporon* spp, *Candida* spp.

Tabela 6 – Atividade enzimática – fosfolipase

Código	Identificação	PZ	Código	Atividade Enzimática
ML1313BOD	<i>C.albicans</i>	1	1	Negativa
ML131337	<i>C. tropicalis</i>	0,93	2	Positiva
ML1313R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,22	3	Forte Positiva
ML1413C	<i>C. albicans</i>	0,86	2	Positiva
ML1514M	<i>M. pachydermatis</i>	0,56	3	Forte Positiva
ML1614R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,25	3	Forte Positiva
ML16 14M	<i>M. pachydermatis</i>	0,33	3	Forte Positiva
ML1714M	<i>M. pachydermatis</i>	0,34	3	Forte Positiva
ML1814M	<i>M. pachydermatis</i>	0,87	2	Positiva
ML1914M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML2114T	<i>Trichosporon spp</i>	0,86	2	Positiva
ML2114M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML2214T	<i>Trichosporon spp</i>	0,43	3	Forte Positiva
ML2314SBODR	<i>R. mucilaginosa</i>	0,44	3	Forte Positiva
ML2314BODR	<i>R. minuta</i>	0,28	3	Forte Positiva
ML2414M	<i>M. pachydermatis</i>	0,37	3	Forte Positiva
ML25143M	<i>M. pachydermatis</i>	0,54	3	Forte Positiva
ML2714M	<i>M. pachydermatis</i>	0,45	3	Forte Positiva
ML2814R	<i>R. minuta</i>	0,27	3	Forte Positiva
ML281432C	<i>C. glabrata</i>	1	1	Negativa
ML281437C	<i>C. tropicalis</i>	1	1	Negativa
ML2814T	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML2814BODT	<i>Trichosporon spp</i>	0,38	3	Forte Positiva
ML2914S32M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML3014M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML3314M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML3514M	<i>M. pachydermatis</i>	0,61	3	Forte Positiva
ML3514C	<i>C. famata</i>	1	1	Negativa
ML3714M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML3814R1	<i>R. mucilaginosa</i>	0,43	3	Forte Positiva
ML3814C	<i>C. guilliermondii</i>	1	1	Negativa
ML391437C	<i>Candida tropicalis</i>	1	1	Negativa
ML391437T	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML3914R1	<i>R. glutinis</i>	0,35	3	Forte Positiva
ML3914R2	<i>R. mucilaginosa</i>	0,52	3	Forte Positiva
ML4014R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,33	3	Forte Positiva
ML4014C	<i>Candida albicans</i>	1	1	Negativa
ML4014SBOD1	<i>Trichosporon spp</i>	1,7	1	Negativa
ML411432C	<i>C. albicans</i>	0,937	2	Positiva
ML411432M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML4214S37C	<i>Candida tropicalis</i>	1	1	Negativa
ML4214T	<i>Trichosporon spp</i>	1	1	Negativa
ML4315M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML4415C	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	Negativa
ML4415M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa

Cont. Tabela 6 – Atividade enzimática – fosfolipase

ML4815C	<i>Candida tropicalis</i>	0,87	2	Positiva
ML4915C	<i>Candida albicans</i>	0,75	2	Positiva
ML4915C2	<i>Candida glabrata</i>	1	1	Negativa
ML5015R1	<i>R.glutinis</i>	0,35	3	Forte positiva
ML5015R2	<i>R. minuta</i>	0,76	2	Positiva
ML5015C1	<i>C. albicans</i>	1	1	Negativa
ML5015C2	<i>C. famata</i>	1	1	Negativa
ML5015C3	<i>Candida tropicalis</i>	0,91	2	Positiva
ML5115M	<i>M. pachydermatis</i>	1	1	Negativa
ML5215C	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	Negativa
ML5215R	<i>R.glutinis</i>	0,40	3	Forte positiva
ML5315M	<i>M. pachydermatis</i>	0,45	3	Forte positiva
ML5315C	<i>Candida tropicalis</i>	0,77	2	Positiva
ML5415C	<i>C. glabrata</i>	1	1	Negativa
ML5415R	<i>R. mucilaginosa</i>	0,53	3	Forte positiva

A fosfolipase é considerada como fator importante para o processo de infecção, variando conforme a amostra e há a dependencia de outros fatores de virulência e do próprio hospedeiro.

Carfachia e Otranto (2004) avaliaram a atividade da fosfolipase em diferentes sítios anatômicos de cães, e verificaram que cepas oriundas de animais com afecções apresentaram uma maior atividade fosfolipásica (93,9%) quando comparado com cepas de cães saudáveis (10,6%).

Em estudo realizado por Machado et al. (2010) foi verificado que o número de *M. pachydermatis* isolados que produziram fosfolipase foi estatisticamente maior para cães doentes do que para as estirpes encontradas em animais saudáveis.

A produção de fosfolipase foi detectada em cepas de *Candida tropicalis* por Cordeiro et al. (2014) isoladas de diversos animais saudáveis e na maioria dos isolados foi verificado que apenas alguns deles foram produtores para fosfolipase (6/64).

Brilhante et al. (2014) isolaram 28 cepas de *Candida parapsilosis* de animais clinicamente saudáveis, e avaliaram a capacidade de produção enzimática, dentre elas a fosfolipase, que não foi produtora em nenhuma das cepas. Estes dados estão de acordo com o do presente trabalho, o qual foram isoladas duas cepas de *Candida parapsilosis* e ambas foram negativas para produção de fosfolipase.

No presente estudo foi verificado que das cepas isoladas 53,33% foram produtoras para fosfolipase (Figura 32), ou seja, observou-se uma maior atividade desta enzima quando comparadas com outros resultados relativos a animais saudáveis.

Neste estudo, em relação aos grupos, houve diferença significativa para produção de fosfolipase. Das cepas avaliadas foram produtoras, 15 de 22 (68,18%) do grupo 1 e 17 de 38 (44,73%) do grupo 2.

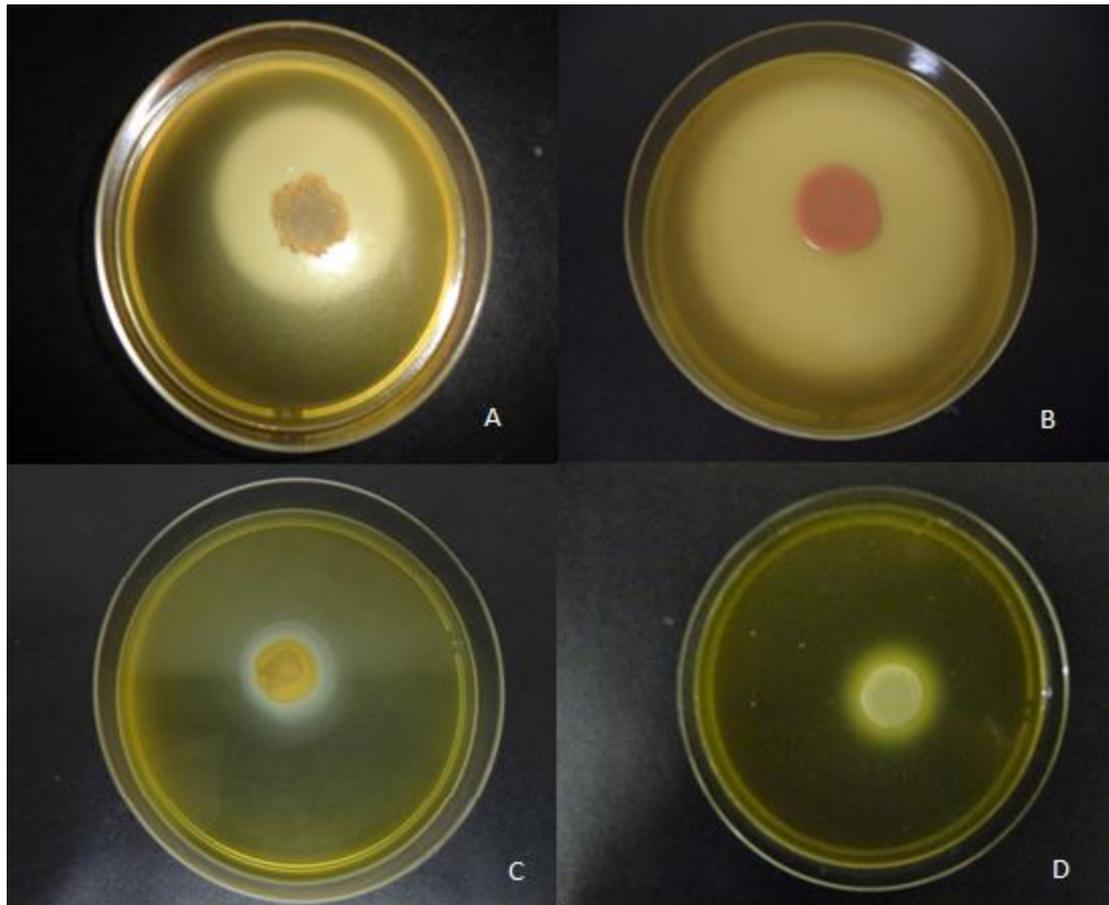


Figura 32 - Produção de fosfolipase em *Trichosporon* spp (A), em *Rhodotorula mucilaginosa*(B), *Malassezia pachydermatis* (C), *Cryptococcus* spp (controle positivo) (D).

Anteriormente, *Rhodotorula* era considerada como não patogênica e recentemente ela tem emergido como patógeno oportunista com a habilidade de colonizar e infectar pacientes suscetíveis. Diversos autores têm relatado a capacidade de patogenicidade de *Rhodotorula* spp, principalmente em pacientes imunocomprometidos (GOYAL et al., 2008; DA CUNHA et al., 2009). Neste estudo o gênero *Rhodotorula* se destacou para a produção da enzima fosfolipase e, portanto, estas leveduras não devem ser desconsideradas, uma vez que a sua presença foi detectada na mucosa cérvico-vaginal de cadelas, além de a grande maioria das cepas serem fortes produtoras para este tipo enzimático (Figura 33).

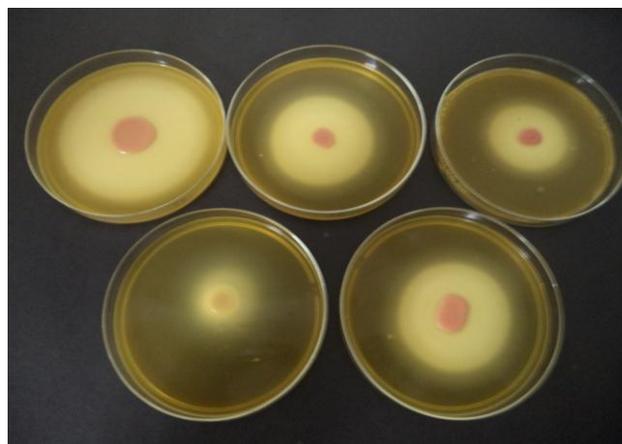


Figura 33 - Produção de fosfolipase em diferentes cepas de *Rhodotorula* spp.

5.5.3 Correlação da protease e fosfolipase

Os fatores de virulência devem ser analisados em conjunto. A produção de protease e de fosfolipase determinadas para estes isolados é apenas um passo na determinação da virulência das mesmas. É necessário lembrar que a virulência depende de muitos fatores. Logo, os atributos que contribuem para virulência destas leveduras incluem adesão, formação de hifas, dimorfismo entre outras, incluindo a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares.

Das 60 cepas avaliadas 20 (33,33%) foram produtoras tanto para protease quanto para fosfolipase, 14 (23,33%) produtoras apenas para protease, 17 (28,33%) apenas para fosfolipase e 9 (15,0%) negativa para as duas (Tabela 7).

Não foi observada diferença significativa entre as cepas produtoras e não produtoras de fosfolipase ($p=0,2235$), assim como as de protease ($p=0,7549$).

Em relação, a associação das leveduras isoladas com a produção de fosfolipase observou-se diferença significativa apenas para *Candida* spp ($p=0,0016$). Houve maior frequência de cepas não produtoras de fosfolipase em leveduras do gênero *Candida*. Para protease também verificou-se diferença significativa apenas em *Candida* spp ($p=0,0141$), entretanto houve maior frequência de cepas produtoras de protease.

Candida albicans é citada por diversos autores como uma das maiores produtoras de fosfolipase e protease (D'ÉÇA JUNIOR et al., 2011; BRANCO et al., 2012; SACHIN et al., 2012). E neste trabalho, para produção de fosfolipase, foram positivas 57,14% para *C. tropicalis*, 50% para *Candida albicans*, e todas as cepas de *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* foram negativas. Para produção de protease, todas foram produtoras em *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, 85,71% em *C. tropicalis*, 33,33% em *C. glabrata* e nenhuma em *C. famata*.

O presente trabalho comprova o fato que, não apenas *Candida albicans* como também, *Candida* não *albicans*, aparecem com algum grau de importância neste cenário, uma vez que verificamos quatro amostras de *C. tropicalis* fortemente positivas para produção de protease e uma delas positiva para fosfolipase, e duas amostras de *C. parapsilosis*, uma de *C. glabrata* e uma de *C. guilliermondi* fortemente positivas para protease.

Apenas duas amostras foram fortemente positivas para o dois tipos enzimáticos, *Malassezia pachydermatis* e *Rhodotorula glutinis*.

Código	Identificação	Atividade Protease	Atividade Fosfolipase
ML1313BOD	<i>C.albicans</i>	Forte Positiva	Negativa
ML131337	<i>C. tropicalis</i>	Positiva	Positiva
ML1313R	<i>R. mucilaginosa</i>	Negativa	Forte Positiva
ML1413C	<i>C. albicans</i>	Forte Positiva	Positiva
ML15143M	<i>M. pachydermatis</i>	Forte Positiva	Forte Positiva
ML1614R	<i>R. mucilaginosa</i>	Negativa	Forte Positiva
ML16 14S32	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte Positiva
ML1714M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte Positiva
ML1814M	<i>M. pachydermatis</i>	Negativa	Positiva
ML1914M	<i>M. pachydermatis</i>	Negativa	Negativa
ML2114T	<i>Trichosporon</i> spp	Negativa	Positiva
ML2114M	<i>M. pachydermatis</i>	Negativa	Negativa
ML2214T	<i>Trichosporon</i> spp	Negativa	Forte Positiva
ML2314SR	<i>R. mucilaginosa</i>	Negativa	Forte Positiva
ML2314R	<i>R. minuta</i>	Positiva	Forte Positiva

Cont. Tabela 7 – Correlação da atividade enzimática entre a protease e a fosfolipase

ML24143M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte Positiva
ML2514M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte Positiva
ML2714M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte Positiva
ML2814R	<i>R. minuta</i>	Negativa	Forte Positiva
ML281432C	<i>C. glabrata</i>	Forte Positiva	Negativa
ML281437C	<i>C. tropicalis</i>	Positiva	Negativa
ML2814T	<i>Trichosporon spp</i>	Positiva	Negativa
ML2814BODT	<i>Trichosporon spp</i>	Negativa	Forte Positiva
ML2914M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Negativa
ML3014M	<i>M. pachydermatis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML3314M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Negativa
ML3514M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte Positiva
ML3514C	<i>C. famata</i>	Negativa	Negativa
ML3714M	<i>M. pachydermatis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML3814R	<i>R. mucilaginosa</i>	Negativa	Forte Positiva
ML3814C	<i>C. guilliermondii</i>	Forte Positiva	Negativa
ML391437	<i>Candida tropicalis</i>	Negativa	Negativa
ML391437T	<i>Trichosporon spp</i>	Negativa	Negativa
ML3914R1	<i>R. glutinis</i>	Negativa	Forte Positiva
ML3914R2	<i>R. mucilaginosa</i>	Positiva	Forte Positiva
ML4014R	<i>R. mucilaginosa</i>	Positiva	Forte Positiva
ML4014C	<i>C. albicans</i>	Positiva	Negativa
ML4014SBOD1	<i>Trichosporon spp</i>	Negativa	Negativa
ML411432C	<i>C. albicans</i>	Forte Positiva	Positiva
ML411432M	<i>M. pachydermatis</i>	Negativa	Negativa
ML4214S37C	<i>C. tropicalis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML4214T	<i>Trichosporon spp</i>	Forte Positiva	Negativa
ML4315M	<i>M. pachydermatis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML4415C	<i>C. parapsilosis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML4415M	<i>M. pachydermatis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML4815C	<i>Candida tropicalis</i>	Forte Positiva	Positiva
ML4915C	<i>Candida albicans</i>	Positiva	Positiva
ML4915C2	<i>C. glabrata</i>	Negativa	Negativa
ML5015R1	<i>R. glutinis</i>	Forte Positiva	Forte positiva
ML5015R2	<i>R. minuta</i>	Forte Positiva	Positiva
ML5015C1	<i>C. albicans</i>	Positiva	Negativa
ML5015C2	<i>C. famata</i>	Negativa	Negativa
ML5015C3	<i>Candida tropicalis</i>	Positiva	Positiva
ML5115M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Negativa
ML5215C	<i>C. parapsilosis</i>	Forte Positiva	Negativa
ML5215R	<i>R. glutinis</i>	Negativa	Forte positiva
ML5315M	<i>M. pachydermatis</i>	Positiva	Forte positiva
ML5315C	<i>Candida tropicalis</i>	Forte Positiva	Positiva
ML5415C	<i>C. glabrata</i>	Negativa	Negativa
ML5415R	<i>R. mucilaginosa</i>	Negativa	Forte positiva

O conhecimento de micro-organismos potencialmente causadores de patologias presentes no trato reprodutivo de cadelas representa talvez a solução de inúmeros distúrbios ainda pouco explicados e controlados na medicina veterinária.

Em relação a produção de enzimas, as leveduras isoladas da mucosa cérvico-vaginal de cadelas híidas produzem fosfolipase e/ou protease, apresentando algum grau de virulência. Além disso, deve-se considerar que inúmeras amostras isoladas neste trabalho apresentaram Pz compatível com a classificação fortemente positiva, o que sugere que essas amostras possuem potencial patogênico aos animais. Entretanto para o agente ser agressivo ao hospedeiro, também deve-se levar em consideração o estado imunológico, pois a maioria delas são leveduras oportunistas.

O isolamento das cepas agentes de possíveis distúrbios reprodutivos, a determinação das espécies e a avaliação dos fatores de virulência são imprescindíveis para uma boa compreensão dos casos clínicos, principalmente em casos recorrentes. Isso aponta a importância dos estudos destas leveduras já que assumem grande potencial patogênico para estes animais.

6 CONCLUSÕES

- *Candida* spp, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* spp e *Trichosporon* spp são leveduras normalmente presentes na micobiota cérvico-vaginal de cadelas híginas.
- Não somente a espécie *Candida albicans*, mas outras espécies podem estar presentes no trato reprodutivo de cadelas.
- A espécie *Malassezia pachydermatis*, normalmente referida como presente na pele e no conduto auditivo de cães, também encontra-se compondo a micobiota do trato reprodutivo destes animais.
- A pequena variação de pH provavelmente não influencia a presença ou ausência das leveduras isoladas embora pareça influenciar em suas concentrações.
- O lavado cérvico-vaginal demonstrou ser um método de qualidade no que diz respeito ao isolamento e a quantificação de leveduras.
- Muitos fungos leveduriformes presentes no trato reprodutivo de cadelas são produtores de enzimas relacionadas com virulência, podendo inclusive ser fortes produtoras destas enzimas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.26, n.5/6, p.402-405, Mar. 2000.
- AINSWORTH, G.C.; AUSTWICK, P.K.C. Fungal diseases of animals. **Surrey: Commonwealth Agricultural Bureaux**, 216p, 1973.
- AMARAL, R. C.; IBANEZ, J. F.; MAMIZUKA, E. M.; GAMBALE, W.; DE PAULA, C. R.; LARSSON, C. E.; “Microbiota indígena do meato acústico externo de gatos hípidos”. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.4441–4445, 1998.
- ANDRADE, J. B. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de gatas domésticas. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 31p, 2006.
- ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; CAROLINE A PESCADOR, C. A.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. *Geotrichum candidum* as a possible cause of bovine abortion. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, n.6, p.795-7, 2013.
- ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v.45, n.4, p.287-303, 2007.
- ASBHEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Review**, v.15, p.21-57, 2002.
- BABA, E.; HATA, H.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. **American Journal Veterinary Research**, v.44, n.4, p.606-609, 1983.
- BARADKAR, V. P.; KUMAR, S. “Meningitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in human immunodeficiency virus seropositive patient. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v.11, n.4, p.245–247, 2008.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.
- BARONI, F. A.; PAULA C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N. G.; OLIVEIRA, M. T. B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicinal Tropical de São Paulo**, n.79, p. 71-75, 2006.
- BATISTA, I. O.; Oliveira, A.A. F.; Pinheiro Júnior, J. W.; Peixoto, R. M.; Teles, J. A. A.; Mota, R. A. Endometrite por *Candida* sp e outros micro-organismos associados em éguas doadoras de embrião na Zona da Mata do Estado de Pernambuco – Brasil. **Medicina Veterinária**, v.2, n.4, p.41-44, out-dez, 2008.

BATISTA, C. M. B. Perfil Fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter de neonatos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de Hospital Terciário de São Paulo. **Tese de Doutorado em Ciências – ICB USP**, 2009.

BRANCO, P. V. G. C.; ANJOS, D. C. V.; NASCIMENTO, F. B.; VALE, I. N. F.; PEDROZO, C. M.; AZEVEDO, S.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com aids e indivíduos hígidos. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.4, p.427-441, out.-dez, 2012.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. **Journal of Medical Microbiology**, ed.63, p.1568-1572, 2014.

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

BONA, E.; TELESCA, S. U. P.; FUENTEFRÍA, A. M. Occurrence and identification of yeasts in dogs external ear canal with and without otitis. **Revista Medicina Veterinária e Zootecia Córdoba**, v.17, n.2, p.3059-3064, 2012.

BENTUBO, H. D. L.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O. Leveduras isoladas do pelame de cães sadios que vivem em regime domiciliar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.1018-1021, 2010.

BENTUBO, H. D.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **Springerplus**, p.377, 2014.

BISWAS, S. K.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.51, p.1191-1199, 2001.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidose na Medicina Veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, v.39, n.9, 2009.

BORDEAU, P.; HUBERT, H.; MAGNOL, J. P. Suspicion de dermatomycose à *Rhodotorula mucilaginosa* chez un chat infecté par le FelV et le FIV. **Recueil de médecine vétérinaire**, p.91-5, 1992.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, v.14, n.3, p.608-616, 2002.

CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLA, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipiddependent *Malassezia* species from domestic animals. **Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research**, v.7, p.1064-1076, 2007.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology. v.9, n.7, p.327-31, 2001.

CARFACHIA, C.; OTRANTO, D. Association phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Oct, v.42, n.10, p.4868-4869, 2004.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryot Cell**, v.6, n.12, p.2169-2174, 2007.

CHAVES, M. M. B. C. Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de lactobacilos. **Dissertação do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista**, 53p., 2011.

CHEN, L.; BLANK, E.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.3, n.5, p.570-574, setembro, 1996.

CHEN, S. C. A.; WRIGHT, L. C.; SANTAGELO, R. T.; MULLER, M.; MORAN, V. R.; KUCHEL, P. W.; SORRELL, T. C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.65, n.2, p.405-411, 1997.

CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A.R.M.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, O.S.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Isolamento de leveduras da microbiota vaginal de cadelas relacionado com a fase do ciclo estral. **In: Anais do Congresso Brasileiro de Micologia**, v.3, p.130, 2001.

CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R. S.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; FLÁVIA, B. A.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.201-204, 2005.

CLEFF, M.B.; XAVIER, M.O.; MARTINS, A.A. et al. Caracterización de la microbiota leveduriforme residente en la vagina de perras en diferentes fases del ciclo estral. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.39, p.153-158, 2007.

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.

COPOLLA, S.; ANGARANO, G.; MONTAGNA, M. T.; CONGEDO, P.; BELLISARIO, A.; MONNO, L.; INFANTE G.; PASTORE, G. *Trichosporon beigelli* in AIDS patients undergoing antifungal prophylaxis – report of two cases. **Journal de Micologie Medicale**, v.3, p.169-171, 1993.

CORDEIRO, R. A.; DE OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO D. S.; TEIXEIRA, C. E.; MARQUES, F. J.; BITTENCOURT, P. V.; CARVALHO, V. L.; BANDEIRA, T. D. E. J.; BRILHANTE, R. S.; MOREIRA, J. L.; PEREIRA-NETO, W. D. E. A.; SIDRIM, J. J.;

ROCHA, M. F. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v.53, n.2, p.145-52, 2015.

CORRÊA, P. R.; DAVID, P. R. S.; NATHÁLIA, P. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.4, 2009.

COSTA, E. C. F.; LÉGA, E.; NEVES, L. Estimativa da fase do ciclo estral por citologia vaginal em cadelas (*Canis familiares*, Linnaeus, 1758) da região de Ituverava SP. **Nucleus Animalium**, v.1, n.2, p.75-84, 2009.

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

COUTINHO, S. D. A. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.57, p.149-153, 2005.

CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**, 2º Ed., Revinter, 348p., 2010.

D'ÉÇA JÚNIOR, A. D.; SILVA, A. F.; ROSA, F. C.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. Atividade diferencial *in vitro* de fosfolipases e proteinases ácidas de isolados clínicos de *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, p.334-338, 2011.

DA CUNHA, M. M. L.; DOS SANTOS, L. P. B.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; VERMELHO, A. B.; ROZENTAL, S. "Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, v.55, n.3, p.396-403, 2009.

DE BERNARDIS, F.; AGATENSI, L.; ROSS, I. K.; EMERSON, G. W.; LORENZINI, R.; SULLIVAN, P.A.; CASSONE, A. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. **Journal of Infection Diseases**, v.161, n.6, p.1276-83, 1990.

DELUCCHI, L; FRAGA, M; PERELMUTER. K; CIDADE, E; ZUNINO, P. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. **Canadian Veterinary Journal**, v.49, p.991-994, 2008.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds) **Medical Mycology**, 1ª ed, p.195-239, 2003.

DUARTE, E.R.; RESENDE, J. C.; ROSA, C. A.; HAMDAN, J. S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.48, p.631-635, 2001.

ESCHENBACH, D. A.; THWINN, S. S.; PATTON, D. L.; HOOTON, T. M.; STAPLETON, A. E.; AGNEW, K. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge and microflora. **Clinical Infection Disease**, v.30, p.901-907, 2000.

FLORIÃO, M. M.; FRAGA, M. E. Microbiota fúngica de fluidos cérvico-vaginal de bovinos de uma criação orgânica em região tropical. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.36, n.1, p.85-89, 2014.

FRAGA, M. E.; BARONI, F. A.; CARVALHO, M. G.; SANTOS, A. G.; ANDRADE, J. B. Microbiota de fluido cervico-vaginal de cabras, cadelas e gatas. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.30, n.1, p.50-54, 2008.

GALHARDO, A. J. Hygea. Disponível em: <http://higea.blogspot.com.br/2008/08/infecopor-fungos.html>. Acesso em 03 de julho de 2014.

GARCIA, M. E. & BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a os animales. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p.82-87, 2000.

GAROUSI, M. A., KHOSRAVE, A. R.; HAVARESHTI, P. Mycoflora of cervicovaginal fluids in dairy cows with or without reproductive disorders. **Mycopathologia**, n.164, p.97-100, 2007.

GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants in *Candida*: a review. **Journal Micologie Médicale**, n.33, p.265-282, 1990.

GHANNOUM, M. A.; RADWAN, S. S. *Candida* adherence to epithelial cells. New York: **CRC Press**, 1990.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, n.12, p.501-517, 1999.

GHANNOUM, M. A.; HOSSAIN, M. A. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. **Expert Opinion on Invest Drugs**, n.9, p.1797-1813, 2000.

GOMES, M. C. Microbiota vaginal de cabras nas fases do proestro, pós-cópula e pós-parto, 2006. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Serópedica, 2006.

GOYAL, R.; DAS, S.; ARORA, A.; AGGARWAL, A. *Rhodotorula mucilaginosa* as a cause of persistent femoral nonunion. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.54, n.1, p.25-27, 2009.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**, 2 ed. New York: Wiley-Liss. ISBN: 0- 471-16615-4, 1994.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.69, p.337-355, 1996.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Micology**, v.37, p.295-306, 1999.

GUILLOT, J; GUÉHO, E. The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by rRNA séquense and nuclear DNA comparisons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.67, p.297-314, 1995.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species – A pratical approach. **Journal de Mycologie Médicale**, v.6, p.103-110, 1996.

HERSHON, L. E. Elaboration of hyaluronidase and chondroitin sulfatase by microorganisms inhabiting the gingival sulcus: evaluation of a screening method for periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.42, p.34–36, 1971.

HESELTINE, J.C.; PANCIERA, D. L.; SAUNDERS, G. K. Systemic candidiasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, p.821-824, 2003.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipiddependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.2, p.623-627, 2004.

HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.1, p.3-9, 2007.

HOOG, G. S.; GUARRO, J; GENÉ, J.; FILGUEIRAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**, 2 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

JOHN, D. A.; NAIR, R.; SREEJITH, J. R.; DEEPTHI, L.; PRASEEDA, R.; AJITKUMAR, G. Vaginal microflora and its antibiogram in infeertile bitches. **Online Veterinary Journal**, v.6, n.1, p.79, 2011.

GAROUSI, M. T.; KHOSRAVE, A. R.; HAVARESHTI, P. Mycoflora of cervico-vaginal fluids in dairy cows with or without reproductive disorders. **Mycopathologia**, v.164, p.97-100, 2007.

GUNAY, U.; ONAT, K.; GUNAY, A.; ULGEN, M. . Vaginal, Cervical and Uterine Bacterial Flora at the Different Stages of the Reproductive Cycle in Ovariohysterectomized Bitches. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.3, p.478-481, 2010.

KALKANCI, A.; GUZEL, A.B., KHAILIL, L. L., AYDIN, M.; LLKIT, M., KUSTIMUR, S. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. **Medical Mycology**, v.50, n.6, p.585-593

KARKOWSKA-KULETA J., RAPALA-KOZIK M., KOZIK A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Bioch Polonica**, v.56, p.211-224, 2009.

- KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Relation ship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.28, n.2, p.464-8, 1980.
- KIVARIA, F.M.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M. A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. **Veterinary Journal**, v.173, p.617-622, 2007.
- KONTOYIANNIS, D.P.; TORRES, H. A.; CHAGUA, M.; HACHEM, R.; TARRAND, J. J.; BODEY, G. P. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. **Scandinavian Journal of Infection Disease**, v.36, n.8, p.564-569, 2004.
- KREIL, G. Hyaluronidases a group of neglected enzymes. **Protein Science**. v.4, p.1666-1669, 1995.
- KRISTENSEN, G. B.; HOLUND, B.; GRISTED, P. Efficacy of cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells. **Acta Cytologica**, v.33, p.849-891, 1981.
- KUMAR, G.; KUMAR, S. J.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v.161, p.213-8, 2006.
- KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, n.3, p.125-135,1998.
- KUNTZE, A.; AURICH, **Journal Der EndometritisPyometra-Complex bei tieren**. Berlin: Gustav Fischer, 1995.
- KURTZMAN, C.; FELL, J. **The Yeasts. A taxonomic study**. 4 th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts. A taxonomic study**, 5th ed, v.3, Amsterdam: Elsevier, 2011.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Medical Mycology. Philadelphia, **Lea & Febiger**, 866p, 1992.
- LACAZ, C.S; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**, 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, 9 ed. São Paulo: Sarvier, 1104p, 2002.
- LARONE, D. Medically Important Fungi; **A Guide to Identification**, 4th ed, ASM Press, Washington, 2002.
- LIANJUAN M., YUEMIN L. & XUN-M. Microbial flora of the vagina of cows after parturition. **Chinese Journal Veterinary of Science Technology**, v.25, p.26-27, 1995.

LIMA, T. D.; FERNANDES, O. F. L.; SOUZA, L. K. H.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R. *Candida albicans* de mucosa vaginal: Morfotipagem e produção de protease, v.33, p.65-70, 2004.

LINARES, C. E. B.; LORETO, E. S.; SILVEIRA, C. P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.4, 2007.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.3, p.370-374, 2010.

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. **Medical Mycology**, v.48, n.6, p.889-92, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**, 8th ed. Prentice Hall Upper Saddle River Press, London, 986 p., 1997.

MAKIMURA, K.; TANUMA, Y.; KUDO, M.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spaces 1 regions. **Journal Medical Microbiology**, v.49, p.29-35, 2000.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**, Second edition, Mosby Elsevier, 2013.

MARTINS, L. L.; OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. R. F.; MALUTA, R. P.; MENDES, S.R. C.; ÁVILA, F. A. Análise microbiológica do útero e da vagina em cutias nulíparas e não nulíparas (*Dasypus azarae*). **Revista Biotemas**, v.25, p.181-184, 2012.

MARTINS, C. A. P. M.; SANTOS, S. S. F.; LOBERTO, J. C. S.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Presença *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. **Ciência Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v.5, n.3, p.75-85, 2002.

MATOUSEK, J. L.; CAMPBELL, K. L.; KAKOMA, I.; SOLTER, P. F.; DAVID J. SCHAEFFER, D. J. Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.67, n.1, p.56-59, 2003.

MATTEI, A. S.; MADRID, I. M.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A. Presença de fungos com potencial patogênico em instrumentos de tosa. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.2, p.40-45, 2014.

MAYSER, P.; LAABS, S.; HEUER, K. U.; GRUNDER, K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathologia**, v.135, n.3, p.149-155, 1996.

MENEZES, T.; SCAIN, G.; QUADROS, R. M.; MILETTI, L. C. ; SOUZA, A. L.; MIGUEL, R. L. ; MARQUES, S. M. T. *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos (*Columba livia*) de

áreas públicas de lages, santa Catarina. **Science and Animal Health**, v.2, n.2, p.102-114, 2014.

MERKEROVA, M.; DOSTÁL, J.; HRADILEK, M.; PICOVÁ, I.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. **Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research**, v.6, p.1018-1026, 2006.

MEZZARI, A. **Micologia no Laboratório**, 2 ed. Porto Alegre: Sagra Luzzato, 2001.

MEYER, M. H.; LETSCHER-BNI, V.; WALLER, J.; LUTZ, P.; MARCELLIN, I.; HERBRECHT, R. Chronic disseminated *Trichosporon asahii* infections in a leukemic child. **Clinical Infection Diseases**, v.35, p.22-25, 2002.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, T.; YAMADA, T.; SUGITA, T.; YAMAGUSHI, H. A simple PCER-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal Microbiological Methods**, v.61, p.281-284, 2005.

MONIF, GRG. Classification and Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.52, n.7/2, p.935-939, 1985.

MORAES, I. A. Investigações sobre a fisiopatologia da reprodução em micos leões (*Leontopithecus* sp., LESSON, 1840) mantidos em cativeiro (*Callitrichidae* - Primates). **Tese de Doutorado, Niterói: Universidade Federal Fluminense**, 156p, 2004.

MOREIRA, D. Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente. **Tese de doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo**, 2012.

MORENO, G.; BICUDO, P.L; LOPES, C. A. M. Aspectos bacteriológicos da flora vaginal de cadelas. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.40, n.1, p.59-62, 1973.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; GASPERIS, E.; AGNETTI, F.; RASPA, M. Diffuse cutaneous in a dog. Diagnostic by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.21, p.139-142, 2004.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; FUKUSHIMA, K.; SCHREIBER, A. Z.; NISHIMURA, K.; PAPAORDANOU, P. M.; TRABASSO, P. *Trichosporon* species infection in boné marrow transplanted patients. **Diagnostic Microbiology and Infect Disease**, v.39, n.3, p.161-164, 2001.

MORIS, D. V.; MELHEM, M. S. C.; MARTINS, M. A.; MENDES, R. P. Oral *Candida* spp. Colonization in human imunodeficiency vírus-indefected individuals. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.14, n.2, p.224-257, 2008.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.3, p.400-428, 2003.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D.; MAKWANA, J.; KANZARIA, P.; TSICHLAKI, E.; WEINDL, G.; TAPPUNI, A. R.; RODGERS, C. A.; WOODMAN, A. J.; CHALLACOMBE, S. J.; SCHALLER, M.; HUBE, B. 5r5. **Microbiology**, v.154,p.3266-3280, 2008.

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

ORTIZ, G.; MARTÍNA, M. C.; CARRILLO-MUÑOZCY, A. F.; PAYÁ, J. M. Producción de fosfolipasa y proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros con otitis y sin otitis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.30, n.4, p.235-238. 2013.

PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Atividades das enzimas fosfolipase e proteinase por cepas de *Cryptococcus* spp isoladas do ambiente. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.36, n.2, p.62B, 2004.

PETRITES-MURPHY, M.B.; Robbins, L. A.; J. Donahue, M.; Smith, B. Equine cryptococcal endometritis and placentitis with neonatal cryptococcal pneumonia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.383-386, 1996.

PRIESTLLEY, C. F. J; JONES, B. M; DHAR, J; GOODWIN, L. What is normal vaginal flora?. **Genitourinary Medicine**, v.73, p.23-28, 1997.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection os phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, n.20, p.7-17, 1982.

PUGH, D.; CAWSON, R. A. The cytochemical localization of phospholipase and lysophospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, n.20, p.15-20, 1975.

RAPOSO, J. B.; NOBRE, M. O.; FERNANDES, C. G.; PORTO, M. Candidíase Cutânea em um Canino. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.2/3, n.1, p.11-15,1996.

REICH, W.J.; NECHTOW, M.J. Canine genital moniliasis as a source of reinfection in the human female. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.141, n.14, p.991, 1949.

RICIPUTO, R. M.; OLIVERI, S.; MICALLI, G.; PAPUPPO, A. Phospolipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. **Mycoses**, Berlin, v.39, n.5-6, p.233-235, 1996.

RIPPON, J. N. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, **In: Medical Mycology**, Saunders, 797p. 1988.

ROCHA, A. A.; GAMBARINI, M. L.; ANDRADE, M. A.; FILHO, B. D. O.; GOMES, F. A. Microbiota cérvico-vaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.4, p.215-220, 2004.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host enviromente: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.338-343, 2003.

RUCHEL R, TEGELER R, TROST MA. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, n.20, p.233-244, 1982.

SACHIN, C. D.; RUCHI K, SANTOSH S. *In vitro* evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. **International Journal of Medicine and Biomedical Research**, v.1, n.2, 2012.

SAMONIS, G.; ANATOLIOTAKI, M.; APOSTOLAKOU, H.; MARAKI, S.; GOERGOULIAS, V. Transient fungemia due to *Rhodotorula rubra* in a câncer patient: case report and review of the literature. **Infection**, v.29, p.176-76, 2001.

SANTAGELO RT, NOURI-SORHABI MH, SORRELL TC, CAGNEY M, CHEN SC, KUCHEL PW, WRIGHT LC. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. **Journal of Medical Microbiology**, n.48, p.731-740, 1999.

SANTIN, R. Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 89p, 2009.

SANTIN, R.; MATTEI, A. S. M.; WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; XAVIER, M. O.; NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p.139–143, 2013.

SANTOS, A. G. Avaliação da microbiota vaginal de cadelas usando como diagnóstico o isolamento e a colpocitologia. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Veterinária Seropédica, UFRRJ**, 29p, 2006.

SAVINI, S.; SOZIO, F.; CATAVITELLO, C. Femoral prosthesis infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.10, p.3544–3545, 2008.

SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B. I. **Mechanisms of microbial disease**. 2.ed. Baltimore: Williams &Wilkins, 973p, 1993.

SCHLOTTFELDT, F. S.; TRAMONTIN, S. W.; NAPPI, B. P.; SANTOS, J. I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre implicações clínico laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.3, 2002.

SCHMIEL, D. H.; MILLER, V. L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, v.1, n.13, p.1103-1112, 1999.

SCOTT, D. W.; MILLER JR, W. H.; GRIFFIN, C. E. Doenças do ouvido externo. **In: Muller & Kirk Dermatologia de Pequenos Animais**, 5ed. Rio de Janeiro: Interlivros, p.907-925, 1996.

SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.; SHARIFZADEH, A.; TOOTIAN, Z. “Isolation and identification of yeast flora from genital tract in healthy female camels (*Camelus dromedarius*)”. **Veterinary Microbiology**, v.144, n.1-2, p.183–186, 2010.

SHIMIZU, M. T.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C.S.; FANTINATO, V.; PAULA, C.R. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v.33, p.27-31, 1995.

SHIMIZU, M. T.; ALMEIDA, N. Q. Fatores enzimáticos de agressão produzidos por bactérias aeróbicas da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da Unesp**, v.18, n.1/2, p.199-204, 1989.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, S. C. M. Virulence factors of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Dissertation for PhD degree in Biomedical Engineering - Universidade do Minho**. Escola de Engenharia, 2010.

SILVA, T. C. S. Isolamento e caracterização de leveduras do trato respiratório superior e do trato digestório de caprinos e de ovinos do estado do Ceará. **Dissertação Universidade estadual do ceará Pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa Faculdade de veterinária Programa de pós-graduação em ciências veterinárias**, 2013.

SMITH, T. Mycosis of the bovine fetal membranes due to a mould of the genus *Mucor*. **Journal of Experimental Medicine**, v.31, p.115-22, 1919.

SÓRIA, F. B. A.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SOUZA, L.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Métodos de colheita para o isolamento de leveduras em cavidade oral e mucosa vaginal de cadelas, Pelotas. **Anais do XI Congresso de Iniciação Científica e 4º Encontro de PósGraduação (ENPOS)**, 2002.

STAIB, F. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. **Sabouraudia**, v.4, p.187-193, 1965.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICTERLEIN, T.; HOF, E.; MORSCH, H. J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Science**, n.97, p.6102–6107, 2000.

STEIN, M.; CASTRO, L. L. D; GUIOT. EMILLE. G.; SILVA, L. G. C.; SILVEIRA, G. R.; CLEFF, M. B.; SCHRAMM, R. C. Avaliação da microbiota vaginal de fêmeas caninas relacionadas com o ciclo estral. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.36, p.201-204, 2009.

STOUT, T. A. E. Fungal endometritis in the mare. **Pferdeheilkunde**, v.24, n.1, p.83-87, 2008.

STURSOVÁ, M.; ZIFCAKOVÁ, L.; LEIGH, M. B.; BURGESS, R.; BALDRIAN, P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology**, v.80, n.3, p.735-46, 2012.

TEDESCO, J. J. A.; BRITTO, I. S. W.; RODRIGUES, L. P. Vulvovaginites na gestação. **Revista da Associação de Obstetrícia e Ginecologia do Estado de São Paulo**, v.63, n.2, p.1-2, 2006.

8 ANEXOS

Anexo 1 – Ficha de exame clínico geral e ginecológico

Anexo 2 – Termo de autorização para coleta de material ginecológico

Anexo 3 – Solução salina com cloranfenicol 200mg/l

Anexo 4 – Meio Sabouraud dextrose a 4% enriquecido com extrato de leveduras a 1%

Anexo 5 – Meio Ágar Infuso de Cérebro e Coração

Anexo 6 – Meio Ágar-arroz

Anexo 7 – Meio YNB

Anexo 8 – Meio YCB

Anexo 9 – Meio para fermentação de açúcares

Anexo 10 – Ficha para identificação de leveduras

Anexo 11 – Meio para verificar produção de fosfolipase

Anexo 12 – Meio para verificar produção de protease

Anexo 1 – Ficha de exame clínico geral e ginecológico



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária

Departamento de Microbiologia do Instituto de Medicina Veterinária da UFRRJ

Ficha de Exame Clínico e Ginecológico	
Identificação:	
Data:	
Dados Pessoais	
Nome do Proprietário:	
Nome:	Castrada () Não Castrada ()
Raça:	
Idade:	Gestante () Período da Gestação:
Peso:	
Observações:	
Exame Clínico Geral	
Temperatura Corporal:	
Mucosa ocular:	
Mucosa oral:	
Frequência Respiratória:	
Frequência Cardíaca:	
Observações:	
Exame Ginecológico	
Aspecto da Vulva:	
Mucosa Vaginal:	
Corrimento Vaginal	Sim () Não () Aspecto:
pH Vaginal:	
Temperatura Vaginal:	
Observações:	

Anexo 2 – Termo para autorização de coleta de material cérvico-vaginal



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

A coleta de material do seu animal objetiva isolarmos leveduras para que possamos conhecer qual a micobiota comum ao aparelho reprodutivo de cães. O conhecimento da micobiota será de grande auxílio na prevenção e cura de patologias que sejam ocasionadas por leveduras, incluindo aquelas que sejam consideradas exóticas a estes animais. Solicitamos sua autorização para coleta de material e para que os fungos isolados sejam utilizados na pesquisa intitulada "Identificação, quantificação e virulência "in vitro" de leveduras da micobiota cérvico vaginal de cadelas", sob responsabilidade do Prof. Francisco de Assis Baroni. A contribuição é voluntária, no caso de lavado cérvico-vaginal e também é voluntária na doação do útero nos casos de histerectomia. No caso de lavados, não há danos ou sofrimentos ao(s) seu(s) animal(is). A histerectomia somente é realizada se necessária e neste caso, apenas utilizaremos o órgão (cujo destino normalmente é o descarte). A qualquer momento ou fase da pesquisa, o Sr(a) poderá retirar o consentimento, independente de motivo, sem prejuízo a sua pessoa. O Sr(a) não terá despesas e não receberá remuneração. 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 das possíveis leveduras obtidas 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 3- Solução salina com cloranfenicol 200mg/L

NaCL	9,0g
Cloranfenicol	200mg
Água destilada	1,0 L

Distribuição em frascos de Erlenmeyer e autoclavação a temperatura de 120°C por 20 minutos.

Anexo 4 – Meio Sabouraud dextrose enriquecido com extrato de levedura a 1%

Ágar-Sabouraud	6500mg
Cloranfenicol	200mg
Água destilada	1,0 L

Fervura até solubilização dos componentes, distribuição em tubos, arrolamento e autoclavação a 120°C por 20 minutos.

Anexo 5 – Meio Ágar Infuso de Cérebro e Coração

Ágar Infuso de Cérebro e Coração	5200mg
Cloranfenicol	200mg
Água destilada	1,0 L

Fervura até solubilização dos componentes, distribuição em frasco Erlenmeyer, arrolhamento e autoclavação a 120°C por 20 minutos. Resfriamento a 50°C e distribuição em placas de petri.

Anexo 6 – Meio Ágar-arroz

Arroz integral	20g
Tween	10 mL
Ágar	18 g
Água destilada	1,0 L

Fervura do arroz em água destilada por 45 minutos, filtrar e adicionar água para completar o volume de 1 L. Adiciona o Agar e o Tween. Autoclavação em temperatura de 121°C por 15 minutos.

Anexo 7 – Meio YNB

YNB	6,7g
Agar	15g
Água destilada	1,0 L

Fervura até solubilização dos componentes e autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Anexo 8 – Meio YCB

YCB	11,7g
Agar	15g
Água destilada	1,0 L

Fervura até solubilização dos componentes e autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Anexo 9 – Meio pra fermentação de açúcares

Meio básico para fermentação

Extrato de levedura	4,5g
Peptona de Caseína	7,5g
Água destilada	1 L

Indicador de Andrade

Azul de Bromotimol	50,0mg
Água destilada	75,0 ml

Distribuir o meio com o indicador de pH em tubos de ensaio contendo em seu interior tubos de Durhan invertidos. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Anexo 10– Ficha para a identificação de leveduras

		INSTITUTO DE VETERINÁRIA – DEPTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA LABORATÓRIO DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E AMBIENTAIS					
PROTOCOLO DE TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS							
Procedência						Registro n°	
1 - Exame direto				Esquema da visualização microscópica ou foto			
2 – Crescimento em meios usuais							
Crescimento em meios com ácidos graxos							
3 – Microcultivo							
Pseudomicélio		Clamidoconídios					
Blastoconídios		Tubo germinativo em soro sanguíneo					
Artroconídios							
4 - Reprodução sexuada : Presença de ascos e ascósporos							
5 – Outras provas :				Esquema da visualização do microcultivo			
Síntese de amido							
Produção de melanina							
Cloreto de trifetil tetrazólio							
Prova do azul de diazônio B							
Crescimento em meio CGB							
Crescimento em meio GCP							
Crescimento em meio CDBT							
6 – Auxanograma							
A	KNO3		6-Rafinose		16-Adonitol		26-Etanol
B	Peptona		7-Trealose		17-Manose		27-Ácido succínico
C	N-acetil - glucosamina		8-Ramnose		18-Dulcitol		28- Glicerol
D	Creatina		9-Celobiose		19-Arabinose		29-Ribitol
E	Creatinina		10-Galactose		20-Fructose		30-Galactitol
	1-Lactose		11-Inulina		21-Xilitol		31-D-glucitol
	2-Glicose		12-Melezitose		22-Sorbose		
	3-Sacarose		13-Inositol		23-Manitol		
	4-Melibiose		14-Xilose		24-Ácido cítrico		
	5-Maltose		15-Eritritol		25-Metanol		
7- Zimograma							
7.1-Rafinose		Provas complementares :				Outros	
7.2-Glicose		Hidrólise da ureia					
7.3-Lactose		Hidrólise da gelatina					
7.4-Maltose		Crescimento em meio com cicloheximida					
7.5-Sacarose		Crescimento em temperaturas variadas					
7.6-Trealose		Assimilação de D-prolina					
7.7-Galactose		Assimilação de D-triptofano					
Identificação							

Anexo 11 – Meio para verificar produção de Fosfolipase.

Preparação de gema de ovo

Gema de ovo _____ 80g

Imergir os ovos por uma hora em álcool iodado. Em seguida, separar as gemas e colocá-las em recipiente estéril. O volume necessário deverá ser pipetado para evitar a entrada de membranas da gema na composição final.

Meio Ágar fosfolipase

Ágar Sabouraud dextrose	65g
NaCL	57,3g
CaCL ₂	0,55g
Água destilada	1,0L

Autoclavação a 120°C por 20 minutos, resfriamento a 50°C, adição de gema de ovo, homogeneização e distribuição em placas de petri.

Anexo 12 – Meio para verificar produção de Protease.

Solução de estoque (filtrada para 1,0 L)

Albumina bovina (BSA) fração V (Sigma)	2,0g
Água destilada	50 ml

Esterilizar por filtração em Milipore (0,22 μ m)

Solução Base (“Yeast Carbon Base”)

YCB	11,7g
Protovit (Roche)	2,5ml
Ágar	18g
Água destilada	950ml

Autoclavar a solução base a 121°C, resfriar a 55°C e adicionar a solução estoque na mesma. Distribuir em placas de petri.