

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA DE *CANDIDA SPP.* DE CAVIDADE ORAL DE AVES SELVAGENS RECEBIDAS PELO ZOOLOGICO DE SOROCABA

ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF ANTIFUNGAL RESISTENCE OF CANDIDA SPP. IN THE ORAL CAVITY OF WILD BIRDS RECEIVED BY THE SOROCABA ZOO

R. P. SILVA^{1*}; C. R. AFFONSO¹; M. P. PEÇANHA¹;
M. R. MERCEDES¹; R. M. N. A. BLAITT¹; R. H. F. TEIXEIRA^{1, 2, 3}

RESUMO

Os Centros de Triagens de Animais Selvagens e Jardins Zoológicos recebem animais silvestres resgatados de vida livre, constituindo uma rica fonte de material biológico para pesquisa científica. Sugere-se que o aumento do resgate destas aves se deve ao crescente sinantropismo e ao avanço da urbanização. Esses animais podem ser reservatórios de diversas espécies de microrganismos de importância clínica. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Candida spp.* multirresistentes na cavidade oral de aves selvagens resgatadas pelo zoológico de Sorocaba. Um total de 40 amostras foram coletadas da cavidade oral das aves com uso de *swab* estéril. A identificação e as determinações dos perfis de suscetibilidade antimicótica para *Candida spp.* foram realizadas usando o kit de disco de sensibilidade fúngica. Das amostras, três espécies de leveduras foram identificadas: *Candida krusei* em seis amostras (19,3%); *Candida albicans* em dez amostras (32,3%) e *Candida tropicalis* em 15 amostras (48,4%). Além disso, sete amostras foram isoladas de microrganismos que não foram objeto desta pesquisa. Para a avaliação da resistência antifúngica foram utilizados quatro antifúngicos: itraconazol 10 mcg, nistatina 100 UI, fluconazol 25 mcg e cetoconazol 50 mcg. Identificamos que todas as amostras de *Candida spp.* foram sensíveis a nistatina e resistentes ao fluconazol. Os demais antifúngicos apresentaram eficácia variável a depender da espécie de *Candida*. O presente estudo é importante para uma melhor aplicação de tratamentos que necessitam do uso de antifúngicos.

PALAVRAS-CHAVE: Antifúngicos. Aves silvestres. Farmacorresistência Fúngica. Leveduras. Zoológico

SUMMARY

Wildlife Rehabilitation Centers and zoos receive rescued wild animals from their natural habitats, constituting a rich source of biological material for scientific research. It is suggested that the increase in the rescue of these birds is attributed to the growing synanthropy and urbanization. These animals can serve as reservoirs for various species of clinically important microorganisms. The aim of this study was to investigate the presence of multiresistant *Candida spp.* in the oral cavity of wild birds rescued by Sorocaba Zoo. A total of 40 samples were collected from the oral cavity of the birds using sterile swabs. Identification of *Candida* species and determination of antifungal susceptibility profiles were performed using a fungal sensitivity disk kit. Among the collected samples, three yeast species were identified: *Candida krusei* 6 samples (19.3%); *Candida albicans* in 10 samples (32.3%), and *Candida tropicalis* in 15 samples (48.4%). Additionally, seven samples contained fungi that were not the focus of this research. To assess antifungal resistance, four antifungal agents were tested: Itraconazole 10 mcg, nystatin 100 UI, fluconazole 25 mcg, and ketoconazole 50 mcg. We identified that all *Candida spp.* samples were sensitive to nystatin and resistant to fluconazole. The other antifungal agents exhibited variable importance for enhancing the application of treatments that require the use of antifungal agents.

KEY-WORDS: Antifungal Agents. Drug Resistance, Fungal. Wild birds. Yeasts. Zoo

¹ Universidade de Sorocaba (UNISO), Sorocaba, São Paulo, Brasil.

* Autor correspondente: renatapro@gmail.com.

² Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Botucatu), Botucatu, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem no mundo mais de 200 zoonoses, e representam 60% das doenças infecciosas humanas. A pandemia de COVID-19 é uma demonstração implacável do impacto da doença zoonótica na população humana (HOLMES, 2022). Além dos vírus também há acometimento por patógenos fúngicos que podem ser oriundos de uma doença zoonótica, os principais patógenos fúngicos de importância médica pertencem aos gêneros *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Cryptococcus spp.* sendo considerados patógenos oportunistas (ABDOLI; *et al.* 2021).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância e Saúde (ANVISA), fungos são capazes de colonizar o homem e animais, podendo causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. Em aves são frequentemente associadas com morbidade e mortalidade, e podem ser influenciadas por fatores como estresse, idade e condição de saúde ave. A melhoria das técnicas preventivas e regimes terapêuticos aumentam a capacidade de combater os patógenos fúngicos. No entanto, poucos estudos foram realizados a respeito de fungos isolados em animais silvestres (RITCHIE, *et al* 1994). A *Candida spp.* é um excelente modelo para investigar a patogênese fúngica por inúmeras razões. Primeiro, é um patógeno preocupante porque tem alta prevalência em certas regiões geográficas. As espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* juntas representam cerca de 90% de todas as infecções da corrente sanguínea por *Candida spp.* e estão entre as causas mais comuns de infecções fúngicas sistêmicas em seres humanos (KÄMMER; *et al.*2020). Já em aves a *Candida spp.* frequentemente é associada a problemas gastrointestinais em aves, a espécie mais comumente isolada é a *C. albicans*, porém outras também podem se manifestar (RITCHIE, *et al* 1994).

O crescente aparecimento de diferentes cepas de *Candida spp.* resistentes aos antifúngicos azólicos, como fluconazol, itraconazol, cetoconazol que são os mais comumente utilizados nos tratamentos, confirma a importância da monitoração de possíveis mudanças na distribuição das cepas envolvidas nos processos infecciosos, assim como alterações de seus padrões de sensibilidade (MÍMICA; *et al.*, 2009).

O uso indiscriminado de antifúngicos estimula a ocorrência de fungos com suscetibilidade diminuída e/ou resistência, principalmente entre as espécies de *Candida spp.* (BRION; *et al.* 2007). Essas espécies de fungos se adaptam rapidamente ao ambiente hostil por meio de diversos métodos e características, resultando em altas taxas de mortalidade. (SANTOS; *et al.* 2022).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar e determinar a incidência de leveduras pertencentes ao gênero *Candida spp.* a partir de amostras provenientes da cavidade oral de aves resgatadas de vida livre, considerando-as com potencial zoonótico, e verificar a resistência antifúngica.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho descreve o comportamento de leveduras do gênero *Candida* frente aos fármacos antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções causadas pelo fungo *Candida* (CAMPOS, *et al* 2020). Foi realizado o levantamento de espécies de *Candida spp.* presentes na microbiota da cavidade oral de aves silvestres e posteriormente análise laboratorial da resistência dessas espécies a quatro antifúngicos principais, sendo eles: itraconazol, nistatina, fluconazol e cetoconazol. Nessa pesquisa foram realizadas as coletas de *swabs* de cavidade oral de 40 espécimes de aves silvestres, em novembro de 2022. Foram estudadas amostras de aves das ordens *Piciformes*, *Psittaciformes*, *Passeriformes*, *Columbiformes*, *Galliformes*, *Falconiformes*, *Anseriformes*, *Strigiformes* e *Nyctibiiformes* (Tabela 1). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA sob número - 224/2022).

As coletas de material biológico ocorreram durante os exames de triagem das aves, no momento da entrada dos animais no zoológico, por meio de contenção física, com auxílio de luvas de raspa de couro e passaguá. As 40 amostras de *swab* de cavidade oral assim que colhidas foram armazenadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) líquido e incubadas em 30°C para melhor conservação da amostra. Após 24 horas, as amostras foram semeadas em Ágar *Candida* Cromogênico com o auxílio de uma alça de inoculação, através da técnica de esgotamento. Em seguida essas amostras foram incubadas em estufa bacteriológica Q-316-14 (Quimis, Diadema, Brasil) a 35°C por 48 horas e posteriormente foi realizada a leitura das placas.

O Ágar *Candida* Cromogênico permite o isolamento e diferenciação de *Candida spp.* Nesse meio, esses fungos podem ser diferenciados devido à presença de substrato cromogênico na formulação, que produz diferentes colorações para cada espécie de fungo. O crescimento de *C. albicans* apresenta coloração verde, enquanto a coloração azul é característica da espécie *C. tropicalis* e a coloração rosa identifica *C. krusei* (RIBEIRO, *et al* 2009). Após leitura das placas, para confirmar os resultados, foram realizados esfregaços corados pela técnica de gram em todas as culturas. As lâminas foram analisadas em microscópio ótico utilizando objetiva de menor aumento (10X) e de maior aumento (100X) (Figura 1). Com uma alça metálica foi realizada a coleta de todas as amostras de mesma coloração que em seguida foram semeadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) líquido e novamente foram incubadas na estufa bacteriológica Q-316-14 (Quimis, Diadema, Brasil) a 35°C por 24 horas. Assim que essas amostras se turvaram, foi realizado preparação de antifungigrama a partir da semeadura em ágar Sabouraud com um *swab* (CARNEIRO, *et al* 2008). No centro dessas placas foi colocado o disco de sensibilidade fúngica conforme orientação do fabricante e fornecedora CECON (Centro de controle e produtos para diagnóstico Ltda - CECON, São Paulo, Brasil).

Tabela 1 - Relação das aves, com nome comum e científico utilizadas na pesquisa e a quantidade de cada espécie.

Nome comum	Nome científico	Quantidade
Pomba de bando	<i>Zenaida auriculata</i>	1
Bem te vi	<i>Pitangus sulphuratus</i>	4
Carcará	<i>Caracara plancus</i>	1
Corrupião	<i>Icterus jamacaii</i>	1
Corujinha-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	2
Gavião-carrapateiro	<i>Milvago chimachima</i>	1
Jacuaçu	<i>Penelope obscura</i>	1
Jacucaca	<i>Penelope jacucaca</i>	1
Jacurutu	<i>Bubo virginianus</i>	1
Marianinha-de-cabeça-amarela;	<i>Pionites leucogaster</i>	1
Pato-do-mato	<i>Cairina moschata</i>	9
Periquito-maracanã	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	11
Tucano-de-bico-preto	<i>Ramphastos vitellinus</i>	1
Tucano-de-bico-verde	<i>Ramphastos dicolorus</i>	2

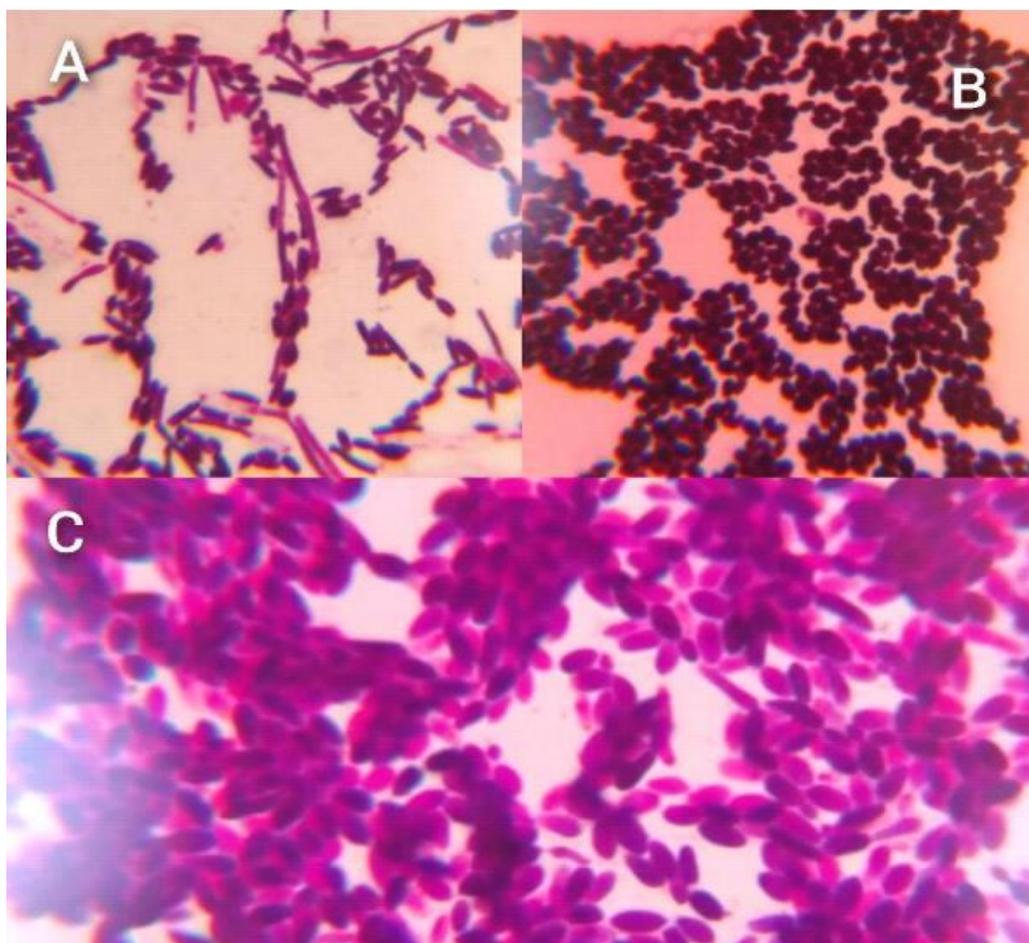


Figura 1 - Fotomicroscopia de espécies de *Candida spp.* (A) *C. albicans*; (B) *C. tropicalis*; (C) *C. krusei*. após coloração de Gram (aumento de 100X).

Neste trabalho foram utilizados para análise os medicamentos e as concentrações; itraconazol 10 mcg, nistatina 100 U.I, fluconazol 25 mcg e cetoconazol 50 mcg (Centro de controle e produtos para diagnóstico Ltda - CECON, São Paulo, Brasil). Essas amostras foram incubadas em estufa bacteriológica Q- 316-14 (Quimis, Diadema, Brasil) à 37°C por 24 horas. Em

seguida, com auxílio de uma régua, foi analisado o tamanho do halo de inibição para determinar a sensibilidade das espécies aos antifúngicos (Figura 2). Como parâmetros foram utilizadas as referências dadas pela fabricante e fornecedora dos discos de sensibilidade fúngica (CECON, Brasil).

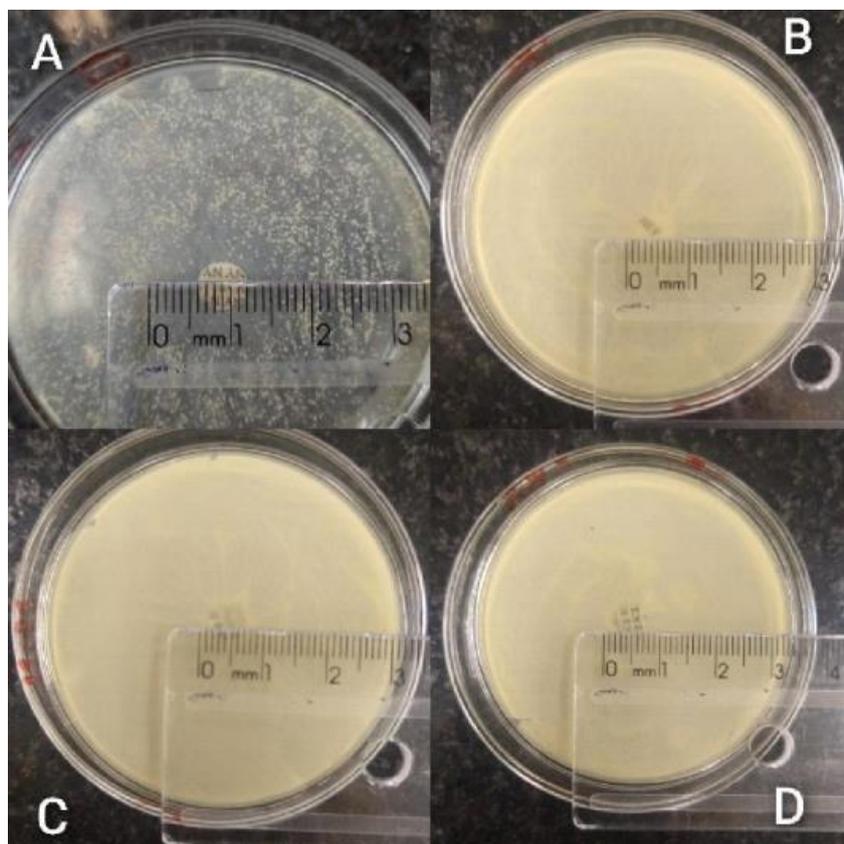


Figura 2 - Resultados de análise de sensibilidade aos antifúngicos na espécie *C. albicans* isolados em meio Sabouraud. (A) sensível a Nistatina 100 U.I; (B) resistente a Cetoconazol 50 mcg; (C) resistente a Fluconazol 25 mcg; (D) resistente a Itraconazol 10 mcg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 40 aves analisadas, 31 amostras apresentaram crescimento de *Candida spp.* Das amostras 15/31 (48,4%) pertenciam à espécie *C. tropicalis*, 10/31 (32,3%) à *C. albicans*, e 06/31 (19,3%) de *C. krusei*. Sete amostras foram isoladas de microrganismos que não foram objeto desta pesquisa. Os resultados mostraram que *C. tropicalis* apresentou sensibilidade à nistatina 100 U.I e resistência a fluconazol 25 mcg e cetoconazol 50 mcg. O itraconazol apresentou resultados intermediários. Já a *C. albicans* apresentou resistência a itraconazol 10 mcg, fluconazol 25 mcg, e cetoconazol 50 mcg. Sendo sensível apenas para nistatina 100 U.I. O fungo *C. krusei* foi a levedura que se mostrou mais sensível, apresentando resistência somente ao fluconazol 25 mcg e resultado intermediário a itraconazol 10 mcg.

As infecções pela levedura da espécie *Candida spp.* são de extrema relevância, pois podem ter origem endógena, ou seja, microrganismos que são presentes na própria microbiota, que devido algum fator predisponente do hospedeiro ou do fungo ocasiona mudança do sítio da levedura levando a manifestação clínica (QUINN, *et al* 2005).

A característica da lesão por *Candida spp.* em aves é um exsudato catarral a mucóide que consiste em placas brancas que podem ou não estar associadas com odor fétido, ficam localizadas na mucosa do trato digestivo. Na maioria das aves silvestres jovens, o papo é o principal local de infecção por *Candida*. Em aves adultas a *Candida* tem sido associada a alimentos impactados, anormalidades do bico e necrose de língua. Embora menos frequentes, também podem ser encontradas fora do trato gastrointestinal (RITCHIE, *et al* 1994).

Analisando a Figura 3 é possível perceber que a maioria das aves que apresentaram resultado positivo para *Candida spp.*, são animais sinantrópicos. Esse resultado apresenta relevância tanto para a medicina humana quanto para a medicina veterinária, já que esses

animais têm contato frequente com pessoas, podendo disseminar diferentes espécies de *Candida spp.* sendo prejudicial principalmente para as aves silvestres que acabam tendo contato com espécies resistentes provenientes dos humanos.

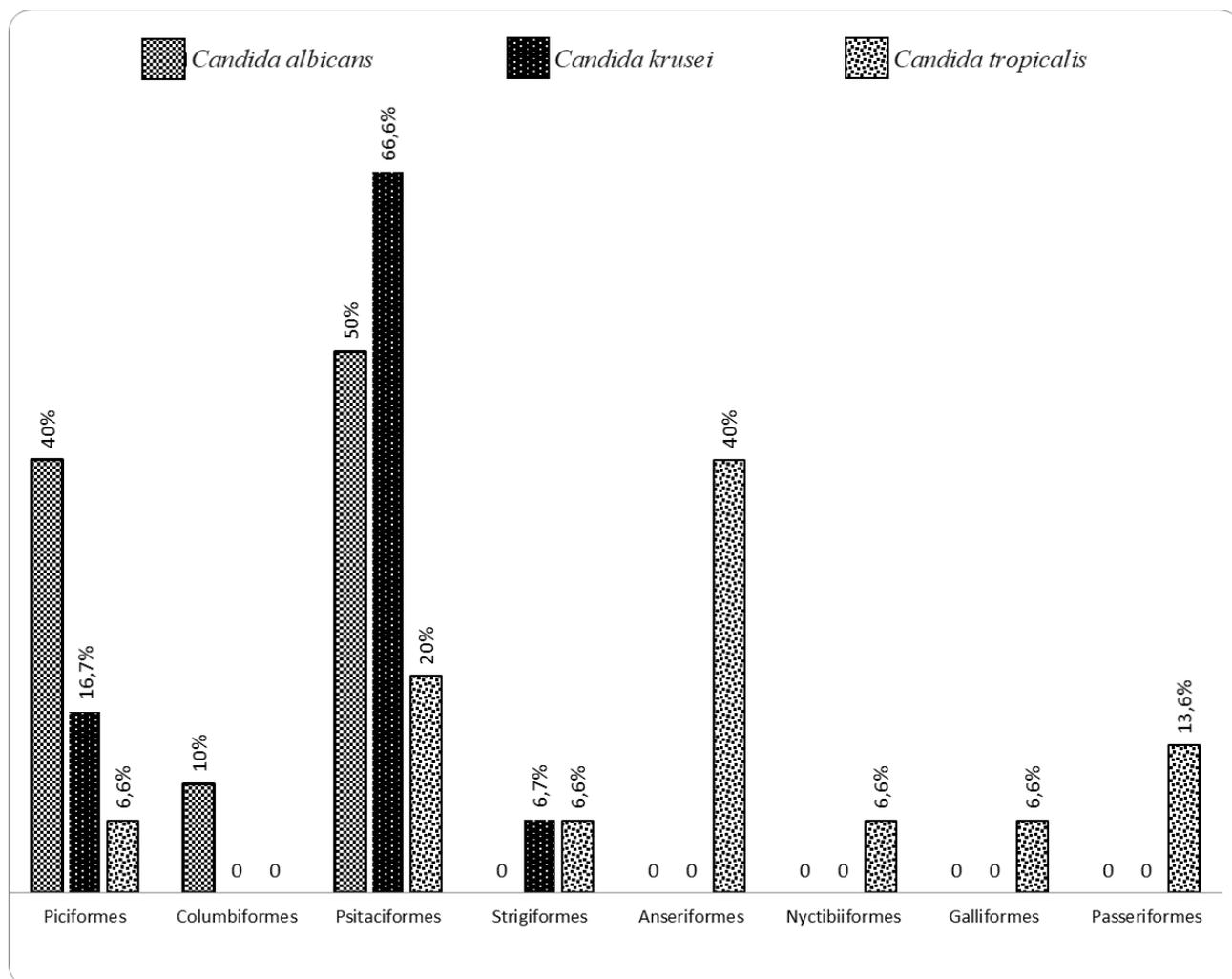


Figura 3 – Gráfico demonstrando porcentagem de isolamento das espécies de *Candida spp.* com as ordens de aves selvagens estudadas

Na América Latina, principalmente no Brasil, estudos demonstram que *C. albicans* aparece como a espécie mais frequente em candidíase. Contudo, destaca-se a crescente identificação de infecções provocadas por outras espécies, sendo a *C. tropicalis* e a *C. parapsilosis* as mais comuns (MIMICA; et al. 2009).

O diagnóstico da candidíase atualmente ainda se encontra consideravelmente complicado tanto na medicina veterinária quanto na humana. A abordagem diagnóstica padrão necessita de hemocultura, o que além de ser um processo demorado, apresenta alto custo, o que acaba dificultando bastante o diagnóstico, considerando as inúmeras espécies de *Candida*. As aves utilizadas nesse estudo, são de vida livre, o que por sua vez implica que esses animais não teriam passado por tratamento com antifúngicos (Figura 3). É possível sugerir que as leveduras presentes na microbiota dessas aves são espécies originalmente humanas que

adquiriram resistência durante o tratamento humano com antifúngicos e foram disseminadas a essas espécies selvagens, outra causa possível para esses resultados seria a resistência adquirida, onde as leveduras se adaptaram e conseguiram ficar menos susceptíveis a alguns antifúngicos e essas adaptações podem ser desde interferências nas ligações do antifúngico com a espécie até variações na genética, diminuindo a suscetibilidade ao fármaco. Nesse sentido, uma maior capacidade de formação de biofilmes aos microrganismos pode resultar na aquisição de resistência, pois essas estruturas promovem a sobrevivência da levedura após a exposição ao fármaco (KSIEZOPOLSKA; GABALDON, 2018).

Sugere-se que esta resistência pode estar associada com o descarte incorreto de medicamentos que foram descartados em lixo comum ou em redes de esgoto, a própria eliminação urinária ou fecal pode ser considerada como um fator. Gerando um grande risco

tanto para saúde humana quanto para animal, pois microrganismos presentes no meio ambiente contaminados por antimicrobianos podem adquirir resistência, visto que tais organismos têm material genético com alta capacidade de mutação. Além de que estes medicamentos afetam o meio ambiente, estão contaminando o solo, alterações no desenvolvimento de plantas e contaminação dos animais e dos humanos que pode acontecer por via oral, respiratória e/ou cutânea (UEDA, *et al* 2009).

O uso indiscriminado de medicamentos antifúngicos e interrupção do tratamento também tem grande responsabilidade no aumento do número de espécimes resistentes. Até o momento não foram desenvolvidas estratégias definitivas para se evitar e combater o aparecimento de resistência a antifúngicos. Entretanto, pode ser possível desenvolver procedimentos semelhantes àqueles que são utilizados para os antibacterianos como, por exemplo, uso adequado nas dosagens de antifúngicos, escolha de um antifúngico mais adequado a um determinado fungo, aderência do paciente ao tratamento, aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico das infecções fúngicas e melhoria no monitoramento da susceptibilidade ou resistência dos isolados fúngicos, além do desenvolvimento de novas drogas e a correta orientação médica tem extrema importância na diminuição das recidivas e resistências fúngicas (VIEIRA; SANTOS, 2017; CAMPOS, *et al* 2020).

CONCLUSÃO

A realização de novos estudos sobre a resistência das diferentes espécies de *Candida spp.* será benéfica tanto a medicina veterinária quanto a medicina humana, já que ambas podem compartilhar da mesma levedura sendo reservatório de transmissão de infecções fúngicas resistentes a drogas comumente utilizadas. Dessa forma é importante ressaltar a importância dos zoológicos e CETAS realizarem pesquisas sobre a diversidade fúngica em animais selvagens, já que essas aves podem ter contato com diferentes espécies, possivelmente resistentes, que em vida livre não teriam contato normalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Flora Nogueira Mattos e Maicon Jeferson Silva de Oliveira.

REFERÊNCIAS

ABDOLI, A.; FALAHI, S.; KENARKOOHI, A. COVID-19: Associated opportunistic infections: A snapshot on the current reports. **Clinical and Experimental Medicine**, v.22, n.3, p.327-346, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Detecção dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos pelo laboratório de microbiologia clínica– Brasília: Anvisa, 2020. 160p.

BRION, L. P.; UKO, S. E.; GOLDMAN, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. **Journal of Infection**, v. 54, n. 6, p. 521–529, 2007.

CARNEIRO, L. C. et al. Identificação de bactérias causadoras de infecção hospitalar e avaliação da tolerância a antibióticos. **NewsLab**, v. 86, n. 1, p. 106-14, 2008.

CAMPOS, T.; et al. Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. **Ciência & Inovação**, v. 5, n. 1, p. 17–23, 2020.

HOLMES, E. C. Covid-19: Lessons for zoonotic disease. **Revista Science**, v. 375, n.6586. p. 1114- 115, 2022.

KÄMMER, P. et al. Survival strategies of pathogenic candida species in human blood show independent and specific adaptations. **American Society for Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 1–21, 2020.

KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDÓN, T. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. **Genes**, v. 9, n. 9, p. 461- 486, 2018.

MÍMICA, L. M. J.; et al. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n.1 p. 17–23, 2009.

QUINN, P. J.; et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: Artmed, p.233-239, 2005.

RIBEIRO, P.M.; et al. Isolamento de *Candida spp.* com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*. **Brazilian Dental Science**, v. 12, n. 4. pág. 40-45, 2009.

RITCHIE, B.W.; et al. Avian medicine: Principles and application. **Wingers Publishing**. Lake Worth, Flórida, 1994. 1353p.

SANTOS, J.G.; et al. Incidência de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em hospitais e o mecanismo de resistência aos fármacos. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 40872-40886, 2022.

UEDA, J. et al. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente on-line**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2009.

VIEIRA, A.J.H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínica**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.