

Isolamento e perfil de resistência de *Candida* spp. de animais domésticos e selvagens

Isolation and resistance profile of *Candida* spp. of domestic and wild animals

Aislamiento y perfil de resistencia de *Candida* spp. de animales domésticos y salvajes

Recebido: 21/07/2021 | Revisado: 01/08/2021 | Aceito: 04/08/2021 | Publicado: 10/08/2021

Stéfano Luís Cândido

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2735-2121>
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil
E-mail: stefanobte@hotmail.com

Isabela de Godoy Menezes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2577-8719>
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil
E-mail: belinhagodoy@hotmail.com

Luciano Nakazato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1244-0690>
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil
E-mail: lucnaka@gmail.com

Thais Oliveira Morgado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2974-3241>
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil
E-mail: thaismorgado@gmail.com

Aline Ludwig

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0904-4953>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: lineludwig09@gmail.com

Jânio Moraes Santurio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6286-9076>
Universidade Federal de Santa Maria, Brasil
E-mail: janio.santurio@gmail.com

Valéria Dutra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6630-2293>
Universidade Federal de Mato Grosso, Brasil
E-mail: valeriadutra.dutra@gmail.com

Resumo

Candida spp. são leveduras presentes na microbiota de humanos e animais, porém devido a desordens podem se tornar patogênicas causando candidíase. Este estudo objetivou avaliar a diversidade de espécies de *Candida* em animais domésticos e silvestres e o perfil de susceptibilidade antifúngica. Um total de 79 isolados foram obtidos de animais domésticos (n=49) e animais silvestres (n=30) coletados de 13 diferentes sítios de lesão. Os isolados foram previamente caracterizados morfológica e tintorialmente e a classificação definitiva ocorreu pelo sequenciamento de DNA da região ITS. O perfil de susceptibilidade foi obtido pela técnica de microdiluição em caldo com os antifúngicos: caspofungina, fluconazol, voriconazol, anfotericina B, nistatina e itraconazol. Doze diferentes espécies de *Candida* foram identificadas, onde *C. rugosa* foi a espécie mais isolada (26%; 21/79), seguida por *C. parapsilosis* (20%; 16/79) e *C. albicans* (15%, 12/79). O perfil de susceptibilidade foi avaliado em 30 isolados (10 isolados de *C. glabrata*, 10 isolados de *C. tropicalis* e 10 isolados de *C. parapsilosis*), resultando em 100% dos isolados testados resistentes ao itraconazol, porém nenhum deles foi resistente ao voriconazol. Os isolados de *C. tropicalis* foram resistentes a múltiplos antifúngicos. Esses dados alertam para o problema mundial de resistência a antimicrobianos, agravado pelo aparecimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos. Este é o primeiro estudo que verificou a ocorrência e os perfis de resistência de *Candida* spp. em animais no Estado de Mato Grosso, Centro-oeste, Brasil, demonstrando a necessidade de novos trabalhos para continuidade da compreensão da relação entre estas leveduras e seus hospedeiros.

Palavras-chave: Brasil; Candidíase; Fungo; ITS; Veterinária.

Abstract

Candida spp. are yeasts present in the microbiota of humans and animals, but due to disorders, they can become pathogenic, causing candidiasis. This study aimed to evaluate the diversity of *Candida* species in domestic and wild animals and the antifungal susceptibility profile. A total of 79 isolates were obtained from domestic animals (n=49) and wild animals (n=30) collected from 13 different injury sites. The isolates were previously characterized morphologically and tinctorial and the definitive classification occurred by DNA sequencing of the ITS region. The broth microdilution technique obtained the susceptibility profile with the antifungal agents: caspofungin, fluconazole,

voriconazole, amphotericin B, nystatin, and itraconazole. Twelve different *Candida* species were identified, where *C. rugosa* was the most isolated species (26%, 21/79), followed by *C. parapsilosis* (20%, 16/79) and *C. albicans* (15%, 12/79). The susceptibility profile was evaluated in 30 isolates (10 isolates of *C. glabrata*, ten of *C. tropicalis*, and ten of *C. parapsilosis*), resulting in 100% of the tested isolates being resistant to itraconazole. Still, none of them was resistant to voriconazole. Isolates of *C. tropicalis* were resistant to multiple antifungal agents. These data alerted the worldwide problem of antimicrobial resistance, aggravated by the emergence of strains resistant to multiple drugs. This study is the first study that verified the occurrence and resistance profiles of *Candida* spp. in animals in Mato Grosso State, Midwest, Brazil, encouraging the execution of new works further to understand the relationship between these yeasts and their hosts.

Keywords: Brazil; Candidiasis; Fungus; ITS; Veterinary.

Resumen

Candida spp. son levaduras presentes en la microbiota de humanos y animales, pero debido a trastornos pueden volverse patógenas causando candidiasis. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la diversidad de especies de *Candida* en animales domésticos y salvajes y el perfil de susceptibilidad antifúngica. Se obtuvieron un total de 79 aislamientos de animales domésticos (n=49) y animales salvajes (n=30) recolectados de 13 sitios diferentes de lesión. Los aislamientos fueron previamente caracterizados morfológica y tintorialmente y la clasificación definitiva ocurrió por secuenciación del DNA de la región ITS. El perfil de susceptibilidad se obtuvo mediante la técnica de microdilución en caldo con los agentes antifúngicos: caspofungina, fluconazol, voriconazol, anfotericina B, nistatina e itraconazol. Se identificaron doce especies diferentes de *Candida*, donde *C. rugosa* fue la especie más aislada (26%; 21/79), seguida de *C. parapsilosis* (20%; 16/79) y *C. albicans* (15%, 12/79). El perfil de susceptibilidad se evaluó en 30 aislamientos (10 aislamientos de *C. glabrata*, 10 aislamientos de *C. tropicalis* y 10 aislamientos de *C. parapsilosis*), resultando en 100% de los aislamientos probados resistentes a itraconazol, pero ninguno de ellos fue resistente a voriconazol. Los aislamientos de *C. tropicalis* fueron resistentes a múltiples agentes antifúngicos. Estos datos alertan sobre el problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos, agravado por la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos. Este es el primer estudio que verificó los perfiles de ocurrencia y resistencia de *Candida* spp. en animales en el estado de Mato Grosso, Medio Oeste de Brasil, lo que demuestra la necesidad de seguir trabajando para comprender mejor la relación entre estas levaduras y sus huéspedes.

Palabras clave: Brasil; Candidiasis; Hongo; ITS; Veterinaria.

1. Introdução

As espécies de *Candida* são leveduras amplamente distribuídas e são consideradas como constituintes da microbiota da pele e das mucosas de humanos e animais. Quando as barreiras físicas e/ou imunológicas do hospedeiro estão comprometidas, essas leveduras comensais aproveitam os fatores de virulência produzidos e causam infecções em vários tecidos e órgãos (Kashem & Kaplan, 2016; Zhai et al., 2021).

C. albicans tem sido descrita como a espécie mais prevalente em infecções, no entanto, outras espécies de *Candida* por mecanismos patológicos e epidemiológicos também se destacam pela patogenicidade e apresentam uma resistência emergente a agentes antifúngicos como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Cordeiro et al., 2013; Brillante et al., 2014). Outra preocupação é o surgimento de novas espécies como por exemplo *C. auris* descoberta em 2009 e que se apresenta com distribuição cosmopolita, associada a quadro de doença invasiva com alta mortalidade devido a um alto nível de transmissibilidade, resistência a múltiplas drogas e persistência no ambiente (Vila et al., 2020; Chakrabarti & Singh, 2020).

Indiscutivelmente, o gênero *Candida* possui grande relevância na saúde humana e animal, porém o diagnóstico dessas leveduras laboratorialmente nem sempre é realizado de maneira rápida e precisa, assim o atraso diagnóstico pode aumentar o tempo de tratamento bem como do risco de morte ao paciente (Van de Groep et al., 2018). Dessa forma, técnicas moleculares são uma ferramenta útil para a correta identificação dessas leveduras e para a caracterização de novas espécies. A identificação exata de uma espécie garante também a eficácia dos resultados obtidos no teste de susceptibilidade (Clinical Laboratory and Standards Institute, 2012; Malek, Paluchowska, Bogusz & Budak, 2017; Dudiuk et al., 2017).

Embora a terapia antifúngica para infecções associadas ao gênero *Candida* seja padronizada, a verificação do perfil de susceptibilidade é recomendada devido ao aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos. No entanto, essa técnica nem sempre é realizada na rotina, pelo alto custo, principalmente em países emergentes como o Brasil (Denning & Hope, 2010). No

Brasil, os principais antifúngicos utilizados no tratamento de *Candida* sp. são os azólicos como fluconazol, itraconazol e voriconazol. Estes são antifúngicos de amplo espectro e não apresentam toxicidade pronunciada no hospedeiro. Embora esses compostos sejam amplamente usados, a resistência já foi relatada em isolados de *Candida* de animais selvagens e domésticos (Brilhante et al., 2014; Sidrim et al., 2016).

A diversidade de *Candida* spp. em animais silvestres e domésticos no Brasil, e sua suscetibilidade aos antifúngicos ainda é pouco estudada, o que dificulta o entendimento das espécies e a ocorrência dessas na região, bem como o tratamento mais adequado. O objetivo deste trabalho foi realizar o primeiro estudo de *Candida* spp. em animais domésticos e selvagens no estado de Mato Grosso a fim de verificar a diversidade dessas leveduras e avaliar o perfil de susceptibilidade a antifúngicos.

2. Metodologia

2.1 Comitê de Ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso (Mato Grosso, Brasil), processo número: 23108.161697/2016-67.

2.2 Isolamento

Os isolados foram obtidos de materiais recebidos e processados no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT (Cuiabá, Mato Grosso - Brasil) e foram coletados de 5 espécies de animais domésticos e 11 espécies de animais silvestres. Ao todo, os isolados foram de 13 sítios de coletas, entre eles: pelos, fezes, leite, urina, líquido cavitário, fígado, linfonodos, suabe nasal, suabe ocular, suabe oral, suabe otológico, ingluvío e pulmão. As leveduras foram inicialmente isoladas e caracterizadas morfológica e tintorialmente como *Candida* spp. de acordo com Quinn et al. (2011).

2.3 Extração de DNA

As leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud por 12h a 37°C, com agitação. As culturas (2 mL) foram centrifugadas e os *pellets* ressuspensos em 1mL de tampão de lise (100 mmol de NaCl, 25 mmol de EDTA, 100 mmol de Tris-HCl, pH 8,0 e 0,5% de SDS) contendo 0,05 gramas de pérola de vidro para a extração de DNA genômico de acordo com Del Poeta et al., 1999. O DNA obtido foi ressuspensão em 50µL de água ultrapura, quantificado, diluído a 10ng/µL e armazenado a -20°C até o uso.

2.4 Identificação molecular

O protocolo de amplificação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizou os oligonucleotídeos ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) e ITS5 (5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3) (White, Bruns & Taylor, 1990), que amplificam as regiões ITS1 e ITS2 fúngicas, resultando em um fragmento de aproximadamente 500pb. As reações foram realizadas utilizando o sistema ProFlex PCR (Life Technologies) em um volume final de 25µL [10ng de DNA, 1U de Taq DNA Polimerase (Sigma), 0,2mmol dNTPs, 2,0mmol MgCl₂, 2,5µL de tampão de PCR 10x (200mM Tris - HCl, pH 8,4, 500mmol KCl) e 20pmol de cada oligonucleotídeo].

Os parâmetros dos ciclos de PCR foram: 95°C durante 10 min; seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s, 53°C por 30s e 72°C por 30s; com uma extensão final a 72°C por 5min. Água ultrapura foi usada como controle negativo, e DNA de *C. glabrata*, confirmado por sequenciamento, foi usado como controle positivo. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1,0%) a 10 V/cm, corados com GelRed (Biotium) e visualizados usando fotodocumentador ChemiDoc XRS com o

software ImageLab. Posteriormente, foram purificados usando o kit GFX PCR DNA (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram sequenciadas usando um sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems), também de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas na base de dados de DNA usando o programa BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). As seqüências obtidas foram depositadas no GenBank sob a identificação MF797705 a MF797783.

2.5 Teste de susceptibilidade

A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliar a suscetibilidade *in vitro* aos seguintes antifúngicos com as respectivas faixas de concentração utilizadas em nove diluições em série: caspofungina (0,00781 a 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$), fluconazol (0,25 a 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$), voriconazol (0,00781 a 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$), anfotericina B (0,0625 a 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$), nistatina (0,25 a 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e itraconazol (0,03125 a 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Os isolados foram cultivados em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose, incubados a 35°C por 24h e ressuspensos em 5mL de solução salina estéril na concentração de 0,85%. A suspensão resultante foi agitada em vórtex durante 15 segundos e as densidades celulares, ajustadas com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5, em comprimento de onda de 530nm. A suspensão-padrão foi ajustada para 1x10⁶ a 5x10⁶ células por mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de 1,5 \pm 1,0x10³ células por mL.

O teste de microdiluição foi realizado em placas estéreis, descartáveis, com 96 poços. Alíquotas dos antifúngicos (duas vezes concentradas) serão dispensados na primeira coluna, e a diluição seriada foi realizada em volumes de 100 μl com pipeta multicanal a partir da segunda coluna (2 a 10). As fileiras 11 e 12 representaram, respectivamente, os controles negativos e positivos. Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado com 100 μL da correspondente suspensão do inóculo. Os poços de controle de crescimento (controles positivos) continham 100 μL de meio estéril, isento de antifúngicos, inoculados com 100 μL das suspensões dos inóculos.

As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C e as concentrações inibitórias mínimas determinadas após 24 e 48h de incubação. A leitura foi realizada com base na inibição do crescimento do fungo, comparado ao seu controle positivo. Para interpretação dos resultados foram considerados os critérios definidos nos protocolos internacionais M27-A3 e M27-S3, ambos especificados pelo Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2012) (Inácio et al., 2021). Os valores de referência utilizados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Interpretação dos valores da Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos testados.

Espécies de <i>Candida</i>	Antifúngico	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)		
		Susceptibilidade	SDD	Resistência
<i>C. glabrata</i>	Casposfungina	$\leq 0,125$	0,25	$\geq 0,5$
	Fluconazol	≤ 8	16-36	≥ 64
	Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4
	Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 1
	Nistatina	≤ 8	16-36	≥ 64
	Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1
<i>C. parapsilosis</i>	Casposfungina	≤ 2	4	≥ 8
	Fluconazol	≤ 2	4	≥ 8
	Voriconazol	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
	Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 1
	Nistatina	≤ 8	16-32	≥ 64
	Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1
<i>C. tropicalis</i>	Casposfungina	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1
	Fluconazol	≤ 2	4	≥ 8
	Voriconazol	$\leq 0,125$	0,5	≥ 1
	Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 1
	Nistatina	≤ 8	16-32	≥ 64
	Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1

SDD = Sensível Dose Dependente. Fonte: Autores adaptado de Clinical e Laboratory Standards Institute (CLSI).

2.6 Análise estatística

A associação entre os sítios de coleta e o isolado de *Candida* spp. foram avaliados pelo teste Qui-quadrado, por meio do Software R (R-3.0.2). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

No total, 79 isolados de *Candida* foram obtidos, a maioria deles (62%; 49/79) eram de animais domésticos e 38% (30/79) eram de animais selvagens. Os hospedeiros com os respectivos sítios de lesão e as espécies de *Candida* isoladas estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Lista completa das espécies de *Candida* isoladas com seus respectivos hospedeiros e sítio de coleta.

Número da amostra	Hospedeiro – Nome Científico	Hospedeiro - Nome popular	Sítio de coleta	Espécie de <i>Candida</i> isolada
1	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	Fezes	<i>Candida glabrata</i>
2	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-preto	Pulmão	<i>Candida glabrata</i>
3	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul-grande	Suabe oral	<i>Candida parapsilosis</i>
4	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul-grande	Suabe oral	<i>Candida parapsilosis</i>
5	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul-grande	Pulmão	<i>Candida glabrata</i>
6	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul-grande	Suabe oral	<i>Candida albicans</i>
7	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Leite	<i>Candida rugosa</i>
8	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Leite	<i>Candida rugosa</i>
9	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Leite	<i>Candida rugosa</i>
10	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Suabe otológico	<i>Candida parapsilosis</i>
11	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Suabe otológico	<i>Candida orthopsilosis</i>
12	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Fígado	<i>Candida glabrata</i>
13	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Fígado	<i>Candida tropicalis</i>
14	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Leite	<i>Candida tropicalis</i>
15	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Leite	<i>Candida parapsilosis</i>
16	<i>Bos taurus</i>	Bovino	Leite	<i>Candida rugosa</i>
17	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe nasal	<i>Candida parapsilosis</i>
18	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Pelo	<i>Candida parapsilosis</i>
19	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida tropicalis</i>
20	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
21	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
22	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe oral	<i>Candida tropicalis</i>
23	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Pelo	<i>Candida albicans</i>
24	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida albicans</i>
25	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida glabrata</i>
26	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Pelo	<i>Candida glabrata</i>
27	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida tropicalis</i>
28	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
29	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
30	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
31	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
32	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Pelo	<i>Candida parapsilosis</i>
33	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
34	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
35	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Fezes	<i>Candida albicans</i>
36	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Líquido cavitário	<i>Candida glabrata</i>
37	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
38	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
39	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Linfonodo	<i>Candida albicans</i>
40	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida parapsilosis</i>

41	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida parapsilosis</i>
42	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
43	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Urina	<i>Candida parapsilosis</i>
44	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
45	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida parapsilosis</i>
46	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
47	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida tropicalis</i>
48	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida parapsilosis</i>
49	<i>Canis lupus familiaris</i>	Cachorro	Suabe otológico	<i>Candida rugosa</i>
50	<i>Cariama cristata</i>	Seriema	Suabe otológico	<i>Candida heveicola</i>
51	<i>Equus caballus</i>	Cavalo	Pelo	<i>Candida parapsilosis</i>
52	<i>Equus caballus</i>	Cavalo	Fígado	<i>Candida rugosa</i>
53	<i>Felis catus</i>	Gato	Suabe nasal	<i>Candida parapsilosis</i>
54	<i>Felis catus</i>	Gato	Pelo	<i>Candida haemulonii</i>
55	<i>Felis catus</i>	Gato	Suabe ocular	<i>Candida parapsilosis</i>
56	<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado catingueiro	Pulmão	<i>Candida pararugosa</i>
57	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	Suabe oral	<i>Candida albicans</i>
58	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	Suabe oral	<i>Candida albicans</i>
59	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Fezes	<i>Candida rugosa</i>
60	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Suabe oral	<i>Candida quercitrusa</i>
61	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Fezes	<i>Candida tropicalis</i>
62	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Fezes	<i>Candida tropicalis</i>
63	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Fezes	<i>Candida tropicalis</i>
64	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Pelo	<i>Candida albicans</i>
65	<i>Nasua nasua</i>	Quati	Líquido cavitário	<i>Candida metapsilosis</i>
66	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Inglúvio	<i>Candida glabrata</i>
67	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Fezes	<i>Candida glabrata</i>
68	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Fezes	<i>Candida albicans</i>
69	<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Fezes	<i>Candida albicans</i>
70	<i>Ovis aries</i>	Ovelha	Fezes	<i>Candida albicans</i>
71	<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	Suabe oral	<i>Candida orthopsilosis</i>
72	<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	Suabe oral	<i>Candida michaelii</i>
73	<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	Suabe oral	<i>Candida albicans</i>
74	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Peixe pintado	Fezes	<i>Candida glabrata</i>
75	<i>Rhea americana</i>	Ema	Fezes	<i>Candida glabrata</i>
76	<i>Spizaetus melanoleucus</i>	Gavião-pato	Suabe oral	<i>Candida rugosa</i>
77	<i>Spizaetus melanoleucus</i>	Gavião-pato	Fezes	<i>Candida tropicalis</i>
78	<i>Spizaetus melanoleucus</i>	Gavião-pato	Fezes	<i>Candida tropicalis</i>
79	<i>Spizaetus melanoleucus</i>	Gavião-pato	Fezes	<i>Candida parapsilosis</i>

Fonte: Autores.

Os isolados foram classificados em 12 espécies diferentes com base na análise da região ITS (Tabela 3). *C. albicans* representou 15% (12/79) dos isolados e as espécies não-*albicans* representaram 85% (67/79). *C. rugosa* foi a espécie mais frequentemente isolada de animais domésticos (39% dos isolados; 19/49), seguida por *C. parapsilosis* (26%; 13/49). Em animais silvestres, as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (23%; 7/30) e *C. glabrata* (23%; 7/30).

Tabela 3. Frequência das diferentes espécies de *Candida* obtidas das amostras de animais domésticos e silvestres.

Espécie de <i>Candida</i>	Animais domésticos (n=49)	Animais silvestres (n=30)	Total
<i>C. rugosa</i>	19	2	21
<i>C. parapsilosis</i>	13	3	16
<i>C. albicans</i>	5	7	12
<i>C. glabrata</i>	4	7	11
<i>C. tropicalis</i>	6	5	11
<i>C. orthopsilosis</i>	1	1	2
<i>C. haemulonii</i>	1	0	1
<i>C. leveicola</i>	0	1	1
<i>C. metapsilosis</i>	0	1	1
<i>C. michaeli</i>	0	1	1
<i>C. pararugosa</i>	0	1	1
<i>C. quercitrusa</i>	0	1	1

n: Número total. Fonte: Autores.

Foi observada associação estatística significativa entre os locais de isolamento e as espécies de *Candida*. *C. rugosa* foi a espécie mais frequentemente detectada em suabes otológicas (54%; 14/26) e leite (57%; 4/7). *C. tropicalis* foi a espécie mais comumente isolada nas fezes (35%; 5/14) e *C. albicans* em suabes orais (33%; 4/12). Ao considerar o local de isolamento e as espécies de *Candida* de animais selvagens, foi observada associação estatística, sendo a *C. tropicalis* mais comum nas fezes (38%; 5/13); *C. albicans* em suabes orais (40%; 4/10) e *C. glabrata* de pulmão (66%; 2/3). Dos isolados testados, 100% foram resistentes ao itraconazol e nenhuma resistência ao voriconazol foi observada.

Nos isolados de *C. glabrata* não foi observada resistência aos antifúngicos: caspofungina, fluconazol, voriconazol e nistatina; onde as maiores taxas de susceptibilidade obtidas foram para caspofungina 90% (9/10) e voriconazol (100%; 10/10). Na avaliação de *C. parapsilosis*, os isolados apresentaram no teste de susceptibilidade maior susceptibilidade a caspofungina (100%; 10/10) e voriconazol e anfotericina B (90% em ambos os casos; 9/10). Todos os isolados de *C. tropicalis* foram resistentes à caspofungina e itraconazol (100%; 10/10) e 50%; (5/10) ao fluconazol e à anfotericina B, apresentando, portanto, um perfil medicamentoso multirresistente. Os dados de suscetibilidade antifúngica obtidos estão agrupados na Tabela 4.

Tabela 4 – Perfil de suscetibilidade *in vitro* de *Candida* spp. obtidas aos antifúngicos testados.

Espécies de <i>Candida</i>	Antifúngicos																	
	Caspofungina			Fluconazol			Voriconazol			Anfotericina B			Nistatina			Itraconazol		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C. glabrata</i> (n=10)	9	1	-	2	8	-	10	-	-	7	-	3	4	6	-	-	-	10
<i>C. parapsilosis</i> (n=10)	10	-	-	8	1	1	9	1	-	9	-	1	4	6	-	-	-	10
<i>C. tropicalis</i> (n=10)	-	-	10	5	-	5	10	-	-	5	-	5	4	5	1	-	-	10
Total	19	1	10	15	9	6	29	1	0	21	0	9	12	17	1	-	-	30

S: Sensível; SDD: Sensível dose dependente; R: Resistente; n: Número total. Fonte: Autores.

4. Discussão

O gênero *Candida* é um dos mais importantes causadores de infecções fúngicas em animais (Dworecka-Kaszak, Biegańska & Dąbrowska, 2020). No entanto, as informações sobre a distribuição dessas leveduras em animais domésticos e silvestres no Brasil são escassas. A grande diversidade genética de espécies desse gênero dificulta o diagnóstico laboratorial e, consequentemente, o tratamento adequado e eficaz (Nejad et al., 2020).

C. albicans é a espécie de *Candida* mais comum em humanos (Araújo, Lopes & Cruz, 2020) e animais (Sidrim et al., 2016). A análise de sequenciamento da região ITS realizada no presente estudo revelou que foi a terceira espécie mais isolada (15% de todos os isolados; 12/79); *C. rugosa* foi a espécie mais frequentemente isolada (26%; 21/79), seguida por *C. parapsilosis* (20,2%; 16/79). Entretanto, entre os isolados de *Candida* de animais silvestres, *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente encontrada, junto com *C. glabrata* (23% em ambos os casos; 7/30).

Alguns estudos em humanos já foram realizados no estado de Mato Grosso, Brasil. Um deles avaliou a diversidade de espécies do gênero *Candida* isoladas de diferentes sítios anatômicos de militares, onde *C. albicans* foi a espécie mais frequente (34,4% das amostras), seguida por *C. parapsilosis* (20,25%) e *C. tropicalis* (13,9%). Isolados de *C. rugosa* não foram detectados neste estudo (Leite-Junior et al., 2011). Outro estudo realizado no estado avaliou a etiologia de candidíases nosocomiais, onde foi observado que *C. albicans* também foi a espécie mais identificada com 39,09% dos casos (Yamamoto et al., 2012).

Como já foi evidenciado, a colonização de animais e humanos nesta região do Brasil por *Candida* spp. não segue o mesmo padrão, pois no presente estudo a espécie mais frequentemente isolada foi *C. rugosa*, seguida de *C. parapsilosis*. Pode-se também concluir que existe um envolvimento cada vez maior de espécies não-*albicans* nas infecções; isso, por sua vez, sugere sua patogenicidade crescente devido a formação de biofilmes e aumento da resistência aos antifúngicos, expandindo a capacidade de infectar e permanecer no hospedeiro (El-Kholy et al., 2021).

Em análises moleculares de *Candida* spp. realizados com isolados veterinários realizados na Universidade de Cornell (Ithaca, NY, EUA), *C. albicans* foi a espécie mais detectada (17% de todos os isolados); entretanto, outras espécies desse gênero, quando combinadas, representaram um percentual maior de 83%, apontando também para um aumento na incidência de espécies de *Candidas* não-*albicans* (Garner, Starr, McDonough & Altier, 2010).

A observação de que *C. rugosa* foi a espécie mais encontrada no presente estudo pode estar associada por ter se tornado um patógeno emergente em humanos capazes de produzir fatores de virulência como as enzimas proteinase, esterase, hemolisina e biofilme (Singh et al., 2016; Peremalo et al., 2019) e em animais, está principalmente associada à mastite. *C. rugosa* já foi reconhecido como agente etiológico de mastite em 14 vacas leiteiras durante um surto de contaminação ambiental sendo isolado também da ração, água e curral, o que demonstrou sua capacidade de sobreviver em diferentes ambientes e,

portanto, de espalhar-se mais facilmente no ambiente (Scaccabarozzi et al., 2011). No entanto, no presente estudo, *C. rugosa* foi associada principalmente a otite (14/21), seguido de mastite (4/21).

C. parapsilosis foi a segunda espécie mais frequentemente identificada neste estudo, encontrada em 20,25% (16/79) dos isolados, e em suabes otológicos em 31,25% (5/16). Está comumente associada à dermatite seborreica e é encontrada nas otites na presença ou ausência de outra levedura, *Malassezia pachydermatis* (Bumroongthai et al., 2016). Além de isolados otológicos, *C. parapsilosis* também foi encontrada em pelos (2/16), cavidade nasal (2/16), leite (2/16) e cavidade oral (2/16), demonstrando sua capacidade de colonizar vários órgãos e tecidos. Da mesma forma que *C. rugosa*, *C. parapsilosis* foi descrita como uma levedura emergente em infecções animais (Cordeiro et al., 2017).

Para determinação da susceptibilidade antifúngica foram testados 30 isolados, sendo 10 de cada espécie (*C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Essas espécies foram escolhidas por serem espécies não-*albicans* consideradas emergentes em infecções e por estarem entre as mais frequentes, com distribuição semelhante em animais domésticos e silvestres.

O itraconazol é um dos antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidíase em animais, entretanto, todos os isolados testados no presente estudo foram resistentes a esse fármaco. Isso sugere uma resistência emergente a essa droga no gênero *Candida*. Portanto, o teste de susceptibilidade deve ser realizado para indicar qual antifúngico obterá a melhor resposta contra o agente fúngico testado, aumentando assim, a probabilidade de sucesso da terapia farmacológica instituída por meio dos resultados obtidos (Pfaller et al., 2012; Brilhante et al., 2018).

Nenhum dos isolados testados foi resistente ao voriconazol, resultado semelhante encontrado durante a avaliação do perfil de suscetibilidade de isolados de *Candida* do trato genital de fêmeas dromedárias (*Camelus dromedarius*) no Irã (Sharifzadeh, Soltani & Shokri, 2015).

Os isolados de *C. tropicalis* foram resistentes a múltiplos agentes antifúngicos. Essa observação já foi relatada no Nordeste brasileiro e, portanto, deve ser monitorada (Zuza-Alvez et al., 2016). Esta levedura representa um risco para a saúde humana e animal devido ao seu potencial patogênico (Hernández-Chávez et al., 2018) a qual também já foi relatada em surto em uma criação de matrizes suínas com quadro clínico gastrointestinal, que desencadeou a morte de 60% dos animais acometidos (Zhai et al., 2021).

5. Conclusão

Este estudo contribuiu para o entendimento da ocorrência e do perfil de susceptibilidade a antifúngicos de *Candida* spp. no estado de Mato Grosso - Brasil, onde ficou evidente que isolados de animais silvestres e domésticos diferem aos de humanos já descritos por outros autores. A alta resistência ao itraconazol alerta que o tratamento continuado com esse medicamento pode se tornar ineficaz. A resistência a múltiplos fármacos observada em *C. tropicalis* sinaliza para um risco eminente de candidíase sem opções de tratamento. Este é o primeiro estudo de *Candida* spp. em animais no estado de Mato Grosso e encoraja a execução de novas pesquisas relacionadas a verificação da presença de fatores de virulência e acompanhamento do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de espécies de *Candida* em animais domésticos e silvestres como estratégia de entendimento epidemiológico que ajudam a direcionar o correto tratamento.

Referências

- Araújo, I. M., Lopes, L. P. & Cruz, C. M. (2020). Caracterização sistemática da resposta imune à infecção por *Candida*. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(2), 3788-3803. <https://10.34119/bjhrv3n2-203>.
- Brilhante, R., Rodrigues, T., Castelo-Branco, D., Teixeira, C., Macedo, R. B., Bandeira, S. P., Pereira de Alencar, L., Monteiro, A. J., Cordeiro, R. A., Bandeira, T., Moreira, J., Sidrim, J., & Rocha, M. (2014). Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. *Journal of medical microbiology*, 63(Pt 11), 1568–1572. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.076216-0>.

- Bumroongthai, K., Chetanachan, P., Niyomtham, W., Yurayart, C., & Prapasarakul, N. (2016). Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. *Medical mycology*, 54(5), 544–549. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw002>.
- Chakrabarti, A., & Singh, S. (2020). Multidrug-resistant *Candida auris*: an epidemiological review. *Expert review of anti-infective therapy*, 18(6), 551–562. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1750368>.
- Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. (Document M27-S4). 4th Edition. Wayne, PA.
- Cordeiro, R., Bittencourt, P. V., Brillhante, R. S., Teixeira, C. E., Castelo-Branco, D., Silva, S. T., De Alencar, L. P., Souza, E. R., Bandeira, T., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J., & Rocha, M. F. (2013). Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Medical mycology*, 51(7), 731–736. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.777858>.
- Cordeiro, R. A., Sales, J. A., Castelo-Branco, D., Brillhante, R., Ponte, Y. B., Dos Santos Araújo, G., Mendes, P., Pereira, V. S., Alencar, L. P., Pinheiro, A. Q., Sidrim, J., & Rocha, M. (2017). *Candida parapsilosis* complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. *Veterinary microbiology*, 212, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.031>.
- Del Poeta, M., Toffaletti, D. L., Rude, T. H., Dykstra, C. C., Heitman, J., & Perfect, J. R. (1999). Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. *Genetics*, 152(1), 167–178.
- Denning, D. W., & Hope, W. W. (2010). Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in microbiology*, 18(5), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.004>.
- Dudiuk, C., Morales-López, S. E., Podesta, V., Macedo, D., Leonardelli, F., Vitale, R. G., Tosello, M. E., Cabeza, M. S., Biasoli, M., Gamarra, S., & Garcia-Effron, G. (2017). Multiplex PCR designed to differentiate species within the *Candida glabrata* complex. *Revista iberoamericana de micología*, 34(1), 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.04.007>.
- Dworecka-Kaszak, B., Biegańska, M. J., & Dąbrowska, I. (2020). Occurrence of various pathogenic and opportunistic fungi in skin diseases of domestic animals: a retrospective study. *BMC veterinary research*, 16(1), 248. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02460-x>.
- El-Kholy, M. A., Helaly, G. F., El Ghazzawi, E. F., El-Sawaf, G., & Shawky, S. M. (2021). Virulence Factors and Antifungal Susceptibility Profile of *C. tropicalis* Isolated from Various Clinical Specimens in Alexandria, Egypt. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(5), 351. <https://doi.org/10.3390/jof7050351>.
- Garner, C. D., Starr, J. K., McDonough, P. L., & Altier, C. (2010). Molecular identification of veterinary yeast isolates by use of sequence-based analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2140–2146. <https://doi.org/10.1128/JCM.02306-09>.
- Hernández-Chávez, M. J., Franco, B., Clavijo-Giraldo, D. M., Hernández, N. V., Estrada-Mata, E., & Mora-Montes, H. M. (2018). Role of protein phosphomannosylation in the *Candida tropicalis* macrophage interaction. *FEMS yeast research*, 18(5), 10.1093/femsyr/foy053. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy053>.
- Inácio, C. P., Beserra, F. G., Soares, C. R. P., Romaguera, L. M. D., Araújo, P. S. R., Buonafina, M. D. S., Araújo Neto, L. N., Santos, D. C. dos & Neves, R.P. (2021). Epidemiologia e padrões de suscetibilidade antifúngica de espécies de *Candida* em hospitais terciários: Atualização sobre tendências regionais. *Research, Society and Development*. 10, 4 (abr. 2021), e59810414462. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14462>.
- Kashem, S. W., & Kaplan, D. H. (2016). Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends in immunology*, 37(7), 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.007>.
- Leite-Júnior, D. P., Yamamoto, A. C., Martins, E. R., Teixeira, A. F., & Hahn, R. C. (2011). Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Anais brasileiros de dermatologia*, 86(4), 675–680. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000400008>.
- Malek, M., Paluchowska, P., Bogusz, B., & Budak, A. (2017). Molecular characterization of *Candida* isolates from intensive care unit patients, Krakow, Poland. *Revista iberoamericana de micología*, 34(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.005>.
- Nejad, E., Ghasemi Nejad Almani, P., Mohammadi, M. A., & Salari, S. (2020). Molecular identification of *Candida* isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(10), e23444. <https://doi.org/10.1002/jcla.23444>.
- Peremalo, T., Madhavan, P., Hamzah, S., Than, L., Wong, E. H., Nasir, M., Chong, P. P., & Ng, K. P. (2019). Antifungal susceptibilities, biofilms, phospholipase and proteinase activities in the *Candida rugosa* complex and *Candida parugosa* isolated from tertiary teaching hospitals. *Journal of medical microbiology*, 68(3), 346–354. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000940>.
- Pfaller, M. A., Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Castanheira, M., Cuenca-Estrella, M., Diekema, D. J., Fothergill, A., Fuller, J., Ghannoum, M., Jones, R. N., Lockhart, S. R., Martin-Mazuélos, E., Melhem, M. S., Ostrosky-Zeichner, L., Pappas, P., Pelaez, T., Peman, J., Rex, J., & Szeszs, M. W. (2012). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *Journal of clinical microbiology*, 50(6), 2040–2046. <https://doi.org/10.1128/JCM.00248-12>.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. S. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 3 ed. Artmed.
- Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Pisoni, G., Manarolla, G., Casula, A., Bronzo, V., & Moroni, P. (2011). Short communication: Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(9), 4574–4577. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4294>.
- Sharifzadeh, A., Soltani, M., & Shokri, H. (2015). Evaluation of virulence factors and antifungal susceptibility patterns of different *Candida* species isolated from the female camel (*Camelus dromedarius*) genital tract. *Mycoses*, 58(8), 478–484. <https://doi.org/10.1111/myc.12345>.

Sidrim, J. J., Carvalho, V. L., de Souza Collares Maia Castelo-Branco, D., Brilhante, R. S., de Melo Guedes, G. M., Barbosa, G. R., Lazzarini, S. M., Oliveira, D. C., de Meirelles, A. C., Attademo, F. L., da Bôaviagem Freire, A. C., de Aquino Pereira-Neto, W., de Aguiar Cordeiro, R., Moreira, J. L., & Rocha, M. F. (2016). Antifungal Resistance and Virulence Among *Candida* spp. from Captive Amazonian manatees and West Indian Manatees: Potential Impacts on Animal and Environmental Health. *EcoHealth*, 13(2), 328–338. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1090-8>.

Singh, R. I., Xess, I., Mathur, P., Behera, B., Gupta, B., & Misra, M. C. (2011). Epidemiology of candidaemia in critically ill trauma patients: experiences of a level I trauma centre in North India. *Journal of medical microbiology*, 60(Pt 3), 342–348. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023739-0>.

Van de Groep, K., Bos, M. P., Savelkoul, P., Rubenjan, A., Gazenbeek, C., Melchers, W., van der Poll, T., Juffermans, N. P., Ong, D., Bonten, M., Cremer, O. L., & MARS consortium (2018). Development and first evaluation of a novel multiplex real-time PCR on whole blood samples for rapid pathogen identification in critically ill patients with sepsis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(7), 1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3255-1>.

Vila, T., Montelongo-Jauregui, D., Ahmed, H., Puthran, T., Sultan, A. S., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). Comparative Evaluations of the Pathogenesis of *Candida auris* Phenotypes and *Candida albicans* Using Clinically Relevant Murine Models of Infections. *mSphere*, 5(4), e00760-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00760-20>.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In PCR Protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*. 315-322.

Yamamoto, A. C., de Paula, C. R., Dias, L. B., Tadano, T., Martins, É. R., Amadio, J. V., & Hahn, R. C. (2012). Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá--Mato Grosso, Brazil. *Revista iberoamericana de micologia*, 29(3), 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.01.001>.

Zhai, L., Zhou, Y., Wu, Y., Jin, Y., Zhu, Q., Gao, S., Li, X., Sun, Z., Xiao, Y., Huang, B., & Tian, K. (2021). Isolation and identification of *Candida tropicalis* in sows with fatal infection: a case report. *BMC veterinary research*, 17(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02821-0>.

Zuza-Alves, D. L., de Medeiros, S. S., de Souza, L. B., Silva-Rocha, W. P., Francisco, E. C., de Araújo, M. C., Lima-Neto, R. G., Neves, R. P., Melo, A. S., & Chaves, G. M. (2016). Evaluation of Virulence Factors *In vitro*, Resistance to Osmotic Stress and Antifungal Susceptibility of *Candida tropicalis* Isolated from the Coastal Environment of Northeast Brazil. *Frontiers in microbiology*, 7, 1783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01783>.