

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINARIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da virulência *in vitro* de *Candida* spp (BERKHOUT, 1923)
isoladas de orofaringe de *Struthio camelus* (LINNAEUS, 1758)**

FELIPE VICTÓRIO DE CASTRO BATH

2009



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

**Avaliação da virulência *in vitro* de *Candida* spp (BERKHOUT, 1923)
isoladas de orofaringe de *Struthio camelus* (LINNAEUS, 1758)**

FELIPE VICTÓRIO DE CASTRO BATH

Sob a Orientação do Professor Doutor
Francisco de Assis Baroni

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre**, no Programa de
Pós-graduação em Microbiologia
Veterinária da UFRRJ.

Seropédica, RJ
Março de 2009

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

FELIPE VICTÓRIO DE CASTRO BATH

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/03/2009.

Francisco de Assis Baroni, Dr, UFRRJ

Claudete Rodrigues Paula, Dra, ICB - USP

Reinaldo Bolognini Orsi, Dr, Universidade Paulista

Sergio Gaspar de Campos, Dr, UFRRJ

Fernando Augusto Curvello, Dr, UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais, pelo apoio incondicional em minha vida, respeito e confiança, que mesmo nos piores momentos estiveram ao meu lado. Obrigado por permitirem que meu sonho tenha se realizado e concluir esta etapa em minha vida.

A Caroline Fagundes Tarcitano, minha noiva, que participa cada dia contribuindo e compartilhando comigo minhas angústias e felicidades. Esperamos muito por esse momento, construído por companherismo e dedicação. Obrigado por estar sempre ao meu lado todos esses anos, me abraçando nos momentos de tristeza e comemorando as alegrias.

Ao Professor Francisco de Assis Baroni, que felizmente está em minha vida desde o quarto período da graduação e me trouxe para o maravilhoso mundo da microbiologia, quando tímido e acanhado fui conversar com ele com três folhas de papel na mão dizendo que era meu projeto e que queria trabalhar com avestruzes. O tempo passou e conquistamos juntos uma bolsa de pesquisa que seria renovada posteriormente. Quem diria que aquele garoto insistente se tornaria mestre!? Obrigado pela forma como conduziu sua orientação, me cobrando resultados, mas sempre disposto a tirar as minhas dúvidas com bom humor e sabedoria. Você é um professor como poucos, presente e participante, nos agraciando com pensamentos rápidos e soluções práticas. Obrigado por também perceber que problemas pessoais, algumas vezes, interferiram na minha postura profissional e acadêmica, mas que não foram capazes de fazê-lo desacreditar em mim. Agradeço ainda pelas palavras de incentivo e preocupação, acreditando que posso ir mais longe. Com certeza você participou ativamente e deu o seu toque de magia na formação de meu caráter.

Não poderia deixar de agradecer também ao meu amigo Sergio Gaspar, que foi meu orientador de estágio na microbiologia e entre algumas broncas e inúmeros churrascos foi

sensacional no meu aprendizado. Só tenho a elogiar essa pessoa fantástica. Você foi a primeira pessoa que apostou em mim e que acreditou que eu podia chegar onde estou. Com certeza quando unia a turma 2001-II B, era um momento especial.

Agradeço ao meu amigo Raphael Scherer, para o qual, simplesmente não tenho palavras para descrever e ao seu pai Paulo Scherer, que deixou migalhas de pão para eu poder achar o meu caminho.

Agradeço ao Pablo Waldeck, meu grande colega de laboratório. Agradeço aos estagiários, bolsistas e colaboradores do laboratório que participaram deste projeto. Agradeço ainda ao Felipe Lopes Campos e Juan Rojas Pereira, hoje mestres em microbiologia veterinária.

Agradeço em especial ao Professor Marcelo Abidu que colaborou na minha formação profissional e pessoal. Agradeço ainda aos amigos e colegas que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

O Tempo Não Pára - Cazuza
Composição: Cazuza / Arnaldo Brandão

Disparo contra o sol. Sou forte, sou por acaso. Minha metralhadora cheia de mágoas. Eu sou um cara. Cansado de correr na direção contrária. Sem pódio de chegada ou beijo de namorada. Eu sou mais um cara. Mas se você achar que eu tô derrotado. Saiba que ainda estão rolando os dados. Porque o tempo, o tempo não pára..

BIOGRAFIA

Felipe Victorio de Castro Bath, filho de Paulo Sérgio Bath e Solange Victório de Castro, natural do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, nasceu no dia 09 de maio de 1983. Coursou o 1º grau, inicialmente no “Jardim Escola Educandário Sagrada Família” (Rio de Janeiro-RJ) e posteriormente no “Colégio Adriano” e “Colégio Nossa Senhora da Ressureição” (Rio de Janeiro-RJ). Ingressou no 2º grau no “Colégio MV1”, onde concluiu e foi bolsista pelos 3 anos do ensino médio.

Em 2001 deu início à graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, colando grau em novembro de 2006.

Ingressou no “Programa de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária” da mesma universidade em que cursou a graduação, no ano de 2007, onde sob a orientação do Professor Doutor Francisco de Assis Baroni, desenvolveu o presente trabalho.

SUMARIO

0. Introdução.....	12
1. Revisão de Literatura.....	14
1.1 <i>Candida</i> spp.....	14
1.1.1 Ecologia	17
1.1.2 Epidemiologia.....	19
1.1.3 Patogenia nos Animais.....	20
1.1.4 Fatores Relacionados a Virulência.....	23
1.1.4.1 Proteinases.....	24
1.1.4.2 Fosfolipases.....	26
1.2 <i>Struthio camelus</i>	27
2. Objetivos.....	32
3. Material e Métodos.....	33
3.1 Locais.....	33
3.2 Obtenção das amostras.....	35
3.3 Processamento das amostras e isolamento.....	38
3.3.1 Swabs.....	38
3.4 Leitura dos isolamentos.....	39
3.5 Identificação das amostras isoladas.....	40
3.6 Fatores Relacionados a Virulência.....	41
3.6.1 Produção de fosfolipase.....	41
3.6.2 Produção de protease.....	43
3.7 Preservação das amostras.....	44
4. Resultados e Discussão.....	45
4.1 Fatores Relacionados a Virulência.....	50
5. Conclusões.....	57
6. Referências Bibliográficas.....	58
7. Anexos.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Atividade enzimática de protease e fosfolipase padronizadas de acordo com PRICE et al., 1982.....	42
Tabela 2: Número de amostras e tipo de crescimento fúngico de acordo com os grupos de avestruzes estudados.....	46
Tabela 3: Número de amostras por leveduras isoladas de acordo com os grupos de avestruzes envolvidos.....	47
Tabela 4: Resultados da produção das enzimas proteases e fosfolipases de amostras de leveduras isoladas da orofaringe de avestruzes.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista parcial dos animais reprodutores no criatório de avestruzes localizado no município de Itaboraí-RJ.....	34
Figura 2: Vista parcial dos animais jovens, com idade compreendida entre 3 e 6 meses no criatório de avestruzes localizado no município de Magé-RJ.....	34
Figura 3: Avestruz fêmea jovem, com aproximadamente 18 meses, contida com o "capuz".....	36
Figura 4: Contenção manual de um filhote, macho, de aproximadamente 2 meses de idade	36
Figura 5 e 6: Coleta de material	37
Figura 7: Orofaringe do animal.....	37
Figuras 8 e 9: Colônias emergentes no isolamento primário a 37°C.....	38
Figura 10: Exame micromorfológico. Evidenciação de células leveduriformes, utilizando-se técnica de nigrosina. Aumento de 400x.....	39
Figuras 11 e 12: Amostra semeada em Ágar Fosfolipase.....	42

RESUMO

BATH, FELIPE VICTÓRIO DE CASTRO. **AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA *IN VITRO* DE *Candida* spp (BERKHOUT,1923) ISOLADAS DE OROFARINGE DE *Struthio camelus* (LINNAEUS, 1758)**. 2009. 73p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

O objetivo deste trabalho foi verificar o percentual de *Candida* spp em orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) e avaliar a virulência *in vitro* das espécies isoladas. A motivação para esta pesquisa deveu-se ao fato do avestruz ser uma espécie exótica e pelo não conhecimento do potencial de microrganismos que esta possui. Os animais foram divididos em quatro grupos, totalizando 80 amostras. A pesquisa da presença do agente nos *swabs* oriundos das aves foi feita no Lab. de Leveduras. Patogênicas e Ambientais, Depto de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV, UFRRJ, por processamento dos mesmos, com semeadura em meio de cultivo ágar Sabouraud dextrose. As confirmações de isolamento foram realizadas por meio de testes de macromorfologia, micromorfologia, realização de auxanograma, zimograma e provas complementares. Do total de amostras processadas da orofaringe, 32,5% obtiveram crescimento leveduriforme, único ou acompanhado de fungos filamentosos. O crescimento de *C. albicans* correspondeu a 65,38% do total de isolados leveduriformes. A maioria dos isolados foi fortemente positiva para produção de protease e aproximadamente metade destas amostras também mostraram-se positivas para a produção de fosfolipases o que sugere a alta virulência destas amostras.

Palavras chave: *Candida*, avestruzes, virulência.

ABSTRACT

BATH, FELIPE VICTÓRIO DE CASTRO. **EVALUATION OF THE VIRULENCE *IN VITRO* OF *Candida* spp (BERKHOUT, 1923) ISOLATED OF OROPHARYNX OF *Struthio camelus* (LINNAEUS, 1758).** 2009. 73p. Dissertation (Master in Veterinarian Microbiology). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

The objective of this work was checked *Candida's* percentage spp in oropharynx of ostriches (*Struthio camelus*) and he valued *in vitro* the virulence of the isolated strains. The motivation for this research was due to the fact of the ostrich be exotic sorts and for the ignorance of the potential microorganisms that this one has. The animals were divided in four groups, totalizing 80 samples. The research of the presence of the agent in *swabs* originating from the birds was done in the Laboratory of Patogenic Yeasts and You set, Depto of Microbiology and Imunology Veterinary, Institute of Veterinary, UFRRJ, for processing of same, with sowings in environment of cultivation on Sabouraud dextrose agar. The confirmation of isolations were carried out through tests of macromorphology, micromorphology, realization of auxanogram, zimogram and complementary proofs. Of the total of samples of the oropharynx, 32,5 % obtained growth with yeasts, only or accompanied by moulds. The growth of *C. albicans* corresponded to 65,38 % of the total of isolates. The most of the isolated ones were strongly positive for production of protease and approximately also they showed half of these positive samples for the production of phospholipases what suggests some degree of virulence of these strains.

Key Words: *Candida*, ostriches, virulence.

INTRODUÇÃO

A criação de avestruzes (*Struthio camelus*), inicialmente como atividade comercial para produção de plumas, teve início no século XIX, sendo que nos últimos 20 anos houve um grande interesse mundial pela produção de carne de alta qualidade, plumas e couro (SOTIRAKI et al., 2001; GORDO et al., 2002).

A carne de avestruz é considerada uma alternativa de carne vermelha, sendo atraente em virtude de seu alto valor protéico, porém com baixo teor de lipídios e perfil em ácidos graxos saturados, representando assim, uma vantagem para o consumidor em relação à prevenção de doenças cardiovasculares (SANTOS, 1999; GIANNONI et al. 2005).

Os avestruzes sofreram, durante milhares de anos, uma enorme pressão de seleção natural, fazendo com que sua adaptabilidade a ambientes diversos, possibilitasse seu desenvolvimento no continente africano, gerando um grau de rusticidade pouco visto em outros animais de criação racional (WALLACH & BOEVER, 1983). Estes animais, porém, desenvolveram todo seu potencial adaptativo para sobreviver em uma das regiões mais inóspitas do mundo, onde as médias pluviométricas giram em torno dos 300 milímetros por ano, onde a escassez de alimentos é quase absoluta e as médias de temperatura ambiental sofrem variações enormes entre os dias e as noites (CARRER et al., 2004).

O interesse despertado pela estrutiocultura, sobretudo nos últimos anos, exige que se deva conhecer melhor o ambiente originário dessas aves, de forma a possibilitar a real avaliação do potencial de adaptação desta espécie em nossas condições e proporcionar que os criadouros sejam instalados em locais com maior chance de sucesso, preferindo-se as áreas onde as condições ambientais não sejam restritivas para os animais.

Os avestruzes ainda mantem acentuada vinculação às condições ambientais silvestres da sua origem, por não terem sofrido forte seleção genética, voltada para o manejo zootécnico. Portanto, o ambiente tem grande influência na determinação de aspectos ligados ao desempenho produtivo, sobretudo na reprodução e criação de filhotes e animais jovens.

Considera-se de grande importância o manejo e a administração de medicamentos na criação de avestruzes. Os antimicrobianos usados são os mesmos indicados para outras espécies de aves, mas, por vezes, necessita-se de doses maiores ou outros medicamentos, os quais devem ser utilizados com cuidado. Sempre é recomendável o isolamento do agente envolvido e a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos, sendo que, este último poderá ser definitivo no tratamento correto e eficiente (SANTOS et al., 2007).

Na produção animal, os antimicrobianos têm sido utilizados como aditivos em ração para proporcionarem maior desenvolvimento e, conseqüentemente, para atuarem como promotores de crescimento e na prevenção ou tratamento de doenças específicas, administrados por via parenteral, oral ou misturados às rações (VALLE, 1985).

A epidemiologia faz-se um instrumento importante para a abordagem preventiva e racional bem como para o controle dessas infecções. Como é documentado, são várias as deficiências na habilidade de prevenção, diagnóstico precoce e preciso, bem como no tratamento das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*. Poucos são os relatos sobre patogenicidade e epidemiologia. Seguindo-se uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais, o presente projeto visou determinar a frequência de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* em orofaringe de avestruzes, assim como avaliar *in vitro* o grau de virulência das espécies de *Candida* isoladas, através da análise de produção de fosfolipase e de protease.

1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1- *Candida* spp.

Atualmente, o gênero *Candida* possui aproximadamente 200 espécies, 17 das quais de interesse clínico (KURTZMAN & FELL, 1998; COLOMBO et al., 1999). Dessas espécies, apenas três ou quatro são responsáveis por mais de 90% das ocorrências denominadas candidíases. O estado teleomórfico (sexual) foi descrito para diversas destas espécies que na maioria das vezes apresentam-se ascospóridas (CALDERONE et al., 2000).

Candida albicans foi observada pela primeira vez em 1839 por Langenbeck em aftas de um paciente com tifo (CALDERONE & FONZI, 2001). Esta levedura já possuiu mais de 111 denominações diferentes, tendo sido transferida para o gênero *Candida* em 1923 por Berkhout (KURTZMAN & FELL, 1998). A sinonímia para *Candida albicans* inclui: *Oidium albicans*, *Saccharomyces albicans*, *Monilia albicans*, *Monilia alba*, dentre dezenas de outras denominações atualmente sem uso.

A candidíase constitui-se em um grande problema de saúde pública por ser a *Candida* spp um dos principais agentes envolvidos com infecção nosocomial, estando diretamente relacionada à contaminação extrínseca ou intrínseca de soluções de irrigação, de artigos médicos, de sistemas de suporte à vida e às tecnologias hospitalares, bem como do contato manual dos profissionais de saúde. As candidíases respondem por cerca de 80 % das infecções fúngicas hospitalares e por um número substancial de consultas médicas ambulatoriais relacionadas a pacientes que desenvolvem quadros de candidíases cutâneas, orofaríngeas e, sobretudo, candidíase vulvovaginal (FRIDKIN & JARVIS, 1996). Infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp são

uma das maiores causas de enfraquecimento generalizado e mortalidade de pacientes imunodeficientes (PFALLER, 1995; COLOMBO et al., 1999).

O gênero *Candida* apresenta capacidade assimilatória oxidativa e fermentativa, por meio das quais se torna apta a utilizar uma variedade de substâncias orgânicas (BODEY, 1988). Estas leveduras encontram-se hoje separadas em 12 grupos fisiológicos, de acordo com a assimilação de determinadas substâncias como açúcares e fontes de nitrogênio, e também de acordo com outros aspectos fisiológicos. A maioria das espécies de interesse clínico encontra-se alocada no grupo VI (KURTZMAN & FELL, 1998).

Na reprodução assexuada multiplicam-se, a maioria, por brotamentos multilaterais. As células são globosas, elipsóides ou cilíndricas. Ocasionalmente, algumas espécies apresentam formas como ogivas, triangulares e lunadas (MURRAY, 1999).

Dependendo das espécies, pseudohifas e hifas verdadeiras podem ser formadas, porém não formam artroconídeos. Com relação à sua fisiologia, podem fermentar açúcares e durante o seu crescimento, podem formar películas, se cultivadas em meio líquido. De modo diferente de algumas leveduras, compostos extracelulares semelhantes a amido não são produzidos durante cultivo. É uma levedura com reação negativa para a reação do azul de diazônio B e para a prova de produção de urease. Existem espécies assimiladoras do inositol (KURTZMAN & FELL, 1998).

A composição da parede celular de leveduras e micélios apresenta diferenças quantitativas. A forma micelial apresenta maior quantidade de quitina (cerca de 2,7 a 21%) ao passo que a forma de levedura contém 0,7 a 9% dessa substância. Essa última porém é mais rica em proteínas. Alguns autores também demonstraram que o componente lipídico nas formas de leveduras são encontrados em menores quantidades, quando comparado com a forma micelial (BODEY, 1988; CALDERONE & FONZI, 2001).

Em condições especiais, *in vitro*, algumas espécies, tais como *Candida albicans*, podem produzir clamidoconídeos, estruturas de resistência formadas por uma parede celular grossa e citoplasma condensado, quando a levedura encontra-se em condições de crescimento desfavorável (HAYNES, 2001).

De acordo com POLAK (1992), é grande o polimorfismo clínico decorrente da ação patogênica de *Candida albicans*. Pode a doença assumir, desde formas clínicas localizadas, tais como estomatite, até formas graves, de doença generalizada, existindo entre esses extremos toda uma gama de configurações clínicas. As candidíases interessam, pois, a profissionais que militam no âmbito de diversas especialidades. Cumpre salientar que, além de apresentar outras localizações, as lesões de candidíase podem instalar-se em qualquer região do tegumento cutâneo ou das superfícies mucosas, assim envolvendo, notadamente, aspectos dermatológicos e estomatológicos.

A possibilidade de identificar as espécies e avaliar seu grau de virulência é um fator importante no desenvolvimento de medidas de prevenção e controle das candidíases. Acompanhando o aumento das infecções fúngicas, alguns novos agentes antifúngicos menos tóxicos aos seres humanos e animais e sistematicamente mais ativos estão sendo desenvolvidos, aumentando as possibilidades terapêuticas, porém tornando a decisão de usá-los cada vez mais difícil pela possível seleção de cepas resistentes (GIUSIANO, 1999).

1.1.1- ECOLOGIA

O habitat natural das várias espécies de *Candida* é bastante amplo, estando ligado a várias espécies animais investigadas, como as domésticas, uma variedade de mamíferos selvagens e aves. No homem e nos animais a *Candida* spp tem como habitat as mucosas digestiva (endosaprófita) e genital, sendo também encontrada no trato respiratório, pregas cutâneas e espaços interdigitais. Essencialmente, todas as áreas do trato gastrintestinal de humanos podem conter espécies de *Candida* spp (MURRAY, 1999; LACAZ et al., 2002).

Ao contrário da *C. albicans*, as demais espécies são facilmente isoladas de água, solos e plantas (MEYERS & AHEARN, 1974). Existe uma prevalência de leveduras estritamente aeróbicas em águas não poluídas e de leveduras fermentativas em águas poluídas. As leveduras fermentativas podem ser bons indicadores de poluição doméstica e contaminação fecal principalmente *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* que são espécies isoladas com freqüência de águas poluídas por esgotos domésticos e de fontes humana e animal.

Espécies de leveduras são associadas a ambientes terrestres, porém poucas associações têm sido relatadas como prevalentes de habitat marinho (HAGLER & AHEARN, 1987). As leveduras podem estar envolvidas nos habitats marinhos, na decomposição, na ciclagem de nutrientes, na biodegradação de compostos xenobióticos, como petróleo e seus derivados, e como parasitas (MEYERS & AHEARN, 1974).

Em 1981, Hagler e Mendonça-Hagler relataram *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichosporon* como gêneros mais freqüentemente isolados de águas de estuário poluído no Rio de Janeiro. Espécies de *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon mucoides* foram isoladas de ambiente hipersalino de água do mar na República Dominicana (BUTINAR et al., 2005). Araújo et al. (1995) relatam que *Candida boidinii* e *C. famata* são espécies isoladas

com frequência de ambiente de mangue; assim como diversas espécies foram relatadas de amostras oriundas de praias na Baixada Santista em São Paulo – SP (PURCHIO et al., 1988; PAULA et al., 1983).

As plantas representam o habitat mais importante para uma grande variedade de leveduras. Néctares de flores, folhas e frutos são habitados por grande variedade de leveduras selvagens devido à elevada concentração de açúcares simples, baixo pH e intensa visitação de vetores. A casca íntegra dos frutos faz com que esses microrganismos permaneçam na superfície até que ocorram lesões e eles cheguem ao interior do fruto (LAHLALI et al., 2008).

Inicialmente, as folhas e os frutos imaturos são dominados por leveduras não fermentativas, disseminadas, na sua maioria, por correntes de ar. Estas comunidades são compostas, principalmente, por basidiomicetos dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* e leveduras negras, como *Aerobasidium pululans* (CORREIA MAGALHÃES et al., 1991).

Frutos maduros, especialmente os caídos no chão, são utilizados como alimento e local de ovoposição para numerosos insetos, que transferem leveduras do ambiente ao redor para os frutos. Nestas condições, os frutos passam a ser colonizados por ascomicetos que se multiplicam rapidamente e consomem os açúcares simples existentes nos frutos. Após alguns dias, os açúcares simples começam a se esgotar e são substituídos pelos produtos da fermentação e por moléculas mais complexas. Em sucessões posteriores, produtos como o etanol e os ácidos orgânicos são utilizados pelas leveduras (RAO et al., 2008).

Frutos nessas condições possuem, freqüentemente, comunidades dominadas por leveduras fermentativas e tornam-se, portanto, iscas naturais para o isolamento de leveduras autóctones. Espécies dos gêneros *Issatchenkia*, *Pichia*, *Candida* e *Kloeckera* são comumente isoladas de frutos maduros em ambientes tropicais. (RAO et al., 2008).

1.1.2- EPIDEMIOLOGIA

A infecção produzida por linhagens do gênero *Candida* spp pode ser aguda ou crônica, superficial ou profunda, localizada ou disseminada e sempre de caráter oportunista. Embora na maioria dos animais imunocompetentes, a *Candida albicans* seja um habitante normal das mucosas, a mesma emerge, quando o organismo apresenta fatores predisponentes, sejam eles patológicos, fisiológicos ou iatrogênicos (RIPPON, 1988). A intensidade da doença depende do grau de alteração do sistema imunológico (GIUSIANO, 1999).

O número das infecções fúngicas tem aumentado significativamente nos últimos anos, sobretudo com o aumento do uso de antibióticos de amplo espectro e de drogas imunossupressoras. Neoplasias, doenças do colágeno, trauma extenso e outras doenças imunodebilitantes têm colaborado com o crescimento do número de pacientes com predisposição significativa para desenvolver a candidíase disseminada (GODOY et al., 2003; ODDS, 1994).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam. Espécies de *Candida* são encontradas no trato gastrointestinal em 20 a 80% da população humana adulta saudável. Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas, secundariamente a queimaduras ou procedimentos invasivos (GOLDMAN et al., 1995). Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão.

1.1.3- PATOGENIA NOS ANIMAIS

A infecção por espécies do gênero *Candida*, começaria pela aderência da levedura às células da pele e da mucosa e seguiria com a multiplicação celular, formando posteriormente, dependendo da espécie, tubo germinativo, produzindo proteases e fosfolipases, permitindo a sua penetração e a consequente resposta inflamatória, causando danos aos tecidos vizinhos ao local da invasão celular. A possibilidade de identificar as espécies de *Candida* e avaliar o seu grau de virulência constitui-se um fator importante para desenvolvimento de medidas de prevenção e controle das candidíases (GIUSIANO, 1999).

C. albicans foi inicialmente implicada como única espécie envolvida na etiologia da candidíase em animais (ODDS, 1994), através da formação de tubo germinativo, aumentando seu potencial de virulência em infecções em mucosas e na pele. Dentre as afecções que afetam os animais podemos destacar as estomatites, mastites, linfadenites pulmonares e intestinais, cistites e afecções sistêmicas (MACHADO, 2001).

O tubo germinativo é o precursor da hifa e o grau de filamentação está implicado na virulência. Já foi demonstrado que, *in vitro*, leveduras do gênero *Candida* são capazes de se ligarem à várias superfícies inertes formando biofilme (PICHOVÁ et al., 2001), como nos polímeros ou canos de teflon.

Na orofaringe, a *Candida* integra-se a outros microrganismos aí existentes, como bactérias, outras leveduras e protozoários. A compatibilidade da coexistência dessa população microbiana com a saúde decorre do desenvolvimento, desde o nascimento, de mecanismos imunológicos e processos de adaptação e readaptação contínuos, através dos quais se estabelece vínculo biológico entre o organismo e os microrganismos que ele abriga (STAIB et al., 2000). Tal vínculo garante a condição saprofítica desses microrganismos, pelo estabelecimento de um

estado de equilíbrio ecológico denominado de anfibiose e que caracteriza uma situação dinâmica, intermediária entre a simbiose e a antibiose (TRONCHIN et al., 1991).

Acredita-se que fatores ambientais possam alterar o poder fisiológico da levedura, provavelmente afetando alguma atividade enzimática específica que conduza à mudanças quantitativas na composição de sua parede celular. Desta forma, ocorreriam alterações morfológicas que resultariam na formação do micélio, o qual é associado ao processo de infecção progressiva da candidíase (ARENAS, 1993).

Vários fatores têm sido relacionados com os mecanismos de infecção destes patógenos, dentre eles, a eliminação da competição bacteriana, o que poderia explicar o aumento das espécies do gênero na microbiota normal, inclusive intestinal. A diminuição da biota bacteriana no trato alimentar, aliada às condições do hospedeiro, acredita-se, levam ao desenvolvimento dessas leveduras. O efeito colateral dos agentes antimicrobianos não se limitaria apenas aos antibacterianos, estendendo-se também aos antifúngicos (GIUSIANO, 1999).

Como as leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota endógena do corpo, estas expressam bem a variedade das relações que podem ocorrer entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, podendo ir do comensalismo à doença sistêmica fatal e às formas clínicas das mais variadas, onde os tecidos mais atingidos são os da cavidade oral e da vagina. A candidíase denominada cutânea ocorre preferencialmente pelas áreas intertriginosas da pele das patas, nas virilhas e nas axilas. No entanto, também estão comprometidas nas infecções sistêmicas, podendo atingir variados órgãos, causando candidíase pulmonar, endocardite, nefrite, e fungemias. Dependendo da localização, a candidíase pode se manifestar de diversas formas. Na candidíase oral podem ser observadas formas localizadas ou extensas (POLAK, 1992).

BUCK (1990) isolou *Candida* spp em 50% das amostras de fezes de aves aquáticas, assim como outras espécies de microrganismos como *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella* e *Yersinia*.

Todos os agentes envolvidos possuem alta patogenicidade em humanos e animais e estas aves podem atuar como portadores assintomáticos.

Em um dos primeiros estudos realizado por STANKUSHEV et al (1978) com 2315 amostras oriundas da cavidade oral, reto, traquéia e cloaca de porcos, galinhas, patos dentre outros animais foi demonstrada a presença do gênero *Candida* e que ainda a infecção por ela é facilitada quando se utiliza antibióticos de amplo espectro de forma indiscriminada.

1.1.4- FATORES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA

Além dos fatores relacionados ao hospedeiro para a ocorrência das candidíases, acredita-se que *Candida albicans* e algumas outras espécies do gênero possuam alguns atributos celulares e moleculares que conferem a estas leveduras a habilidade de causar infecção. Diferentes fatores, tais como aderência, dimorfismo, produção de toxinas e enzimas, têm sido responsabilizados pela patogenicidade (RUCHEL, 1984; POLAK, 1992; STAIB et al., 2000; HAYNES, 2001).

As propriedades adesivas das diferentes espécies de *Candida* classificam-nas de acordo com a virulência. As espécies mais virulentas *C. albicans* e *C. tropicalis*, mostram uma forte aderência e a mais alta afinidade para polímeros plásticos (BODEY, 1988; MATSUMOTO et al., 2002). A produção de tubo germinativo com formação de micélio por algumas espécies tem sido correlacionada ao aumento de virulência, devido a maior superfície de adesão, à variação de antígenos de superfície e pela capacidade de resistir à fagocitose (KIMURA & PEARSALL, 1982; WEINFELD et al., 1999).

A produção de enzimas como as fosfolipases e proteinases são um dos fatores de virulência mais estudados do gênero *Candida*. Estas enzimas permitem penetração da levedura nas células, ocasionando resposta inflamatória com dano aos tecidos subjacentes. Dependendo do estado imunológico do hospedeiro e da habilidade do microrganismo, a colonização, inicialmente superficial, pode se disseminar. Desta forma, o primeiro degrau no desenvolvimento de candidíase sistêmica é a colonização no trato gastrointestinal, genitourinário, orofaringe, pele e mucosas em geral (GHANNOUM & ABU-ELTEEN 1986).

1.1.4.1- PROTEINASES

Numerosas proteinases são produzidas por espécies do gênero *Candida*, inclusive por diferentes cepas de uma mesma espécie (TANG & WONG, 1987) e também por uma mesma cepa, variando-se as condições de cultivo (VERMELHO & BRANQUINHA, 2000). As enzimas proteolíticas são produzidas também por vírus, bactérias, protozoários e fungos filamentosos, atuando no ciclo de infecção destes microrganismos e também participando do catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, na liberação de hormônios peptídicos, na coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos (CALDERONE & FONZI, 2001).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresenta também uma aspartato-proteinase essencial ao seu ciclo de vida e que tem sido um excelente alvo para a quimioterapia desta doença, através de inibidores específicos, fatos estes que tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (VERMELHO & BRANQUINHA, 2000).

A natureza e a função das proteinases excretadas por *C. albicans* tem sido os principais objetivos de estudos fisiológicos e bioquímicos desta espécie. O peso molecular desta enzima gira em torno de 42 a 45 Kda, possuindo atividade proteolítica em pH baixo (2,0 a 4,0) com uma especificidade bastante ampla, que inclui queratina, albumina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulinas e proteínas de matriz extracelular (RUCHEL et al., 1982). As proteinases são também secretadas por *C. albicans*, quando a albumina bovina for usada como única fonte de nitrogênio, verificando-se apenas diferenças qualitativas entre as espécies (RUCHEL et al., 1982).

Segundo STAIB et al. (2000) e KOELCH 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 possuírem inclusive uma aspartato-proteinase extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência (NEWPORT & AGABIAN, 1997).

As proteinases extracelulares foram inicialmente descritas por Staib em 1965 APUD (SCHALLER et al., 2001), ao observar o efeito proteolítico extracelular de *C. albicans* durante o seu crescimento em soro humano, que foi adicionado ao meio de cultura como única fonte de nitrogênio. Posteriormente, o efeito proteolítico observado foi relacionado à atividade de uma proteinase ácida, classificada como uma protease aspártica e denominada genericamente de CAP ou "Candida Aspartyl Proteinase" (HUBE & NAGLIK, 2001; MONOD et al., 2002), que pode hidrolisar componentes protéicos como colágeno, queratina e mucina, e degradar anticorpos e citocinas (BERNARDIS et al., 2001).

Atualmente sabe-se que há mais de um tipo de CAP agindo como importantes fatores de virulência em tipos diferentes de processos de candidíases, causando infecções superficiais em pacientes imunocomprometidos (SCHALLER et al., 2001). Algumas destas candidíases são de difícil controle por serem resistentes aos compostos azólicos utilizados em terapias antifúngicas convencionais (RIPEAU et al., 2002). Estes azólicos de uso tópico ou sistêmico constituem-se na principal classe terapêutica utilizada no tratamento das infecções causadas por espécies do gênero *Candida* (CHAKRABARTI et al., 1991).

1.1.4.2- FOSFOLIPASES

As fosfolipases têm um papel essencial no processo de infecção fúngica, desfazendo a membrana celular e permitindo que a hifa penetre no citoplasma, facilitando a adesão do fungo às células do hospedeiro (SHIMIZU et al., 1996; STAIB et al., 2000), graças a sua capacidade de degradar os fosfolipídeos, que são as estruturas essenciais da maioria das biomembranas (MAGO & KHULLER, 1990). A produção de fosfolipase por amostras de *Candida* parece estar envolvida no processo de patogenicidade exibido por estas espécies (PRICE & CAWSON, 1997; POLAK, 1992), catalisando a quebra das ligações peptídicas em proteínas e aminoácidos, provavelmente utilizando o produto de sua degradação como nutriente para o crescimento da levedura (VERMELHO & BRANQUINHA, 2000).

Segundo GHANNOUM (2000), o processo de invasão da levedura às células do hospedeiro é iniciado pela deposição de blastoconídios na membrana, que quase imediatamente começam a sofrer transformações celulares (NIEWERTH & KORTING, 2001). Alguns destes blastoconídios desenvolvem hifas com alta atividade fosfolipásica em suas extremidades, quando em contato com a membrana celular do hospedeiro (BENNET et al., 1998), estando este fator relacionado a uma maior aderência da levedura ao epitélio oral e vaginal (GHANNOUM, 2000).

A atividade lipolítica dessas enzimas de *Candida albicans* foi estudada principalmente para a fosfolipase A e para a lisofosfolipase. O pH ótimo para ação das fosfolipases de *C. albicans* é 4,0 e para a lisofosfolipase é 5,0, sendo que a produção está inversamente correlacionada com a concentração da galactose ou glicose no meio (SAMARAYANAKE et al., 1984).

Atualmente sabe-se que outras espécies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae* e *C. krusei* também produzem fosfolipases extracelulares (BARRET-BEE

et al., 1985; MITROVIC et al., 1995; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002). Há indicações de que haja correlação desta atividade fosfolipásica e patogenicidade. Maior aderência às células epiteliais bucais e virulência em camundongos tem sido observada em amostras de *C. albicans* com alta atividade fosfolipásica (BARRET-BEE et al., 1985).

1.2- *Struthio camelus*

O Brasil caracteriza-se por ser um país tropical, com temperaturas médias elevadas, altos índices de umidade e matéria orgânica em abundância. Esta riqueza ambiental proporciona condições favoráveis para uma variedade de microrganismos, o que não acontece nos ambientes semi-áridos ou desérticos (GUALBAHAR et al., 2000). Sendo assim, na criação de avestruzes os cuidados referentes às questões sanitárias, devem ser redobrados, principalmente durante as fases iniciais da criação de filhotes, pois o sistema imunológico dos mesmos não foi desenvolvido para suportar ambientes com altas taxas de contaminação. Tais ambientes são comuns em sistemas confinados ou semi-confinados, uma vez que, na natureza, animais com seu hábito gregário, não acumulam contaminantes no ambiente (YOKOTA et al., 2004).

Nas criações, de uma maneira geral, os animais permanecem todo o período inicial nos mesmos piquetes, fazendo com que se acumulem microrganismos acima dos limites suportados pelo sistema imunológico, aumentando significativamente os riscos de problemas infecciosos (CARRER et al., 2004).

FLORES et al. (2005) relataram que inúmeras espécies bacterianas podem promover doenças em avestruz. Destacam-se enterobactérias, clostrídios, micoplasmas, e micobactérias. Um caso de septicemia por *Pasteurella* spp é relatado por ELFAKI et al. (2002) e ainda lesões

granulomatosas por *Pseudomonas aeruginosa* foram relatadas por MOMOTANI et al. (1995). Casos esporádicos de hepatite em decorrência de *Clostridium* foram relatados por POONACHA et al. (1997) e por SHIVAPRASAD (2003).

Em Israel, um caso incomum em que a ave apresentava sinais clínicos de perda de equilíbrio, evoluindo para paralisia foi relatado por LUBLIN et al. (1993) sendo incriminada como agente causador de tal patologia a bactéria *Clostridium chauvoei*.

Desde 2000, diversos casos de infecções e doenças por *Macrorhabdus ornithogaster* (megabactéria) foram diagnosticados por MARTINS et al. (2006). A doença clínica em avestruzes foi caracterizada por emagrecimento, prostração, perda do apetite, caquexia e morte, embora com forma mais aguda em canários e periquitos. Na maioria das espécies a doença foi detectada em aves com endo e/ou ectoparasitismo. O microrganismo grande, em forma de bastão, visível a partir de um aumento de 100x, sem e com coloração, pode também ser detectado em aves de aspecto clínico normal, principalmente galinhas, perus, codornas, pombos e emas (SEGABINAZI et al. 2004; MARINHO et al. 2004).

Fungos também podem estar envolvidos. As enfermidades podem ter início no interior do incubatório, devido às falhas no manejo (limpeza e desinfecção dos ovos). Os principais agentes causadores de doenças e morte em avestruzes, relatados, são as espécies de *Aspergillus*, *Mycobacterium*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (TERZICH & VANHOOSER, 1993; SAMSON, 1997; DONELEY, 1999). KNOBL et al. (2001) avaliaram a virulência de *E. coli* isolada de infecções respiratórias nestas aves.

Em necropsias realizadas em animais jovens foi isolado *Chlamydia* associada a *E. coli* (KOLB et al. 1993), fato esse já relatado na África do Sul por HUCHZERMEYER (1998) e no Canadá por SAMSON (1996).

SEVCIKOVA et al (1999) relataram um caso incomum de tuberculose em avestruz, constituindo um problema epidemiologicamente comum em propriedades que não realizam quarentena de aves (TULLY & SHANE, 1996).

BATH et al (2005) relataram um caso de ooforite por *E. coli* e *Shigella* spp em uma avestruz fêmea em plena reprodução que veio a óbito subitamente.

Outro aspecto a considerar é o fato dos avestruzes possuírem hábitos coprófagos, ingerindo as fezes no intuito de reaproveitar parte do substrato não absorvido durante o processo digestivo (CARRER et al., 2004). Este hábito contribui para uma rápida disseminação de microrganismos, principalmente os patogênicos. É importante salientar, que é grande o número de fungos que podem ser encontrados em excretas de aves em geral.

Além da levedura *Cryptococcus neoformans*, comum nestes substratos (BARONI, 2001; ORSI et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; BARONI et al., 2006), há que se destacar a presença de várias espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. famata*, *C. guilliermondi* e *C. holmii*. Outras leveduras como *Rhodotorulla* spp, *Pichia* spp, *Debaryomyces* spp, *Geotrichum* spp também podem ser encontradas (MANCIANTI et al., 2002). Entre os fungos filamentosos, podem ser citados *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp (ECKMAN & MORGAN-JONES, 1979).

Os fungos encontram-se entre os principais microrganismos relacionados à morte embrionária de aves e doenças pulmonares. *Aspergillus* spp é um fungo saprófita encontrado no ambiente, principalmente em material vegetal em decomposição. A aspergilose é a micose relacionada com doença respiratória mais freqüente em avestruzes. Geralmente está associada à pneumonia e aerossaculite granulomatosas. Particularmente, destaca-se a espécie *Aspergillus fumigatus* (KATZ, 1996; SHANE, 1998), mas há relatos de pneumonias e aerossaculites causadas por *A.*

niger e *A. flavus* (PERELMAN & KUTTIN, 1992a). Estes mesmos fungos foram observados por BATH et al. (2004) como agentes causadores de morte embrionária nessas aves, assim como contaminantes do centro de incubação de ovos podendo haver relação direta com o fato.

Os principais sinais clínicos são dispnéia, depressão e anorexia. A transmissão da aspergilose em avestruzes pode ser congênita, quando ocorre contaminação do ovo por esporos, ou adquirida após eclosão do ovo durante os primeiros dias de vida (SHANE, 1998). Em animais adultos, quando a infecção se estabelece por inalação de esporos, está relacionada com condições de estresse, imunossupressão ou tratamento prolongado com antibióticos. A doença pode se manifestar por alta morbidade e alta mortalidade em aves jovens e, esporadicamente, acometer aves adultas (SHANE, 1998).

Em avestruzes, embora não exista uma literatura rica a respeito, este gênero é citado por YOKOTA et al. (2004), quando relatam um caso de aspergilose com lesões em pulmões e sacos aérios e, ainda, necrose no fígado, provavelmente pela produção de micotoxinas.

PAIXÃO et al. (2004) relatam o primeiro caso de aspergilose em avestruz no Brasil. MARKS et al. (1994) citam caso de avestruz, ainda não reprodutiva, com doença crônica no trato respiratório. No referido animal, a biópsia de brônquios demonstrou tratar-se de caso de aspergilose, confirmado também pelo isolamento do agente.

Também FITZGERALD & MOISAN (1995) relatam caso de avestruz fêmea de dois anos de idade apresentando rinite e a presença de uma massa na via nasal direita, que após exame microscópico revelou numerosas hifas finas de diâmetros regulares, septadas e hialinas, características de *Aspergillus* spp. Casos de aspergilose pulmonar também foram verificados por ROUSSEAU & DALZIEL (1981).

Recentemente, JEFFREY (1994) e GUALBAHAR et al. (2000) descreveram casos de proventriculite e ventriculite zigomicótica em três avestruzes. Os animais apresentavam, na mucosa de ambas as áreas, inúmeras úlceras hemorrágicas. A análise microscópica das áreas afetadas evidenciou hifas fúngicas septadas de 5 a 12 microns, irregulares, e distensões globosas ocasionais típicas de Zygomycetos. GAMBLE et al (1993) sugerem cirurgia como uma das alternativas para casos de impactação decorrente de proventriculite, onde se realiza o esvaziamento do conteúdo estomacal do animal.

Além da distribuição das lesões, que são geralmente pulmonares no caso da aspergilose e predominantemente digestivas no caso da zigomicose, a morfologia dos agentes permite sua diferenciação. No caso da zigomicose, as hifas têm paredes irregulares, raramente são septadas e apresentam ramificações aleatórias. Já as hifas de *Aspergillus* spp são septadas e se ramificam dicotomicamente em ângulos agudos. Além disso, as hifas de *Aspergillus* spp nem sempre se coram pela hematoxilina e eosina (HE), enquanto as hifas dos zigomicetos são mais facilmente visualizadas em HE (PERELMAN & KUTTIN 1992b).

Os avestruzes ainda se comportam de maneira selvagem, pois possuem uma relação muito forte com o ambiente e muito pouco tempo de relacionamento com o homem, não havendo nenhum tipo de seleção de reprodutores e matrizes para temperamento. Por este motivo, estas aves possuem uma elevada predisposição para o estresse, principalmente na fase de filhotes o que de certa maneira, as predispõem para as doenças, pois diminuem a capacidade do sistema imunológico e trazem complicações digestivas (BATH et al., 2005).

2- OBJETIVOS

2.1- Verificar a frequência de espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* em orofaringe de avestruzes.

2.2- Verificar a capacidade de produção pelas amostras isoladas de enzimas relacionadas a virulência, como protease e fosfolipase, *in vitro*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- LOCAIS

Para a viabilização deste projeto foram visitados quatro criatórios de avestruzes, onde o manejo é considerado zootecnicamente adequado, localizados nos Município de Itaboraí-RJ (figura 1), situada a 22°46' 27.50" S x 42°52' 02.00" O e Magé-RJ (figura 2), situada a 22°36' 21.60" S x 43°05' 50.70" O, Microrregião do Rio de Janeiro (IBGE, 1996), Estado do Rio de Janeiro. Para tal, em entendimentos verbais, obtivemos permissão dos proprietários para o desenvolvimento do projeto. Todas as propriedades possuem um médico veterinário como responsável técnico pela criação e os protocolos sanitários estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são rigorosamente cumpridos, incluindo separação por categoria de idade, quarentena de animais novos e distanciamento mínimo em relação a outros estabelecimentos comerciais. O trabalho relacionado aos isolamentos e identificações fúngicas foi realizado no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA) - Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV) – Instituto de Veterinária (IV) – UFRRJ.



Figura 1. Vista parcial dos animais reprodutores no criatório de avestruzes localizado no município de Itaboraí-RJ.



Figura 2. Vista parcial dos animais jovens, com idade compreendida entre 3 e 6 meses no criatório de avestruzes localizado no município de Magé-RJ.

3.2- OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram obtidas mediante prévia e rápida contenção das aves. Para coleta nas aves adultas, utilizou-se um gancho e a colocação de um “capuz” que impede a visão da ave e faz com que a mesma fique tranqüila (figura 3). Nas aves menores e nos filhotes foi apenas feita a contenção manual do animal (figura 4). Com o animal tranqüilo para a manipulação, realizou-se a avaliação clínica e coleta de material da orofaringe. Para tal, previamente, procedeu-se à antisepsia das mãos do operador com solução de álcool iodado e a colocação de luvas de procedimento.

As aves foram divididas em 4 grupos de acordo com a faixa etária, a saber: Grupo I (0-3 meses de idade), Grupo II (3-6 meses), Grupo III (6-12 meses), Grupo IV (idade superior a 12 meses). Para cada grupo foram coletados aproximadamente 20 amostras da orofaringe por meio de swabs.

Foram utilizados *swabs* estéreis previamente imersos em tampão PBS. Os mesmos foram introduzidos na orofaringe, sendo submetidos a movimentos rotatórios no interior da mesma, entrando em contato com a mucosa. As figuras 5 e 6 mostram o procedimento realizado. A figura 7 mostra a orofaringe do animal. A coleta foi realizada quinzenalmente no período compreendido entre maio de 2007 a junho de 2008.

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



Figura 3. A avestruz fêmea jovem, com aproximadamente 18 meses, contida com o "capuz".



Figura 4. Contenção manual das patas e pescoço de um filhote, macho, de aproximadamente 2 meses de idade.



Figura 5 e 6. Coleta de material, introdução do *swab* na orofaringe e realização de movimentos rotatórios no interior da cavidade.



Figura 7. Orofaringe do animal.

3.3- PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO

3.3.1- SWABS

O processamento das amostras coletadas ocorreu no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA), Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os swabs armazenados sob refrigeração foram semeados na superfície de meio de cultura Agar Sabouraud dextrose a 4% - DIFCO Laboratories[®] acrescido de cloranfenicol (100mg/L) - Proquímicos[®] e de extrato de levedura 1% - DIFCO Laboratories[®] contido em placas de Petri, e com igual procedimento em idêntico meio, porém livre de antimicrobiano. Para cada material, foram empregadas duas placas de cada meio sendo as mesmas incubadas em temperatura ambiente e a 37°C por um período máximo de 10 dias com acompanhamento diário (figuras 8 e 9). Todo o processo foi realizado na cabine de segurança biológica de nível de segurança II. As colônias emergentes foram transferidas para novo meio de cultivo, sem antibióticos, contido em tubos de ensaio, sendo incubadas a 37°C durante o processo de identificação.



Figuras 8 e 9. Colônias emergentes no isolamento primário a 37°C.

3.4- LEITURA DOS ISOLAMENTOS

A leitura foi realizada a partir do terceiro dia após a inoculação, se estendendo até o décimo dia. Inicialmente eram realizados exames macromorfológicos das colônias isoladas. A observação à microscopia óptica destas colônias foi realizada com objetivas de aumento de 10X, 20X, e 40X, a partir da preparação de lâminas confeccionadas e coradas com lactofenol azul de algodão e, ainda, utilizando-se técnica de nigrosina (figura 10).

As colônias que micromorfológicamente apresentaram células com características compatíveis com as leveduras, foram suspensas em solução salina estéril e inoculadas novamente em meio Agar Sabouraud dextrose a 4% - DIFCO Laboratories[®], realizando-se esgotamento da alça microbiológica, com o objetivo de se obter colônias verdadeiras, isto é, colônias oriundas de uma única célula, e que pudessem expressar todo seu possível potencial de produção de enzimas como protease e fosfolipase, sem a interferência de possíveis competidores presentes inicialmente. Esta etapa também permitiu o início dos procedimentos de identificação.

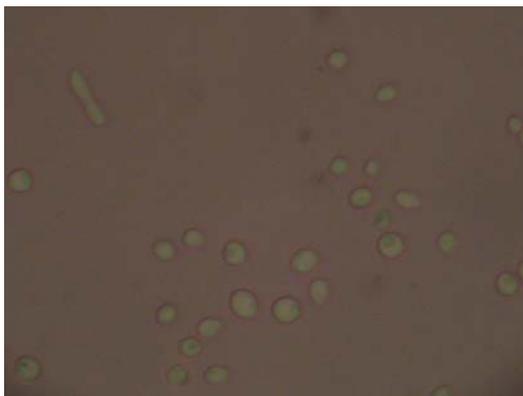


Figura 10. Exame micromorfológico. Evidenciação de células leveduriformes utilizando-se técnica de nigrosina. Aumento de 400x.

3.5- IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS ISOLADAS

A identificação foi realizada utilizando-se informações de KURTZMAN & FELL (1998), prioritariamente e complementarmente utilizando o protocolo de identificação de leveduras do LLPA (anexo 5). Considerando-se além das características macromorfológicas, culturais e micromorfológicas como produção de pseudohifa e/ou hifas verdadeiras, clamidoconídios, arranjos de blastoconídios, as características nutricionais, como a assimilação de fontes nitrogenadas e carbonadas e outras provas complementares.

Assim sendo, após a obtenção de colônias verdadeiras das amostras suspeitas, foi realizado o teste de produção de urease utilizando-se o meio Christensen (anexo 2). Após este processo as leveduras foram submetidas a auxanograma, testando-se assimilação de carbono oriunda de diferentes fontes, como lactose, glicose, sacarose, melibiose, maltose, rafinose, trealose, ramnose, celobiose, galactose, inulina, melezitose, inositol, xilose, eritritol, adonitol, manose, dulcitol, arabinose, frutose, xilitol e sorbose.

Para o auxanograma realizado para a assimilação de fontes carbonadas utilizou o Meio Yest Nitrogen Base (YNB) – DIFCO Laboratories[®], padronizando-se o inóculo de acordo com o grau 4 da escala de Mc Farland. A leitura do teste foi efetuada a partir do terceiro dia até o sétimo dia. A assimilação de fontes nitrogenadas foi realizada em meio Yest Carbon Base (YCB) – DIFCO Laboratories[®]. As fontes nitrogenadas testadas foram a peptona, nitrato de potássio (KNO₃) e N-acetil glicosamina. Os dados foram anotados no protocolo de identificação do LLPA (anexo 5), para uso nas chaves de identificação de leveduras.

3.6- FATORES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA

3.6.1- PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE

O teste de produção de fosfolipase foi realizado como proposto por PRICE et al., (1982), utilizando-se meio que apresenta em sua composição gema de ovo e CaCl_2 , denominado meio para produção de fosfolipase (anexo 3).

As amostras, antes do teste, foram previamente repicadas em meio Agar Sabouraud dextrose 4% - DIFCO Laboratories[®] cultivando-as por 48 horas com o objetivo de ativá-las.

As amostras ativadas foram semeadas assepticamente em um ponto único, central, na superfície do meio ágar fosfolipase contido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro descartáveis, efetuando-se o teste em duplicata.

Após semeadas, as amostras foram incubadas em estufa a uma temperatura de 32°C e a leitura foi realizada do 3º ao 15º dia.

As amostras produtoras de fosfolipase produzem halos de precipitação ao redor das colônias, formados devido à deposição de cloreto de cálcio. O valor da atividade fosfolipásica (Pz) foi medido pela razão entre diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro total formado pela colônia mais a zona de precipitação (dcp).

Após a observação visual da zona de precipitação, foram aferidas, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, as medidas dos dc e dcp, para efetuar-se o cálculo da atividade enzimática. Os valores obtidos foram comparados com a tabela 1 para classificação das amostras como positivas, fortemente positivas ou negativas.

Pz	Atividade Enzimática	Código
= 1,0	Negativa	1
$\geq 0,64 < 1,0$	Positiva	2
$< 0,64$	Fortemente Positiva	3

Tabela 1. Atividade enzimática de protease e fosfolipase padronizadas de acordo com PRICE et al, 1982.



Figuras 11 e 12. Amostra semeada em Agar Fosfolipase.

3.6.2- PRODUÇÃO DE PROTEASE

Considerou-se o estabelecido por RUCHEL et al, (1982) e, desta forma, a produção de protease foi realizada utilizando-se um meio de cultura (anexo 4) que contém uma parte básica que é esterilizada por autoclavação, e uma outra parte que contém soroalbumina bovina esterilizada por filtração em membrana de Millipore 0,22 μ .

As amostras testadas foram previamente repicadas em meio Sabouraud dextrose 4% - DIFCO Laboratories[®] (anexo 1) sendo cultivadas por 48 horas para ativação. Após este cultivo, a semeadura deu-se em ponto único central, na superfície do meio contido em cada placa de Petri, tendo-se o cuidado de realizar esse procedimento assepticamente. Todas as amostras foram testadas em duplicata e incubadas a 32°C com leituras do 3º ao 15º dia.

A produção de protease se torna perceptível através da formação de um halo ao redor da colônia que é oriundo da proteólise. A atividade proteolítica enzimática (Pz) da cepa testada pode ser estimada pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp).

Após a observação visual da zona proteolítica, foram aferidas, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, as medidas dos dc e dcp para se efetuar o cálculo da atividade enzimática. Os valores foram comparados com a tabela 1.

3.7- PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de *Candida* identificadas e isoladas foram repicadas em Agar Sabouraud dextrose 4% - DIFCO Laboratories[®], contido em tubos de ensaio em camada alta, e incubadas por 72 horas para obtenção de colônia com grande massa de células.

Em seguida, os tubos foram identificados de acordo com a origem e data de processamento e mantidas sob refrigeração no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA)-DMIV-IV-UFRRJ.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir do processamento das 80 amostras, divididos por grupos de acordo com a faixa etária dos animais, podem ser vistos na tabela 2 que se refere ao número de amostras que obtiveram crescimento fúngico, seja este leveduriforme, filamentoso, ambos ou sem crescimento.

Do total de amostras processadas da orofaringe, 32,5% obtiveram crescimento leveduriforme, seja ele único ou acompanhado de fungos filamentosos. Os fungos filamentosos foram evidenciados em 75% das amostras. Não observou-se prevalência fúngica quando avaliou-se a relação dos mesmos com a idade dos animais.

Tal fato pode estar relacionado ao manejo das propriedades onde os animais são separados por categoria de peso, e conseqüentemente idade. Em todas as idades os animais possuem contato com grama e o solo, assim como já se alimentam de ração a partir do primeiro dia de vida. O acondicionamento da ração apesar de adequado e repetindo o empilhamento máximo é um ponto crítico em qualquer propriedade.

O isolamento de 75% nas amostras de fungos filamentosos pode ser considerado esperado uma vez que os animais possuem hábito coprofágico. Estes animais em todas as etapas da criação ingerem ração como fonte principal de sua dieta além de capim (*Coast cross*) e plantas leguminosas como feijão Guandu (*Cajanus cajan*) e alfafa (*Medicago sativa*). Tais fontes podem conter esses fungos filamentosos em grande quantidade. Uma análise da ração, água e referidas fontes vegetais, utilizando-se marcadores, ficam como sugestão para pesquisas futuras. A patologia promovida a partir desses agentes isolados, já foi relatada em avestruzes seja como agentes principais da etiologia ou como oportunistas relacionados ou não a uma baixa imunológica da ave.

Embora, em nosso trabalho, tenhamos tido todo o cuidado no que diz respeito a assepsia no momento da coleta, não se pode descartar totalmente a possibilidade de contaminação dos swabs com fungos filamentosos, uma vez que muitos deles podem ser carreados pelo ar e, neste caso, as nossas coletas ocorreram em ambiente aberto.

Há de se considerar que o relativo baixo isolamento de leveduras pode ser explicado pelo habitat a que estes animais estão adaptados e pela própria pressão na seleção genética a que estes animais estão submetidos. Logicamente, fatores intrínsecos como a competição com outros microrganismos influenciaram neste baixo isolamento. Outro fato interessante que pode auxiliar no diagnóstico clínico foi a presença de poucas colônias leveduriformes nas placas. Isto pode significar um pequeno número de colonizantes na orofaringe dos animais ou ainda uma dificuldade de substrato. De qualquer forma é uma observação pertinente.

Grupo	Crescimento Leveduriforme	Crescimento de Filamentosos	Crescimento de Leveduras e Filamentosos	Negativo ao Crescimento
I (0 - 3 meses)	4	10	4	1
II (3 – 6 meses)	3	12	2	2
III (6-12 meses)	2	15	5	3
IV (> 12 meses)	3	9	3	2
Total	12	46	14	8

Tabela 2. Número de amostras e tipo de crescimento fúngico de acordo com os grupos de avestruzes estudados.

As leveduras isoladas estão representadas na tabela 3. O crescimento de *C. albicans* correspondeu a 65,38% do total de isolados leveduriformes.

Grupo	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Rodothorula sp</i>
I (0 - 3 meses)	5	1	1	1
II (3 – 6 meses)	3	1	---	1
III (6-12 meses)	4	1	1	1
IV (> 12 meses)	5	---	---	1
Total	17	3	2	4

Tabela 3. Número de amostras por leveduras isoladas de acordo com os grupos de avestruzes envolvidos.

Candida albicans foi a levedura mais frequente em todos os grupos. A *Rodothorula sp* também se fez presente em todas as faixas etárias. As condições encontradas na orofaringe como umidade, temperatura elevada e um pH levemente ácido podem contribuir para a presença e desenvolvimento de *Candida spp* e outras leveduras.

Em algumas amostras de pH da orofaringe das aves, em todas as faixas etárias, o valor variou entre 6,0 a 6,7, mas a coleta não seguiu um padrão. Esta análise foi obtida em um mesmo momento apenas a nível de informação complementar. Estudos posteriores e mais complexos devem ser realizados considerando o manejo alimentar dos animais e a rotina das propriedades, e aí sim poderíamos descobrir se existem flutuações ao longo do dia ou diferenças significativas entre as idades.

Não existem dados de prevalência de *Candida spp* em orofaringe de outras espécies aviárias, assim como nunca foi relatada candidíase nestas aves, mas a patogenicidade *in vitro* das amostras isoladas se tornou evidente. Isto significa que, deficiências imunológicas nestas aves ou situações que levem a estas deficiências poderão favorecer quadros clínicos de candidíase. Por

outro lado, as pessoas que trabalham diretamente com estas aves devem possuir cuidados de antisepsia; orientações e treinamento devem ser realizados pelo médico veterinário que assiste as propriedades.

Casos de candidíase em aves vêm sendo relatados. SATO et al (2001) relataram candidíase em um agapornes (*Agapornis roseicollis*) e em um periquito (*Melopsittacus undulatus*) onde os animais tiveram diminuição de apetite e formação de pseudomembrana branco-amarelada na orofaringe e esôfago. Tal fato torna a orofaringe um bom sítio de coleta para diagnóstico laboratorial de candidíase.

Analisando amostras de pele de galinhas saudáveis, GRUNDER et al. (2004) observaram que as leveduras estavam presentes em 29,8% das amostras totais e, ainda, que *Candida* spp foi a segunda levedura mais isolada com 21% de frequência. Tal fato mostra a importância que esta levedura assume em aves.

Diversas espécies de *Candida* são naturalmente encontradas no homem vivendo como comensais no organismo de indivíduos com sistema imunológico normal, numa proporção de 47 % na cavidade oral, 34 % na região retal e 23 % na mucosa vaginal, sem causarem infecções aos seus hospedeiros, ainda que por vezes sejam detectadas em grande quantidade (ODDS, 1994). A espécie isolada com mais frequência do trato gastrointestinal é *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaneae*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* (MURRAY, 1999).

CAFARCHIA et al. (2008) trabalhando com amostras de leveduras isoladas de cloaca de aves, fossem elas passeriformes ou aves migratórias obtiveram um resultado considerado preocupante, ao concluírem que aproximadamente 60% dos isolados possuíam atividade de fosfolipase. Dentre as leveduras com tal atividade destacaram-se *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaneae*, *C. pelliculosa*, *Cryptococcus albidus*.

Embora não fosse objetivo deste trabalho, as placas que, no isolamento primário revelaram crescimento de fungos filamentosos sem interesse direto em nosso trabalho, foram submetidas a uma triagem macromorfológica e, em alguns casos, exames micromorfológicos utilizando-se coloração com lactofenol azul de algodão, ou clarificação com KOH (30%). Através da confecção destas lâminas podemos afirmar que, o fungo filamentoso com maior índice de isolamento, foi *Aspergillus* spp.

O tempo de incubação de 72 horas após a semeadura, para então se iniciar a leitura foi considerado satisfatório. Dificilmente há surgimento de colônias do agente antes desse período em todas as placas. Muitas colônias bacterianas, no entanto, surgem rapidamente, já nas primeiras 24 – 36 horas. Um tempo superior a 72 horas para o início das leituras também é prejudicial, uma vez que muitos fungos filamentosos, além das bactérias, surgem e ocupam o espaço físico da placa. Um tempo superior a 72 horas, então, pode resultar em errônea interpretação de resultados, uma vez que colônias de leveduras podem ser cobertas por colônias de fungos filamentosos.

Há uma possibilidade de interferência nos isolamentos, promovida por *Rhodotorula* spp. Esta levedura apresenta muitas características do agente em estudo e é freqüentemente isolada de fontes ambientais. No entanto, pela sua presença em todas as categorias de idade estudada pode ser ainda que a mesma pertença a microbiota dos animais. No presente trabalho, ocorreram vários isolamentos da mesma. Neste caso, deve-se também considerar a probabilidade de produção de micocinas que poderiam interferir causando a inativação de células do gênero *Candida*.

4.1- FATORES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA

Apesar da existência de outros fatores de virulência, no presente trabalho foi avaliada apenas a produção da fosfolipase e produção de protease.

A atividade de produção de fosfolipases e proteases de *Candida* spp tem sido demonstradas por diversos autores (SILVA et al., 2007; OKSUZ et al., 2007). As infecções por algumas espécies de *Candida* consideradas não *albicans* surgem como um desafio atual, pois também podem produzir fosfolipase e proteases do mesmo modo que *C. albicans* (PANIZO et al., 2005). A maioria dos trabalhos investigativos acerca da função destas enzimas está relacionada à sua virulência e dizem respeito à isolados de *C. albicans*. O presente trabalho comprova o fato que, cada vez mais, *Candida* não *albicans*, despontam com certo grau de importância neste cenário, uma vez que verificamos uma amostra de *C. guilliermondii* fortemente positiva tanto para produção de fosfolipase quanto para protease e duas amostras fortemente positivas para fosfolipase.

A produção de fosfolipase é considerada como fator importante para o processo de infecção, variando conforme a amostra e há a dependência de outros fatores de virulência e do próprio hospedeiro. Essa enzima, localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atua pela hidrólise dos fosfolipídeos, dando origem aos lisofosfolipídeos que causam dano à célula epitelial. No presente trabalho tal localização não foi realizada. Na verdade não existem estudos mais profundos com relação a avestruzes no que tange a microrganismos que os colonizam (BATH et al., 2004).

O efeito proteolítico de amostras de *C. albicans* foi demonstrado pela primeira vez por STAIB et al. (1965). Esta enzima hidrolítica tem sido observada em sobrenadante de cultura e no citoplasma de blastoconídios de *C. albicans*. A proteinase extracelular produzida por diferentes

espécies de *Candida* é capaz de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular. Enzimas proteolíticas foram encontradas em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtidas de várias amostras clínicas. Desde a década de 70, além do estudo de enzimas participantes do processo infeccioso, vários autores passaram a caracterizar as leveduras quanto ao fenômeno de produção de compostos proteicos denominados toxinas *killer*, observado em espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* e *Trichosporon*. O fenômeno *killer* é útil na diferenciação de leveduras dentro da própria espécie, podendo ser usado como marcador epidemiológico. Além deste aspecto útil há uma outra questão que deve ser considerada. As micocinas, servem evidentemente para um controle uma vez que eliminam leveduras concorrentes. Desta forma, os isolamentos obtidos podem sofrer esta influência.

A temperatura corporal do animal fica próxima aos 42°C nos animais adultos que passam a maior parte do dia exposto ao sol. Já os filhotes, até a primeira semana de idade, ficam expostos a lâmpadas aquecedoras para manter a temperatura corporal. Os animais quando estão com intenso calor mantém o bico aberto para realizar uma troca de ar mais eficiente, sendo tal comportamento observado em todas as faixas etárias, o que faz com que a temperatura da orofaringe na maioria do tempo fique em torno dos 37°C, temperatura esta utilizada no isolamento primário das leveduras. Mais uma vez, estudos mais aprofundados devem ser realizados, porém a dificuldade de manuseio e o "stress" devem ser levados em conta. A dificuldade de manuseio dos materiais pode levar a coletas inadequadas que refletirão no isolamento. Do mesmo modo um constante "stress" dos animais poderia promover uma alteração na biota das mucosas das mesmas.

A formação de pseudohifas e a rapidez com que pode variar sua morfologia são características de infecciosidade. O desenvolvimento de micélio pelas espécies de *Candida*

também favorece as infecções fúngicas em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial que propicia maior aderência, dificultando a ação fagocitária pelo sistema imune (GHANNOUM et al., 1990). Neste caso vale ressaltar que a grande maioria das espécies isoladas foi *C. albicans*, sem dúvida a espécie mais envolvida com os processos de candidíase e uma espécie que além de pseudohifas produz hifas verdadeiras.

O mecanismo “switching”, de alta frequência e reversibilidade, presenciado nas leveduras do gênero *Candida*, conduz a alterações morfológicas das colônias fúngicas e das propriedades de superfície celular, além de favorecer também mudanças na sensibilidade à drogas antifúngicas (KENNEDY, 1988; MATTHEWS, 1994). A utilização do antifúngico ao qual a levedura é sensível diminui a atividade fosfolipásica das espécies de *Candida* (ANIL et al., 2003). Os testes de sensibilidade a tais drogas fica como sugestão futura uma vez que o uso do fármaco mais correto para o combate a uma possível candidíase é de fundamental importância para a resposta do animal a infecção em curso.

ARENAS (1993) demonstrou que *Candida* pode emitir largos filamentos capazes de invadir em direção à profundidade dos tecidos, se houver maior quantidade de nutrientes nestas áreas. Este fenômeno é conhecido como tigmotropismo. A produção de substâncias toxigênicas (toxicoglicoproteínas e candidoxina) ocorre durante processo infeccioso por espécies de *Candida*. Estas toxinas induzem, em determinadas doses, a morte de animais de laboratório, demonstrando a sua importância como elemento do mecanismo de infecção fúngica (GHANNOUM et al., 1990; IWATA, 1975).

A produção de exoenzimas leveduriformes também constitui importante mecanismo de patogenicidade, sendo aspartil proteinases e fosfolipases as substâncias enzimáticas detectadas. A observação inicial do efeito proteolítico extracelular em fungos leveduriformes coube a STAIB (1965), mediante crescimento de *C. albicans* em meio contendo albumina, como fonte simples de

nitrogênio. A atividade enzimática das aspartil proteinases é mediada por uma família (Saps) de pelo menos 10 genes e detectada em meio contendo soroalbumina bovina a pH 5,0 (RIBEIRO, 2002). Detentoras de baixa especificidade por substratos protéicos, detém ainda a capacidade de clivar anticorpos IgA e IgG, queratina, hemoglobina, colágeno e mucina (REMOLD, 1968; MACDONALD et al., 1980; RUCHEL, 1982; ODDS, 1993). O pH da orofaringe distingue dos valores considerados ótimos para produção destas exoenzimas. Isto não significa dizer, no entanto, que a produção não possa ocorrer nesta parte anatômica ou em outras.

O envolvimento de aspartil proteinases de espécies de *Candida* na capacidade de induzir aderência às células epiteliais foi constatada através da indução da infecção pela penetração de tubos germinativos no tecido parasitado. A visualização deste processo tem sido observada por microscopia em cultura de células (BORG et al., 1988).

A ação da aspartil proteinases foi verificada *in vitro* através da observação de que cepas mutantes aproteolíticas de isolados do gênero *Candida* são menos patogênicas para camundongos em relação às de origem enzimática (MACDONALD et al., 1980). Em nossa pesquisa presença de aspartil proteinases ácidas só não foi evidenciada em duas amostras de *Candida albicans*. A grande maioria foi fortemente positiva e aproximadamente metade destas amostras também são positivas para a produção de fosfolipases o que sugere alta patogenicidade destas amostras.

Apenas uma das três amostras de *C. guilliermondii* foi fortemente positiva para protease e fosfolipase, assim como uma das duas amostras de *C. krusei* que também foi fortemente positiva para a produção de ambas as enzimas (tabela 4). Isso remete a importância dos estudos destas leveduras já que assumem grande potencial patogênico para estes animais e ainda para as pessoas envolvidas diretamente ou indiretamente na criação de avestruzes.

Outra enzima associada ao mecanismo de infecciosidade de cepas de *C. albicans* são as fosfolipases, sendo descrita inicialmente por WERNER (1966), que observou tal atividade entre

cultivos de *C. albicans* em meio enriquecido com gema de ovo (PRICE, 1982). Bioquimicamente, a secreção de fosfolipases por isolados de *Candida* é condicionada por pH ácido (3,6 a 4,7) e inversamente dependente da concentração de carboidratos como a glicose ou lactose presente no meio (SAMARANAYAKE, 1984).

As fosfolipases compreendem as fosfolipases A, B e C, lisofosfolipase e lisofosfolipase transcetilase, sendo codificadas por 10 gens LIPs (RIBEIRO, 2002). 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 da estrutura celular integrantes da superfície da mucosa infectada (PUGH et al., 1975). Apenas uma amostra de *C. albicans* foi positiva para fosfolipase e negativa para protease. Tal fato é incomum já que obtivemos oito amostras de *C. albicans* com comportamento positivo para fosfolipase e quase a totalidade destas que são positivas para fosfolipases são fortemente positivas para proteases.

Amostra	<i>Levedura envolvida</i>	<i>Fosfolipase</i>	<i>Protease</i>
1	<i>C. guilliermondii</i>	Fortemente positivo	Fortemente positivo
2	<i>C albicans</i>	Negativo	Fortemente positivo
3	<i>C albicans</i>	Negativo	Fortemente positivo
4	<i>C albicans</i>	Negativo	Fortemente positivo
5	<i>C albicans</i>	Positivo	Fortemente positivo
6	<i>C albicans</i>	Positivo	Fortemente positivo
7	<i>C albicans</i>	Positivo	Positivo
8	<i>C albicans</i>	Positivo	Fortemente positivo
9	<i>C albicans</i>	Negativo	Positivo
10	<i>C albicans</i>	Negativo	Negativo
11	<i>Rodothorula spp</i>	Negativo	Positivo
12	<i>Rodothorula spp</i>	Negativo	Negativo
13	<i>C albicans</i>	Negativo	Positivo
14	<i>C. guilliermondii</i>	Positivo	Negativo
15	<i>C. guilliermondii</i>	Positivo	Negativo
16	<i>C albicans</i>	Positivo	Fortemente positivo
17	<i>C albicans</i>	Negativo	Fortemente positivo
18	<i>C albicans</i>	Positivo	Negativo
19	<i>Candida krusei</i>	Negativo	Fortemente positivo
20	<i>C albicans</i>	Negativo	Negativo

21	<i>C albicans</i>	Negativo	Negativo
22	<i>Rodothorula spp</i>	Positivo	Fortemente positivo
23	<i>Rodothorula spp</i>	Positivo	Negativo
24	<i>C albicans</i>	Positivo	Fortemente positivo
25	<i>C albicans</i>	Positivo	Fortemente positivo
26	<i>Candida krusei</i>	Fortemente positivo	Fortemente positivo

Tabela 4. Resultados da produção das enzimas proteases e fosfolipases de amostras de leveduras isoladas da orofaringe de avestruzes.

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. Assim, são também importantes o dimorfismo, aderência, secreção enzimática, alterações fenotípicas, variação antigênica e outros. 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 a homens e animais. Devido a certas características os avestruzes são imunologicamente competentes em toda a sua fase de criação e muito raramente algum animal fica doente. Os óbitos são escassos sendo limitados quase que em sua totalidade aos primeiros dias de vida da ave e por erro no manejo.

Isto reporta-nos ao início do trabalho, quando, na revisão de literatura relatamos que os avestruzes sofreram pressão genética e grande adaptabilidade a ambientes adversos. Tal fato realmente fez destas aves, animais rústicos e, talvez sejam animais mais resistentes a doenças. Estamos trabalhando somente com uma hipótese e consideramos que muito há a ser descoberto e averiguado nesta ave.

5- CONCLUSÕES

5.1- *Candida albicans* foi a levedura mais frequente.

5.2- A grande maioria das amostras isoladas apresentou algum grau de virulência se considerarmos a capacidade de produção de protease e fosfolipase.

5.3- As técnicas de processamento utilizadas podem ser empregadas em outros ensaios semelhantes.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIL, S.; SAMARANAYAKE, L.P. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Chemotherapy*. 49: 243-247. 2003.

ARAÚJO, F.V.; SOARES, C.A.G.; HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. *Ant. Leeuwenh.* 68: 91-99. 1995.

ARENAS R. *Micologia Médica*. Interamericana. Mexico. 397p. 1993.

BARONI, F. A. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizados em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. PhD tese. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2001.

BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.G.; OLIVEIRA, M.T.B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* em torres de igrejas da cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 48(2): 71-75. 2006.

BARRET-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R.G.; RYLEY, J.F. A comparasion of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1217-1221. 1985.

BATH, F.V.C.; CAMPOS, S.G.; BARONI, F.A.; FIGUEIREDO, M.A.; DURAN, E. B. Determinação de fungos contaminantes de ovos de avestruzes e do centro de incubação. In: 5º Congresso Brasileiro de Estrutiocultura, 2004, Joinville - SC. Anais do 5º Congresso Brasileiro de Estrutiocultura. 2004.

BATH, F.V.C.; NUNES, A.P.M.; COELHO, S.M.O.; PEREIRA, I.A.; FREITAS, E.S.; FIGUEIREDO, M.A.; SOUZA, M.M.S. Ooforite em avestruz (*Struthio camelus*) causado por *Escherichia coli* e *Shigella* spp - Relato de Caso. In: V Conferência Sul-Americana de Medicina Veterinária, 2005, Rio de Janeiro. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*. Seropédica - RJ: Universidade Rural, 25: 53-54. 2005.

BENETT, D.E. McCREARY, C.E. & COLEMAN, D.C. Genetis characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiology*. 144: 55-72. 1998.

BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P.A. & CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Medical Mycology*. 39: 303-313. 2001.

BODEY, G.P. The emergence of fungi as major hospital pathogens. *J. Hosp. Infect.* 11: 411-426. 1988.

BORG, M.; RUCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.* 56: 626-31. 1988.

BUCK, J.D. Isolation of *Candida albicans* and halophilic *Vibrio* spp from aquatic birds in Connecticut and Florida. *Applied and Environmental Microbiology.* 56(3): 826-828. 1990.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts diversity in hypersaline habitats. *FEMS. Microbiology Letters.* 244: 229-234. 2005.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Med. Mycol.* 46(5):429-434. 2008.

CALDERONE, R.; SUZUKI, S.; CANNON, R.; CHO, T.; BOYD, D.; CALERA, J.; CHIBANA, H.; HERMAN, D.; HOLMES, A.; JENG, H.W.; KAMINISHI, H.; MATSUMOTO, T.; MIKAMI, T.; O'SULLIVAN, J.M.; SUDOH, M.; SUZUKI, M.; NAKASHIMA, Y.; TANAKA, T.; TOMPKINS, G.R. & WATANABE, T. *Candida albicans*: adherence, signalig and virulence. *Medical Mycology.* 38 (1): 125-137. 2000.

CALDERONE, R.A. & FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology.* 9(7): 327-334. 2001.

CORREIA MAGALHÃES, O.M.; ACIOLE DE QUEIROZ, L. Leveduras isoladas de diversos tipos de alimentos. *Bol. Micol.* 6(2): 49-54. 1991.

CARRER, C.C.; ÊLMOR, R. A.; KORNFELD, M. E. CARVALHO, M. C. A criação do avestruz: Guia completo de A a Z. Pirassununga, SP. 255p. 2004.

CHAKRABARTI, A.; NAYAK, N.; TALWAR, P. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia.* 114: 163-168. 1991.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (4): 281-286. 1999.

DONELEY, R.J.T.; GIBSON, J.A.; THORNE, D.; COUSINS D.V. Mycobacterial infection in an ostrich. *Aust Vet J.* 77(6): 368-370. 1999.

ECKMAN M. K.; MORGAN-JONES, G. Fungus species isolated from commercial hatcheries in Alabama. *Avian Dis.* 23(1): 204-208. 1979.

ELFAKI, M.G.; ABBAS, B.; MAHMOUD, O.M; HAROUN, E.M; ABDEL-MAGIED, E.M. Septicaemic pasteurellosis in ostriches (*Struthio camelus*) in central Saudi Arabia. *Vet. J.* 163(2):218-221. 2002.

FITZGERALD, S. D.; MOISAN, P. G. Mycotic rhinitis in an ostrich. *Avian Dis.* 39(1): 194-196. 1995.

FLORES, M.L.; SEGABINAZI, S.D.; ARISTIMUNHA, P.C. Manejo sanitário e controle de doenças bacterianas, nutricionais e tóxicos em avestruzes. Conferência Apinco 2005 de Ciência e Tecnologia Avícola, 197-214, 2005.

FRIDKIN, S.; JARVIS, W.R. Epidemiology os nosocomial fungal infections. Clinical Microbiology Reviews. 9 (4): 499-511. 1996.

GAMBLE, K.C.; HONNAS, C.M. Surgical correction of impaction of the proventriculus in ostriches. Compend Contin Educ Pract Vet. 15: 235-244. 1993.

GHANNOUM, M.; ABU-ELTEEN, K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. J. Med. Vet. Mycol. 24(5): 407-413. 1986.

GHANNOUM M.A.; ABU-ELTEEN K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses, 33: 265-282, 1990.

GHANNOUM, M.A. Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews. 13(1): 124-134. 2000.

GIANNONI, M.L. Criação de Avestruzes: a situação brasileira. Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 7-16, 2005.

GIUSIANO, G.E. Infecciones por leveduras em pacientes pediátricos hospitalizados. Anais do Instituto de Medicina Regional da Universidade Nacional do Nordeste; Chaco, Argentina. 1999.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L.P.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98(3). 2003.

GOLDMAN, R.C.; FROST, D.J.; CAPOBIANCO, J.O. KADAM, S.; RASMUSSEN, R.R.; ABAD-ZAPATERO, C. Antifungal drug targets: *Candida* secreted aspartyl protease and fungal wall beta-glucan synthesis. Infect. Agents Dis. 4(4): 228-247. 1995.

GORDO, F.P.; HERRERA, S.; CASTRO, A.T.; GARCÍA DURÁN, B.; MARTÍNEZ DÍAZ, R.A. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. Vet. Parasitol. 107: 137-160. 2002.

GRUNDER, S.; MAYSER, P.; REDMANN, T.; KALETA, E.F. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. Mycoses 48: 114-119. 2004.

GUALBAHAR, M. Y.; AGAOGLU, Z.; YUKSEK, N. Zygomycotic proventriculitis and ventriculitis in ostrich (*Struthio camelus*) with impaction. Aust. Vet. J. 78(4): 247-249. 2000.

HAGLER, A.N.; AHEARN, D.G. The ecology of aquatic yeasts. In The yeasts. Vol.1. Biology of yeasts. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (eds.) Academic Press. New York. 181-205p. 1987.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. Trends in Microbiology. 9(12): 591-596. 2001.

HUBE, B. & NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology. 147: 1997-2005. 2001.

HUCHZERMEYER, F.W. Ostrich diseases and other ratites. Agricultural Research Council. Onderstepoort. Veterinary Institute. Republic of South Africa. 392p. 1998.

IBGE. Censo Agropecuário. Rio de Janeiro. 1996. Disponível na Internet. <http://www.ibge.gov.br/censo96/agro>. 30 abr. 2001.

IWATA K. Fungal toxins and their role in the etiopathologia of fungal infection. In: Regent advances in medical and veterinary mycology. Ed. K. Iwata Univ. Park Press. 1975.

JEFFREY, J.S. Proventriculitis and ventriculitis associated with zygomycosis in ostrich chicks. Avian Diseases. 38:630-634. 1994.

KANTARCIOGLU, A.S & YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 45: 160-165. 2002.

KATZ, M.E. Development of a method for the identification, using the polymerase chain reaction, of *Aspergillus fumigatus* isolated from ostriches. Australian Veterinary Journal. 74: 50-54. 1996.

KENNEDY M.J. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *C. albicans* white and opac phenotypes. Mycopathologia, 102: 149-156. 1988.

KIMURA, L.M.; PEARSALL, N.N. Adherence of *Candida albicans*. J. Clin. Mycol. 21: 233-244. 1982.

KNOBL, T.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; FERREIRA, C.S.; FERREIA, A.J. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. Vet Microbiol. 83(1):71-80. 2001.

KOELCH, G.; TANG, J.; LOY, J.A.; MONOD, M.; JACKSON, K.; FOUNDLING, S.I.; LIN, X. Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. Biochimica et Biophysica Acta. 1480: 117-131. 2000.

KOLB, J.; KANKONDI, R.; HUBSCHLE, O.J. Isolation of *Chlamydia* spp. from ostriches (*Struthio camelus*). Dtsch Tierarztl Wochenschr. 100(11): 454. 1993.

KURTZMAN, P C.; FELL, J. W. The Yeasts, a taxonomic study. 4^oed. Amsterdan: El sevier. 1055 p. 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Tratado de micologia médica. São Paulo, SP. 2002.

LAHLALI, R.; MASSART, S.; SERRHINI, M.N.; JIJAKLI, M.H. A Box-Behnken design for predicting the combined effects of relative humidity and temperature on antagonistic yeast population density at the surface of apples. Int. J. Food Microbiol. 122(2): 100-108. 2008.

LUBLIN, A.; MECHANI, S.; HOROWITZ, H.I.; WEISMAN, Y. A paralytic-like disease of the ostrich (*Struthio camelus massaicus*) associated with *Clostridium chauvoei* infection. Vet Rec. 132(11): 273-275. 1993.

MACDONALD, F.; ODDSD F.C. Inducible proteinase of *C. albicans* in diagnostic serologic and in the pathogenesis of systemic candidosis. J. of Medical Microbiol., 13: 423-435. 1980.

MACHADO, M.L.S. Dermatofitos e leveduras isoladas da pele de cães com dermatopatias diversas. Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS. 29(2): 161-162. 2001.

MAGO, N. & KHULLER, G.K. Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 28: 355-362. 1990.

MANCIANTI, F; NARDONI, S.; CECCHERELLI, R. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. Mycopathol. 153(3): 121-124. 2002.

MARINHO, M.; MEIRELES, M.V.; SOUZA A.V.G. Determinação da microflora do trato gastrintestinal de avestruzes (*Struthio camelus*) criados na região noroeste do estado de São Paulo, submetidas à necrópsia. Arq. Inst. Biol. São Paulo. 71:267-271. 2004.

MARKS, S. L.; STAUBER, E. H.; ERNSTROM, S. B. Aspergillosis in an ostrich. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204(5): 784-785. 1994.

MARTINS, N.R.S.; HORTAL, A.C.; SIQUEIRA, A.M.; LOPES, S.Q.; RESENDEL, J.S.; JORGE, M.A.; ASSIS, R.A.; MARTINS, N.E.; FERNANDES, A.A.; BARRIOS, P.R.; COSTA, T.J.R.; GUIMARÃES, L.M.C. *Macrorhabdus ornithogaster* in ostrich, rhea, canary, zebra finch, free range chicken, turkey, guinea-fowl, columbina pigeon, toucan, chuckar partridge and experimental infection in chicken, japanese quail and mice. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58(3): 291-298. 2006.

MATSUMOTO, F.E.; RUIZ, L.S.; GANDRA, R.F.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.; COSTA PIRES, M.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. Mycopathologia. 154: 63-69. 2002.

MATTHEWS R.C. Pathogenicity determinants of *C. albicans*: potencial targets for immunotherapy? Microbiology. 140: 1505-1511. 1994.

MEYERS, S.P.; AHEARN, D.G. Implication of yeasts and yeast like fungus in marine processes. Veroeff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl. 5:321-338. 1974.

MITROVIC, S.; KRANJCIC-ZEC, I.; ARSIC, V.; DZAMIC, A. *In vitro* proteinase and phospholipase activity and pathogenicity of *Candida* species. Journal of Chemoterapy. 7(4): 43-45. 1995.

MOMOTANI, E.; KIRYU, M.; OHSHIRO, M.; MURAKAMI, M.; ASHIDA, Y.; WATANABE, S.; MATSUBARA, Y. Granulomatous lesions caused by *Pseudomonas aeruginosa* in the ostrich (*Struthio camelus*). J. Comp. Pathol. 112 (3): 273-282. 1995.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. Int. Journal Microbiology. 292: 405-419. 2002.

MURRAY, P.R. Manual of Clinical Microbiology. Washington, ASM Press. 1999.

NEWPORT, G. & AGABIAN, N. Kex2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. The Journal of Biological Chemistry. 272 (46): 28954-28961. 1997.

NIEWERTH, M. & KORTING, H.C. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses. 44: 361-367. 2001.

ODDS, F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. J. Antimicrob. Chemother. 39: 1696-1699. 1993.

ODDS, F.C. Pathogenesis of *Candida* infections. Journal of the American Academy of Dermatology. 31(3): 2-5. 1994.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GUICAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis. 60(5): 280-283. 2007.

ORSI, R. B.; SOUZA, C. A. I.; SILVA, E. G; PAULA C. R. BARONI, F. A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* em criatório de psitacídeos. Anais do V Congresso/X Encontro da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Animais Silvestres. 2002.

PANIZO, M.M.; REVIKINA, V.; FLORES, Y.; GLAD, W.M. Actividad de fosfolipasas y proteasas em aislados clínicos de *Candida* spp. Rev. Soc. Vem. Microbiol. 25(2). 2005.

PAIXÃO, T.A.A; NASCIMENTO E.F.; PARRA, P.N.S.; SANTOS, R.L. Aspergilose em avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil. Ciência Rural. 34(2): 573-576. 2004.

PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the southern area of São Paulo, State of São Paulo, Brazil. Revista de Microbiologia, Brasil. 14: 136-143. 1983.

PEREIRA, J. R.; CAMPOS, S. G.; ORSI, R. B.; PAULA, C. R.; BARONI, F. A. *Cryptococcus neoformans* isolados de excretas de aves colhidas em pet-shops. Anais da XV Reunião do Instituto Biológico de São Paulo. 2002.

PERELMAN, B.; KUTTIN, E.S. Aspergillosis in ostriches. Avian Pathology. 21:159-163 1992a.
PERELMAN, B.; KUTTIN, E. Zygomycosis in ostriches. Avian Pathology. 21: 675-680. 1992b.

PFALLER, M.A. Epidemiology of candidiasis. J. Hosp. Infect. 30: 329-338, 1995.

PICHOVÁ, I.; PAVLICKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJSI, E.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; WEBER, J.; RUMML, T.; SOUCEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* and *C. lusitaniae*. Eur. J. Biochem. 268: 2669-2677. 2001.

POLAK, A. Virulence of *Candida albicans* mutants. Mycoses. 35(1): 9-16, 1992.

POONACHA, K.B.; DONAHUE, J.M. Acute clostridial hepatitis in an ostrich. J. Vet Diagn Invest. 9(2):208-210. 1997.

PRICE, M.F.; CAWSON, R.A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 20: 7-14. 1997.

PRICE M.F. Plate Methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. Sabouraudia 20: 15-20. 1982.

PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *C. albicans*. Sabouraudia, 13: 110-115. 1975.

PURCHIO, A.; PAULA, C.R.; GAMBALE, W. Molds from some beaches in the Southern Area of São Paulo state Baixada Santista, Brazil. Revista de Microbiologia, Brasil. 19(2): 166-171. 1988.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol producing yeasts from fruits and tree barks. Lett Appl. Microbiol. 47(1): 19-24. 2008.

REMOLD H. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *C. albicans*. Biochim. Biophys. Acta, 167: 399-408. 1968.

RIBEIRO M.A. Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas. Dissert. Mestr. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2002.

RIPEAU, J.S.; AUMONT, F.; BELHUMEUR, P.; ZEICHNER, L.O.; REX, J.H.; REPENTIGNY, L. Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 46(9): 3096-3100. 2002.

RIPPON, J.W. The pathogenic fungi and the actinomycetes. Medical Mycology. W.B. Saunders Company; Philadelphia, USA. 89-99p. 1988.

ROUSSEAU, C. G.; DALZIEL, J. B. Aspergillus pneumonia in an ostrich (*Struthio camelus*). Aust. Vet. J. 57(3): 151-152. 1981.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia. 20: 233-234. 1982.

RUCHEL, R. A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. Zentralbl Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. 257(2): 266-274. 1984.

SAMARAYANAKE, I.P.; RAESIDE, J.M.; MAC FARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. J. Clin. Med. 22: 201-207. 1984.

SAMSON, J. Behavioral problems of farmed ostriches in Canada. Can Vet J. 37: 412-414. 1996.

SAMSON, J. Prevalent diseases of ostrich chicks farmed in Canada. Can. Vet. J. 38: 425-428. 1997.

SANTOS, E.R. Avaliação físico-química da carne de avestruz (*struthio camelus*) jovem e adulto criados no Estado de São Paulo. Msc dissertação. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 1999.

SANTOS, E.R.; SILVA, T.J.P.; FRANCO, R.M.; BARBOSA, A.S.; SOUZA, D.C. Enumeração, identificação e resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp em carne de avestruz (*Struthio camelus*) submetida à radiação gama. Revista Higien Alimentar 21 (155): 59-63. 2007.

SATO, Y.; AOYAGI, T.; KOBAYASHI, T.; INOUE, J. Occurrences of candidiasis in a Fisher's lovebird and a budgerigar. J. Vet. Med. Sci. 63(8): 939-941. 2001.

SCHALLER, M.; JANUSCHKE, E.; SCHACKERT, C.; WOERLE, B.; KORTING, H.C. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. J. Med. Microbiol. 50: 743-747. 2001.

SEGABINAZI, S.D.; FLÔRES, M.L.; KOMMERS, G.D. Megabacteriose em emas (*Rhea americana*) no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciênc. Rural. 34:959-960. 2004.

SEVCIKOVA, Z.; LEDECKY, V.; CAPIK, I.; LEVKUT, M. Unusual manifestation of tuberculosis in an ostrich (*Struthio camelus*). Veterinary Record, 145 (24): 708. 1999.

SHANE, S.M. Infectious diseases and parasites of ratites. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 14(3): 455-483. 1998.

SHIMIZU, M.T.; ALMEIDA, N.Q.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, G.S. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses*. 39:161-167. 1996.

SHIVAPRASAD, H.L. Hepatitis associated with *Clostridium difficile* in an ostrich chick. *Avian Pathol*. 32(1):57-62. 2003.

SILVA, E.H.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; AULER, M.E.; GIUDICE, M.; MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C.R. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo*. 49(6): 349-353. 2007.

SOTIRAKI, S.T.; GEORGIADES, G.; ANTONIADOU-SOTIRIADOU, K.; HIMONAS, C.A. Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*). *Vet. Rec.*, 148: 84-86. 2001.

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

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHAUSER, J. Differential activation of *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97(11):6102-6107. 2000.

STANKUSHEV, K.H.; ALEKSANDROV, M.; DUPARINOVA, M.; ENCHEV, S.; VRANSKA, T.S. *Candida* infections in farm animals and birds. *Vet Med Nauki* 15(3):11-18. 1978.

TANG, J.; WONG, R.N.S. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *Journal of cellular Biochemistry*. 33: 53-63. 1987.

TERZICH, M.; VANHOOSER, S. Postmortem findings of ostriches submitted to the Oklahoma Animal Disease Diagnostic Laboratory. *Avian Diseases*. 37: 1136-1141. 1993.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, I.P.; ANNAIX, V.; ROBERT, T.; SENET, J.M. Fungal cell adhesion in *Candida albicans*. *Eur. J. Epidemiol*. 7: 23-33. 1991.

TULLY, T.N.; SHANE, S.M. Husbandry practices as related to infectious and parasitic diseases of farmed raptors. *Review in Science technology* 1, 73-89. 1996.

VALLE, R.P. Resíduos de Antimicrobianos em alimentos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 7(7): 206-208, 1985.

VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. Proteases de Microrganismos. *Braz. J. Microbiol*. 31:25-29. 2000.

WERNER H. Untersuchungen über die Lipase-Aktivität bei Hefen und hefeähnlichen Pilzen. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. A*. 200: 113-24, 1966.

WALLACH, J.D.; BOEVER, W.J. Diseases of exotic animals: Medical and Surgical Management. W. B. Saunders Company, 1159 p. 1983.

WEINFELD, I.; BIRMAN, E.G.; PAULA, C. R. Macrophage phagocytosis of *Candida albicans*: an *in vitro* study. Rev Odontol Universidade São Paulo. 13(3): 233-238. 1999.

YOKOTA, T.; SHIBAHARA, T.; WADA, Y.; HIRAKI, R.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. Aspergillus fumigatus infection in an ostrich (*Struthio camelus*). J. Vet. Med. Sci. 66: 201-201. 2004.

7- ANEXOS

Anexo 1 – Meio Sabouraud dextrose a 4 %

Anexo 2 – Meio de Christensen

Anexo 3 – Meio para verificar produção de fosfolipase

Anexo 4 – Meio para protease

Anexo 5 – Ficha de identificação de leveduras

Anexo 1 – Meio Sabouraud dextrose a 4%

Peptona	10,0 g
Glicose	40,0 g
Agar-agar	15,0 g
Água destilada	1,0 L

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

Anexo 2- Meio de Christensen

Peptona	1,0 g
Dextrose	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico	1,2 g
Fosfato de potássio	0,8 g
Vermelho de fenol	0,012 g
Ágar-ágar	15,0 g

Adição de 2,4 g do meio de composição básica em 95 mL de água destilada. Autoclavação a 115°C por 20 minutos. Resfriamento a 50°C. Introdução de 5,0 mL de solução de uréia a 40 %. Homogeneização e distribuição o meio em placas

Anexo 3 – Meio para verificar produção de fosfolipase

Preparação de gema de ovo

Gema de ovo _____ 80,0 g

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 membrana da gema na composição final.

Meio ágar fosfolipase

Ágar Sabouraud dextrose.....	65,0g
NaCl.....	57,3g
CaCl ₂	0,55g
Água destilada.....	1000 mL

Autoclavação a 120°C por 20 minutos, resfriamento a 50°C, adição de gema de ovo, homogeneização e deistribuição em placa.

Anexo 4 - Meio para protease (RUCHEL et al., 1982)

Solução de estoque (filtrada p/1000mL)

Albumina bovina (BSA) fração V (Sigma)	2,0g
Protovit (Roche)	1,0g
Água destilada	100mL

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

Solução Base (“Yeast Carbon Base”)

YCB (difco)	11,7g
Ágar	18,0g
Água destilada	900mL

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

Anexo 5 – Protocolo de identificação de leveduras

PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS
Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais
DMIV - UFRRJ

PROCEDÊNCIA : _____ REGISTRO : _____

OBSERVAÇÕES :

1- EXAME DIRETO :

2- CRESCIMENTO EM MEIOS USUAIS :
 CRESCIMENTO EM MEIO COM ÁCIDO GRAXO :

3- MICROCULTIVO E TUBO GERMINATIVO :

PM : BL : AR : TG : CL : OUTROS :

4- ASCOS E ASCOSPÓROS :
 POSITIVOS :

5- OUTRAS PROVAS :
 SÍNTESE DO AMIDO :
 PRODUÇÃO DE MELANINA :
 TTC :

6- AUXANOGRAMA

KNO ₃	6- RAFINOSE	14- XILOSE
PEP	7- TREALOSE	15-ERITRITOL
N-ACETIL -D-GLUCOSAMINA	8- RAMNOSE	16-ADONITOL
1-LACTOSE	9- CELOBIOSE	17-MANOSE
2- GLICOSE	10- GALACTOSE	18- DULCITOL
3- SACAROSE	11- INULINA	19-ARABINOSE
4- MELIBIOSE	12-MELEZITOSE	20-FRUTOSE
5- MALTOSE	13- INOSITOL	21-XILITOL

7- ZIMOGRAMA

1-RAFINOSE :
 2-GLICOSE :
 3-LACTOSE :
 4-MALTOSE :
 5-SACAROSE :
 6-TREALOSE :
 7-GALACTOSE :

IDENTIFICAÇÃO :