



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

**ENVOLVIMENTO DO COMPLEXO *CANDIDA*
PARAPSILOSIS NA MICROBIOTA DE MASTITES EM
OVELHAS**

Alexandra Isabel Mendes Abrunheiro

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau de
Mestre em Agro-Pecuária

Júri:

Presidente: Doutora, Isabel Rosa Maria Lima Brito Viana Andrade, Professora Adjunta, ESAC

Arguente: Doutora, Célia Maria Brito Quintas, Professora Adjunta, Universidade do Algarve

Orientador: Doutora Teresa Maria Fonseca de Oliveira Gonçalves

Co-orientador: Doutor Fernando José dos Santos Delgado

Coimbra, 2016

“O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Teresa Gonçalves, principal responsável pela concretização deste trabalho. Agradeço o apoio incondicional, incentivo permanente e a partilha do saber, assim como pronta disponibilidade, orientação, paciente leitura, revisão e valiosas sugestões nesta tese. Obrigada principalmente pela aposta e confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientador Professor Fernando Delgado, por poder contar sempre com o seu entusiasmo contagiante e com a sua palavra amiga de reconhecimento e de incentivo a cada momento. O apoio, a disponibilidade e a confiança depositada contribuíram decisivamente para que este trabalho tenha chegado a bom porto.

Ao Dr. José Neves pela amabilidade e pronta disponibilidade em me esclarecer dúvidas e ajudar na recolha das amostras de leite de ovelha.

Aos serviços académicos, nomeadamente o Engenheiro José Maia e Hermínia Cintrão pela ajuda no atendimento e informações desde a matrícula à entrega da versão definitiva desta tese.

A todos os membros do grupo MMYRG, sem exceção pelos momentos de descontração, incentivo e troca de experiência que me proporcionaram. No entanto um especial obrigado pela paciência nestes últimos dias, Marta, Nânci, Márcia e Lisa.

À Marta Mota, pela paciência, ajuda e interpretação em alguns procedimentos. Mas acima de tudo pela força, pelo sorriso e pela disponibilidade com que sempre me deu a mão.

À Nânci Ferreira pela boa disposição e sobretudo pela companhia que me fez ao longo destes trabalhos práticos até madrugada. Sem isso não teria conseguido ultrapassar todas estas metas tão rápido.

À Daniela Antunes pelo apoio em alguns trabalhos práticos particularmente durante o início de Agosto, obrigada pela companhia e disponibilidade.

Aos meus pais e irmão, uma palavra de reconhecimento muito especial para eles, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, souberam ajudar-me. Obrigada pelo apoio prestado, pela compreensão pelo tempo que a cada dia vos subtraí e por estarem sempre a torcer por mim. Obrigada pela paciência e preocupação.

Ao Rui pela amizade e compreensão que esteve sempre presente e nunca me deixou desmoronar, mesmo quando a distância física entre nós se impôs.

Enfim, a todos os que não foram mencionados, mas que de algum modo contribuíram para a concretização deste trabalho, e até mesmo aos que de alguma forma me tentaram deitar abaixo, mas não conseguiram porque cada pedra atirada, serviu de degrau para me levantar e chegar mais alto.

Obrigado a todos!

RESUMO

O consumo de leite de ovelhas e seus derivados contaminados com microrganismos patogénicos constitui um risco de saúde pública. Também na produção de derivados lácteos, a contaminação microbiológica causa perdas económicas. A ocorrência de casos de mastite por fungos leveduriformes pode ser considerada um problema emergente. Entre estes, encontramos as leveduras do complexo *Candida parapsilosis* que engloba 3 espécies, de difícil identificação, recorrendo a metodologias de biologia molecular.

Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar meios de cultura diferenciadores das espécies com a finalidade de elaborar uma nova metodologia de identificação das mesmas, de utilização mais simples e menos onerosa, a aplicar em isolados de mastites em ovelhas.

Numa exploração agrícola foram selecionadas ovelhas com mastites e destas foram realizadas colheitas para isolamento e identificação de leveduras. Não se isolou qualquer levedura a partir dos leites ou das lesões, de acordo com a baixa prevalência de leveduras como agentes de mastites. Conseguiu-se uma formulação do Meio A (cromogénico) que, em conjunto com o Meio C (crescimento diferencial), por um algoritmo simples, permite distinguir *Candida orthopsilosis*, de *Candida parapsilosis* e de *Candida metapsilosis*. De 47 estirpes testadas apenas 3 não mostraram concordância com o algoritmo proposto.

PALAVRAS-CHAVE:

Candida parapsilosis, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, meios diferenciadores, mastite em ovelhas, leveduras.

ABSTRACT

The consumption of sheep milk and its derivatives contaminated with pathogenic microorganisms represents a risk to immunocompromised individuals and is considered a public health problem. In the production of dairy products, microbiological contaminations can affect the quality and shelf-life of the final product, causing considerable damage. The occurrence of sporadic cases of mastitis caused by yeast fungi can be seen as emerging. Among these, the *Candida parapsilosis* complex includes three species that are difficult to identify, *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*, only distinguished by molecular biology methods.

This study aimed to develop and validate several differentiating culture media for the three species of the *Candida parapsilosis* complex, with the purpose of drawing up a new identification methodology to be applied in sheep mastitis isolates.

Briefly, a formulation of a Medium A (chromogenic), together with a Medium C (differential growth), through a simple algorithm, distinguishes between *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis*. From 47 different strains tested only three were discordant. According to its low prevalence as mastitis agents, no yeasts were isolated from the harvested milk or from the observed lesions, restraining the use of the differentiating media on these samples.

KEYWORDS: *Candida orthopsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, differentiating media, mastitis in sheep, yeast.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	2
3. Revisão Bibliográfica.....	3
3.1 Biologia e taxonomia do género <i>Candida</i> spp.	3
3.2 Leveduras do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	4
3.3 Mastites	5
3.3.1 Mastite – definição	5
3.3.2 Tipos de Mastites.....	5
3.3.3 Causas das mastites	6
3.3.3.1 Mastite por <i>Candida</i> spp	6
3.3.5 Sinais clínicos e lesões	7
3.3.6 Diagnóstico.....	7
3.3.7 Tratamento e Profilaxia	8
4. Material e Métodos.....	9
4.1 Amostras em estudo	9
4.1.1 Colheita de amostras e isolamento de bactérias e leveduras a partir de leite de ovinos	9
4.1.2 Coleção de leveduras do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	11
4.2 Condições de cultura e crescimento das estirpes de levedura	12
4.3 Optimização de meios diferenciais para a identificação das leveduras do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	12
4.3.1 Desenvolvimento de meios de cultura diferenciadores	12
4.3.1.1 Meio A (Substância A).....	13
4.3.1.2 Meio X (Substância X).....	14
4.3.1.3 Meio F (Substância X em YNB).....	14

4.3.1.4 Meio B (Substância B).....	15
4.3.1.5 Meio C (Substância B em YNB).....	15
4.3.2 Inoculação dos meios diferenciadores	15
4.3.3 Técnica de inoculação por "spotting"	16
4.4 (Re)-Identificação de isolados de leveduras por biologia molecular	16
4.4.1 Extração de DNA pelo método de isopropanol	16
4.4.2 Quantificação de DNA	17
4.4.3 Preparação das misturas para reação de PCR do fragmento ITS-5.8S.....	17
4.4.4 Re-identificação de leveduras identificados como <i>C. parapsilosis</i> por PCR de SADH e restrição com Ban I.....	18
5. Resultados	20
5.1 Colheita de amostras e isolamento de bactérias e leveduras do leite	20
5.2 Otimização de meios de cultura diferenciais específicos para a identificação de leveduras do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	21
5.2.1 Inoculação das leveduras	21
5.2.2 Temperatura	22
5.2.3 Alteração de cor e/ou de crescimento nos meios específicos	22
5.2.3.1 Substância A	22
5.2.3.2 Substância B.....	24
5.2.3.3 Substância X	26
5.2.3.4 Ensaio de inoculação pela técnica de “spotting”	27
5.2.3.5 Tipos de riscado das leveduras.....	29
5.3 Utilização dos meios diferenciais na discriminação das 3 espécies em estudo. Algoritmo de identificação.	29
5.4 Re-identificação das espécies do complexo <i>Candida parapsilosis</i> por técnicas de biologia molecular (sequenciação do gene SADH e restrição com Ban I).....	30
5.4.1 Identificação por sequenciação de ITS-5.8S	31
5.4.2 Re-identificação das leveduras do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	32
6. Discussão.....	34
7. Conclusão	38
8. Referências Bibliográficas	39

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Quantidade de estirpes do complexo <i>Candida parapsilosis</i> identificadas e utilizadas no processo de validação.	11
Tabela II - Interpretação dos resultados obtidos nos meio A, B e C.....	30
Tabela III - Leveduras submetidas a re-identificação por biologia molecular.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Blastoconídio e pseudo-hifa em leveduras.	3
Figura 2 - Algumas colónias de <i>C. parapsilosis</i> em meio sólido YPD.	4
Figura 3 - Esquema geral de obtenção de isolados a partir de leite de ovinos.	11
Figura 4 - Levedura isolada por esgotamento em meio sólido YPD.	12
Figura 5 - Placa de Petri com Meio A (I) e microplaca de 6 poços com Meio A (I) e Meio X (II).	13
Figura 6 - Modo de riscado no Meio A numa placa de Petri.	15
Figura 7 - Suspeita de levedura numa amostra de leite espalhada em meio de Columbia (I) e observação ao microscópio 100x (II).	20
Figura 8 - Riscado de <i>C. parapsilosis</i> a partir de uma suspensão de leveduras de 0,5 da escala Mc Farland com ansa calibrada de 1 µL (I) e de 10 µL (III) e a partir de uma cultura em meio sólido com ansa calibrada de 1 µL (II).	21
Figura 9 - Riscado com palito (I), ansa calibrada de 1 µL (II) e ansa calibrada de 10 µL (III) a partir de leveduras isoladas em YPD sólido, em Meio X e em Meio A, após 24 h a 30 °C.	21
Figura 10 - <i>C. metapsilosis</i> (I) e <i>C. parapsilosis</i> (II) riscadas em Meio A com concentrações 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L, após 5 dias de incubação a 37°C.	23
Figura 11 - Quantidade representativa de leveduras estudadas no Meio A.	23
Figura 12 - Resultado no Meio B em microplaca de 6 poços após 72 h de incubação a 37 °C. <i>C. orthopsilosis</i> (I), <i>C. parapsilosis</i> (II), <i>C. metapsilosis</i> (III).	24
Figura 13 - Quantidade representativa de leveduras estudadas no Meio B.	25
Figura 14 - Quantidade representativa de leveduras estudadas no Meio C.	25
Figura 15 - Resultado no Meio C em placa de Petri após 72 h de incubação a 37 °C.	26
Figura 16 - Resultado no Meio X em microplaca de 6 poços com 0,1 g/L e 0,2 g/L.	26
Figura 17 - Meio X preparado com várias concentrações de YNB (0,001%	27
Figura 18 - Resultado da inoculação pela técnica de “spotting” no Meio A após 4 dias de incubação a 37 °C.	28
Figura 19 - “Spotting” no Meio B e no Meio C após 72 h de incubação a 37 °C.	28
Figura 20 - Técnicas de inoculação das leveduras em microplacas de 6 poços.	29
Figura 21 - Resultados no Meio A, Meio B e Meio C em placa de Petri após 72 h a 37 °C.	30
Figura 22 - Identificação de algumas amostras pela técnica de sequenciação da região ITS- 5.8S do rDNA.	32
Figura 23 - Re-identificação de leveduras por restrição de SADH com a enzima Ban I.	33
Figura 24 - Resultados obtidos pelo Meio A, B e C em percentagem.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

atm – Pressão atmosférica

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – Pares de base

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (nucleótidos do DNA formados por Adenina, Citosina, Guanina e Timina)

D.O. – Densidade óptica

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético

Gram⁺ – Gram positivo

Gram⁻ – Gram negativo

ITs – Internal Transcriber Spacers

MALDI-TOF MS – Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PCR – Polymerase Chain Reaction

rpm – Rotação por minuto

SAB-CL – Sabouraud com Cloranfenicol

SADH – Secondary Alcohol Dehydrogenase

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TCM – Teste Californiano de Mastites

UV – Ultra-violeta

°C – Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos é uma atividade agro-pecuária praticada em todo o mundo, para exploração de leite, lã e carne. No que diz respeito à produção de leite de ovino, este ocupa o quarto lugar na produção mundial, contribuindo com 1,3% do total, em comparação com outras espécies animais produtoras de leite (Spanamberg *et al.*, 2014).

A contaminação do leite por leveduras afeta a produtividade das criações e está na origem de alterações das características físicas e organolépticas do leite. Por consequência afeta a qualidade dos derivados do leite causando perdas económicas para as explorações de processamento do leite e dos seus subprodutos (Chen *et al.*, 2003; Fleet, 1990) e torna-se um risco para o consumidor quando o produto é ingerido em cru, ou mesmo transformado.

Também relacionado com possíveis contaminações do leite, temos as mastites, inflamação da glândula mamária caracterizada por alterações físico-químicas e microbiológicas no leite e no tecido glandular mamário, podendo destruí-lo parcial ou totalmente, dependendo do agente microbiano envolvido (Coutinho *et al.*, 2006) que “atacam” principalmente o gado de produção leiteira (bovinos, caprinos e ovinos). A mastite é um sério problema económico no contexto da pecuária. Os prejuízos ocorrem tanto na quantidade quanto na qualidade do leite produzido, com consequências no segmento da produção dos derivados lácteos (Spanamberg, 2009). É uma das maiores causas de perdas económicas na criação de animais produtores de leite e, consequentemente, na produção de derivados do leite.

Os custos decorrentes e a elevada morbidade e mortalidade associados a estas infeções relevam a importância destas “enfermidades” como problema preocupante de saúde pública (Arsenault *et al.*, 2008).

A correta identificação das espécies microbianas contaminantes dos produtos de consumo humano e de infeção humana permite o estabelecimento de procedimentos de profilaxia e de terapêuticas mais eficazes.

2. OBJECTIVOS

Este trabalho constitui o relatório final de Mestrado em Agro-Pecuária, da Escola Superior Agrária de Coimbra. Foi realizado no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra em colaboração com o Departamento de Ciências Zootécnicas da Escola Agrária de Coimbra.

As grandes linhas condutoras deste trabalho consistiram na otimização e validação de meios de cultura diferenciais para a distinção de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis* e a aplicação desta nova tecnologia a leveduras isoladas de leite de ovino.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Desenvolvimento e otimização de meios diferenciais para a discriminação de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*;
- Validação destes meios utilizando uma coleção de leveduras previamente identificadas por biologia molecular e pertencentes à coleção de leveduras do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- Isolamento e identificação da presença de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* em mastites em ovelhas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biologia e taxonomia do género *Candida* spp.

As leveduras são fungos unicelulares (Reino Fungi), cuja unidade funcional é o blastoconídio (Figura 1). De acordo com De Hoog *et al.* (2000) levedura é um termo descritivo para qualquer fungo unicelular que se reproduz por gemulação, uma das formas de reprodução assexuada no Reino Fungi.

As leveduras do género *Candida* pertencem à divisão Ascomycota, na qual podemos citar, para além deste, o género *Saccharomyces* e da divisão Basidiomycota, na qual podemos encontrar os géneros *Trichosporon* e *Rhodotorula*.

Devido à sua capacidade adaptativa, as leveduras podem desenvolver-se tanto na presença de oxigénio como sem ele (anaerobiose). Na maioria das vezes reproduzem-se assexuadamente, por meio de estruturas denominadas conídios, sendo que pode ocorrer reprodução sexuada, ausente nalgumas espécies do género *Candida*. As leveduras do género *Candida* são microrganismos pleomórficos, existindo aproximadamente 200 espécies de leveduras. Caracterizam-se por serem heterotróficos, tendo como substância de reserva o glicogénio (Paula *et al.*, 1999; Lacaz *et al.*, 2002). As leveduras apresentam distribuição ubíqua na natureza, podendo ser encontradas em homens ou animais, solo, água, vegetais, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares (Colombo, 2003).

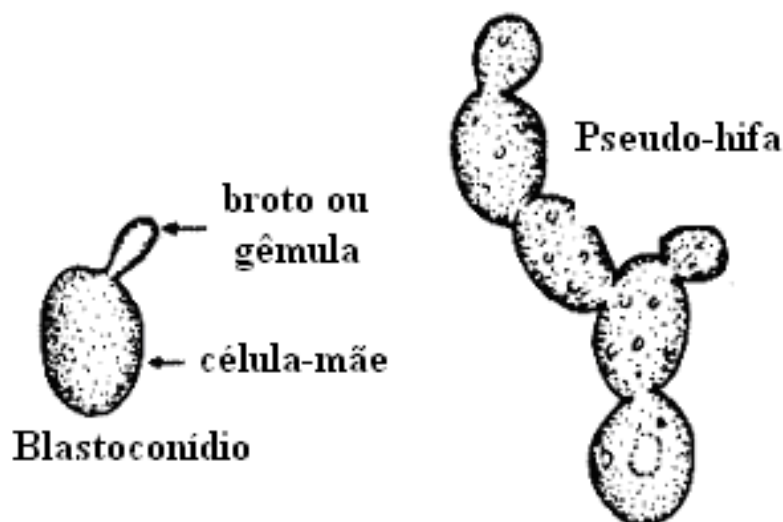


Figura 1 - Blastoconídio e pseudo-hifa em leveduras (www.google.pt/url).

3.2 Leveduras do complexo *Candida parapsilosis*

Candida orthopsilosis e *Candida metapsilosis* são duas novas espécies que juntamente com *Candida parapsilosis* formam o complexo *Candida parapsilosis* e apresentam algumas variações genéticas em relação à *C. parapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005).

C. parapsilosis possui células de forma oval, redonda ou cilíndrica. As colónias, em agar de Sabouraud ou em YPD ("Yeast Extract-Peptone-Dextrose"), são de cor branca, cremosas, brilhantes e lisas ou enrugadas (Figura 2). *C. parapsilosis* pode existir quer na forma de levedura ou exibindo pseudohifas ou hifas (Roilides *et al.*, 2004; Benjamin *et al.*, 2008).

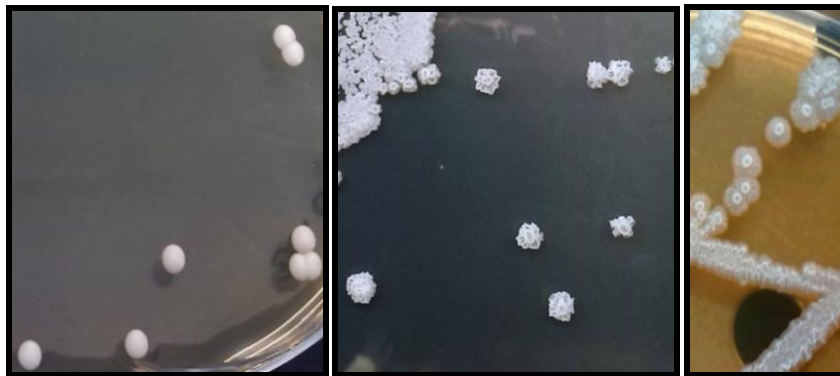


Figura 2 - Algumas colónias de *C. parapsilosis* em meio sólido YPD.

C. parapsilosis, enquanto ainda considerada como uma única espécie, foi descrita como um fungo envolvido em infeções hospitalares. Em 2005 foi descrito que na realidade se tratava de um grupo com 3 espécies diferentes, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). Julgava-se então que, só *C. parapsilosis* era patogénica para ao Homem, mas rapidamente se percebeu que também as outras duas espécies podem estar envolvidas em infeções sistémicas (Paulo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Barbedo *et al.*, 2015). Os únicos métodos atualmente disponíveis para a identificação destas espécies baseiam-se em metodologias de biologia molecular, por análise de ácidos nucleicos. A primeira destas metodologias incluía uma reação de polimerase em cadeia ("Polymerase Chain Reaction" ou PCR) seguida de uma reação de restrição dos fragmentos de DNA obtidos com uma endonuclease (Tavanti *et al.*, 2005). Esta metodologia, por ser tecnicamente complexa, apenas estava disponível para alguns laboratórios, nos quais não se incluíam os laboratórios de diagnóstico microbiológico. Entretanto, o grupo de investigação liderado pela mesma investigadora que descreveu pela primeira vez as 3 espécies do complexo *Candida parapsilosis*, desenvolveu um método de discriminação usando também a análise de ácidos nucleicos mas recorrendo à técnica de MALDI-TOF MS, "matrix-assisted laser desorption

ionization-time of flight mass spectrometry” (De Carolis *et al.*, 2014). Esta última metodologia é um recurso dispendioso, apenas disponível em laboratórios de grandes hospitais.

3.3 Mastites

3.3.1 Mastite – definição

Mastite (do grego "mastós", seio e o sufixo -ite, do grego "itis", inflamação) define-se como a reação inflamatória da glândula mamária à presença de agentes microbiológicos, agentes químicos, lesões térmicas ou lesões físicas. A resposta inflamatória desenvolve-se na glândula mamária, verificando-se um aumento de proteínas plasmáticas e células leucocitárias sanguíneas mobilizadas do sangue para o tecido mamário (Aires, 2010).

A maioria dos casos, em todas as espécies leiteiras, associa-se a uma etiologia bacteriana e, em menor proporção aos organismos encontrados no meio ambiente, nos quais se incluem os fungos filamentosos e os fungos leveduriformes. A aderência de qualquer microrganismo aos tecidos do interior da glândula mamária favorece a instalação da infecção, dificultando a sua remoção mecânica pelo fluxo do leite durante a ordenha.

Os organismos ambientais, tipicamente encontrados onde os animais são alojados, são os transmitidos pelo ambiente ao úbere, através de estrume, do material das camas, ou mesmo água.

Apesar da ampla distribuição dos fungos filamentosos na Natureza, apenas esporadicamente foram descritos casos de mastite. Dentro destes, as leveduras são os fungos que mais frequentemente são encontrados em infecções da glândula mamária em animais produtores de leite (Chengappa *et al.*, 1984; Keller *et al.*, 2000).

Estes agentes envolvidos na mastite proliferam no ambiente dos animais leiteiros, tais como na pele do teto, nas mãos dos ordenhadores e em outros substratos orgânicos (Richard *et al.*, 1980; Barnett *et al.*, 2000). Geralmente esta infecção ocorre sob a forma de surtos de curta duração e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato (Carbon, 1968).

3.3.2 Tipos de Mastites

As mastites podem classificar-se de acordo com os sinais clínicos em mastites clínicas, onde além das alterações do leite aparece um edema no úbere do animal, inflamação e dor no úbere; em mastites subclínicas, onde não são assinaláveis alterações no úbere e, na maioria dos casos, nem no leite.

Quanto ao tipo de resposta do sistema imunitário, as mastites podem ser classificadas em mastites hiperagudas, mastites agudas, mastites sub-agudas e mastites crônicas. As primeiras têm um começo repentino, aparecendo uma inflamação severa e uma reação sistêmica marcada, que pode conduzir à morte do animal; mastites agudas, quando têm um começo repentino e manifestações clínicas graves mas sem reações sistêmicas; mastites sub-agudas, quando a inflamação não é muito evidente mas as alterações no leite são persistentes; e mastites crônicas, nas situações de longos períodos de descargas celulares elevadas, mas sem pôr em risco a vida do animal (Radostits *et al.*, 2007).

De acordo com a origem dos agentes infecciosos, as mastites classificam-se em mastites ambientais e mastites contagiosas.

3.3.3 Causas das mastites

As bactérias são os agentes isolados e identificados com maior frequência em casos de mastite ovina, no entanto, as leveduras também podem infectar a glândula mamária das ovelhas (<http://suffolktv.webnode.pt/products/mastite-ovina/>).

A maioria dos casos de mastite ocorre com a penetração dos microrganismos via canal do teto, durante ou entre as ordenhas, assim como durante a administração intramamária de antibióticos (Crawshaw *et al.*, 2005). Também pode aparecer em consequência do tipo de ordenha (mecânica ou manual) e de outros fatores relativos à higiene de equipamentos e instalações utilizados.

Vários aspetos influenciam o aparecimento de mastite micótica, entre eles o mau funcionamento do sistema de ordenha, água utilizada, o manejo inadequado da ordenha, a falta de higiene e a limpeza das instalações e dos equipamentos, além do uso prolongado de terapia antimicrobiana por via intramamária (Ruz-Perez *et al.*, 2004; Yamamura *et al.*, 2007).

3.3.3.1 Mastite por *Candida* spp

Os organismos pertencentes ao género *Candida* vivem normalmente em saprobiose, mas em circunstâncias propícias podem desenvolver o seu potencial patogénico. Usualmente, a presença de *Candida* spp no leite ocorre sem que haja patogenia associada, embora possa causar mastite nas formas subclínica, clínica ou crónica (Wawron & Szczubial, 2001; Spanamberg, 2009).

As mastites micóticas são classificadas em primárias e secundárias. As primárias ocorrem espontaneamente, não sendo precedidas por infeção bacteriana e/ou tratamento com antibacterianos, durante as primeiras semanas de lactação. A secundária, que é a mais frequente, desenvolve-se após casos de mastite bacteriana e/ou de tratamento antibacteriano

via intramamária. Ela pode ocorrer de forma aguda ou crónica, especialmente após tratamentos repetitivos (Carbon, 1968).

3.3.5 Sinais clínicos e lesões

Há que lembrar que uma vez que a mastite é uma inflamação da glândula mamária, a primeira abordagem para a deteção de mastites é a observação dos sinais de inflamação do úbere. O desenvolvimento das mastites pode ser dividido nas formas subclínica, aguda e crónica.

Na forma subclínica o leite tem aspeto normal e não há sintoma visível de inflamação do úbere, caracterizando-se por diminuição da produção leiteira e por aumento do número de células somáticas no leite (Gross *et al.*, 1978; Green, 1984). Na forma aguda são observadas modificações no aspeto natural do leite, assim como sinais evidentes de inflamação, como o edema, o aumento de temperatura, o endurecimento e dor na glândula mamária, o aparecimento de grumos, pús ou qualquer outra alteração das características do leite. Na forma crónica ocorrem modificações macroscópicas no leite (Bradley, 2002) e podem observar-se nódulos e abscessos no parênquima mamário e úberes aumentados e endurecidos. A mastite crónica é geralmente consequência de mastite aguda ocorrida durante a lactação que não foi detetada (<http://suffolkvt.webnode.pt/products/mastite-ovina/>).

3.3.6 Diagnóstico

Para a identificação do agente etiológico envolvido, podem-se colher amostras para análise imediata ou então podem estas ser congeladas, mas por períodos inferiores a 10 dias pois, após este limite, a viabilidade das leveduras começa a decrescer (Spanamberg *et al.*, 2008).

Atualmente, existem diversos procedimentos utilizados para facilitar a rotina laboratorial de identificação dos fungos leveduriformes. Os métodos clássicos incluem o exame direto, a cultura em meio Sabouraud e a identificação por testes bioquímicos com base no perfil de assimilação de substratos existentes, como o sistema de galerias API 20[®] C e API[®] 32 (bioMérieux, SA). Existem ainda outros recursos, mais dispendiosos e com tecnologias mais avançadas como sejam métodos baseados na aglutinação de partículas de látex como o Bichro Latex[®] (Fumouze Diagnostics), as técnicas de biologia molecular com a PCR, ou a análise de perfis de DNA ou de proteínas por MALDI-TOF. Para além disso, a análise de sequências do DNA dos ITSs ("Internal Transcriber Spacers") e do rDNA 5.8S, ou do rDNA 18S, permitem-nos discriminar as espécies de leveduras por comparação com sequências de estirpes-tipo depositadas em bases de dados referenciadas como é o caso do NCBI ("National Center for Biotechnology Information"), tal como realizado em isolados

fúngicos de variadas proveniências (Guillamón *et al.*, 1998; Paulo *et al.*, 2009). No entanto, a utilização desses testes, ou outros disponíveis, tem um custo elevado tendo uma baixa procura para o diagnóstico fúngico nos laboratórios de medicina veterinária.

Destaca-se ainda a utilização dos meios cromogénicos, como o CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson), o Candida ID (bioMérieux SA), o *Brilliance Candida Agar* (Oxoid) ou o *CandiSelect 4* (Bio-Rad) que podem ser usados na triagem inicial e na identificação rápida de espécies patogénicas como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Nas mastites subclínicas em ovinos recorre-se a métodos indiretos, por contagem de células somáticas pelo Teste Californiano de Mastites (“California Mastitis Test” ou TCM) (Blowey & Edmonson, 2000).

O reagente de TCM é um detergente com um indicador de pH que, quando misturado com o leite em partes iguais, liberta o material nuclear das células do leite. Estas células incluem as que resultam da descamação fisiológica do epitélio do úbere e as células de defesa da glândula mamária. O resultado do teste é observado através da viscosidade da mistura (leite com reagente). No caso dos ovinos, somente as reações negativas ou classificadas como fortemente positivas (que se tornam viscosas ou gelatinosas em contacto com o reagente TCM) são facilmente interpretadas, enquanto as reações intermediárias são duvidosas (Fthenakis, 1995; Mota, 2008).

3.3.7 Tratamento e Profilaxia

As práticas higiénicas inadequadas prejudicam a qualidade do leite e favorecem a ocorrência de mastite por isso é importante a prevenção. As instalações como a sala de ordenha e o curral de espera, por onde circulam os animais antes, durante e após a ordenha, devem ser mantidas limpas e secas para evitar a multiplicação de microrganismos. Na limpeza diária, é fundamental a remoção das fezes para reduzir a proliferação de moscas e outros parasitas, e os utensílios e objetos de ordenha devem ser limpos e desinfetados após cada ordenha.

A correta higiene do ordenhador também é relevante, tanto pelas mãos como através das toalhas utilizadas para a desinfecção antes da ordenha, podendo ser um veículo transmissor de microrganismos, entre eles leveduras, as quais podem contaminar o úbere, o leite e todo o material utilizado.

Outro cuidado também recomendado é imergir os tetos pré e pós-ordenha com desinfetante germicida. Os animais com diagnóstico de mastite crónica devem ser descartados para além da correta manutenção dos equipamentos de ordenha com a finalidade de evitar traumatismos mecânicos no úbere e/ou tetos das ovelhas (Radostis *et al.*, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras em estudo

4.1.1 Colheita de amostras e isolamento de bactérias e leveduras a partir de leite de ovinos

Para a realização deste estudo foram utilizadas várias amostras de leite de ovelha colhidas numa exploração de ovinos no distrito de Coimbra.

Optimizou-se um procedimento de identificação de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* de modo a aplicar a um problema prático ou seja, a possíveis agentes existentes nas mastites.

Para o isolamento de microrganismos no leite ou em amostras de mastites colhidas com zaragatoa utilizou-se o meio Columbia (Oxoid, CM0331), próprio para o cultivo de bactérias, e o meio Sabouraud com Cloranfenicol (SAB-CL; bioMérieux, 51021), um meio seletivo recomendado para a cultura e o isolamento das leveduras e de fungos filamentosos a partir de colheitas clínicas. Após espalhamento das amostras, as placas de Petri foram colocadas a 37 °C para o desenvolvimento de bactérias, e a 30 °C para o desenvolvimento de fungos. Na exploração agro-pecuária selecionada para a colheita de amostras estão implementados alguns cuidados de higiene. Assim, é usado um gel dermatológico (Iberklin, I-619-G) para limpeza do úbere dos animais. Este gel contém componentes antibacterianos que inibem o desenvolvimento de microrganismos. Após a aplicação do gel, o úbere é seco com papel de celulose e recolhe-se o leite individualmente. No final da ordenha os tetos são submergidos numa solução designada Selador de tetos em base ácido láctico (Iberklin, I-632-G) que, para além de hidratar e ajudar na distinção dos animais tratados, previne infeções das glândulas mamárias.

Antes da colheita de amostras para este estudo, foi realizada a limpeza da zona da recolha com soro fisiológico (NaCl a 0,9%) estéril, seguida de secagem com gaze estéril. Foi colhido o 1º jacto de leite para um tubo Falcon® estéril e depois foi passada uma zaragatoa estéril nessa mesma zona, sem ferir o canal de recolha. As amostras foram mantidas no frio (acumulador de gelo) desde a recolha até ao laboratório, tendo o transporte até ao laboratório decorrido nas 3 horas seguintes.

Após a colheita, as zaragatoas foram colocadas num erlenmeyer com meio líquido de enriquecimento, ou seja, com meio rico (YPD líquido). Meio este constituído por 1% de extracto de levedura (Panreac-Cultimed, 403687.1210), 1% de peptona (Panreac-Cultimed,

403695.1210) e 2% de glucose (Sigma, G8270), tendo o cuidado de colocar o meio suficiente para que toda a zaragatoa se encontrasse imersa em meio. Estas ficaram em estufa a 30 °C, com agitação 120 rotações por minuto (rpm) durante 3 a 4 h.

Antes do espalhamento das amostras de leite foi realizada uma centrifugação para concentração dos microrganismos aí presentes. Esta centrifugação foi realizada (centrífuga Universal 320R, Hettich) a 9000 rpm durante 20 min, após a qual foi descartado o sobrenadante e guardado o sedimento com um pouco de líquido.

Tendo-se verificado que essas amostras continham uma elevada quantidade de bactérias, fizeram-se diluições seriadas de 1/10 para plaqueamento no meio Columbia, adequado ao crescimento de bactérias, enquanto que para o meio de SAB-CL, específico para a cultura de leveduras, foi usada a suspensão inicial. Usaram-se 100 µL de cada suspensão em meio sólido de Columbia e em SAB-CL, ambos em triplicado. As placas de SAB-CL foram colocadas a 30 °C e as placas de Columbia a 37 °C durante pelo menos 3 dias.

Após 3 dias as placas foram observadas. Foram realizadas observações ao microscópio para verificação dos microrganismos cultivados nos meios de cultura, em coloração de Gram e em preparações a fresco entre lâmina e lamela. Todas as colónias observadas com morfologia suspeita de leveduras foram isoladas em meio sólido de YPD a 30 °C. Meio este, sendo constituído por 0,5% de extracto de levedura, 1% bacto-peptona, 2% de glucose e 2% de agar.

Os isolados obtidos a partir de leite de ovinos, seriam mantidos a -80 °C, numa solução de glicerol 50%. O esquema geral de obtenção destes isolados (colheita, cultura primária, isolamento e identificação) está ilustrado na Figura 3.

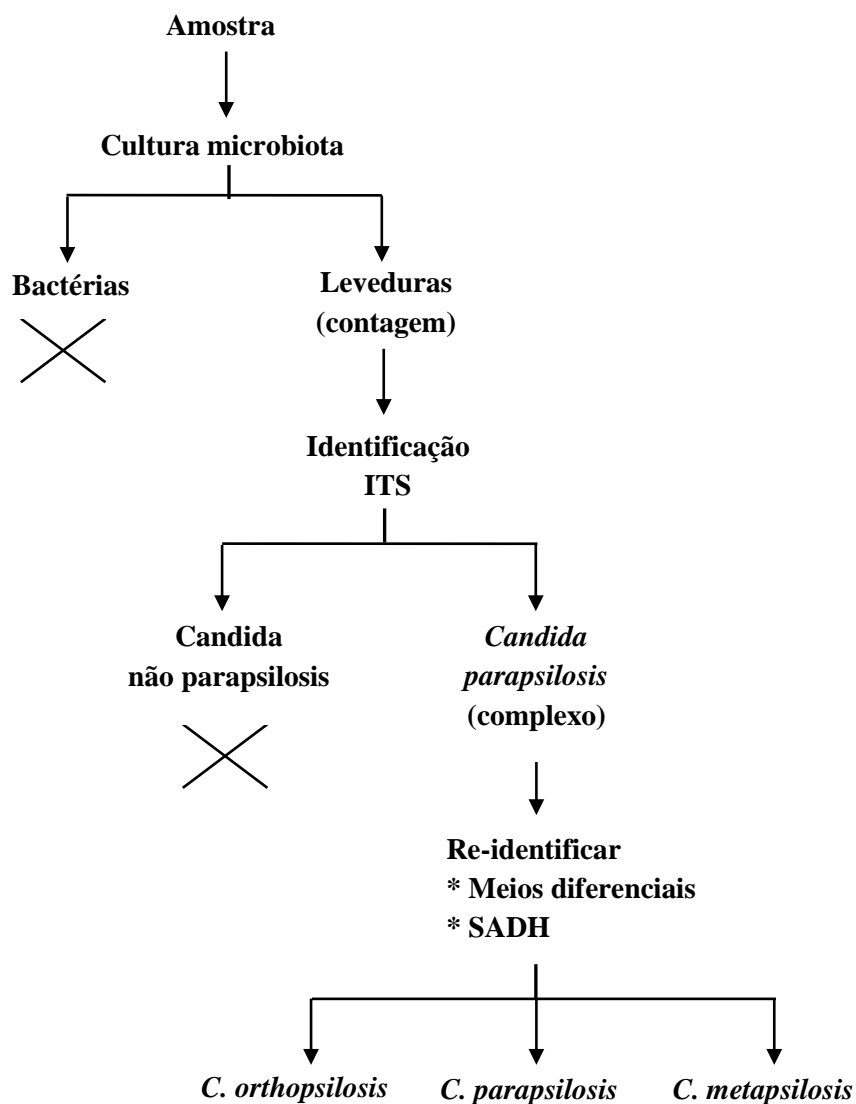


Figura 3 - Esquema geral de obtenção de isolados a partir de leite de ovinos.

4.1.2 Coleção de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*

No decurso deste trabalho usaram-se 48 estirpes de leveduras do grupo *Candida parapsilosis* depositadas na coleção de fungos patogénicos do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, previamente identificadas em *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis* (Tabela I).

Tabela I - Quantidade de estirpes do complexo *Candida parapsilosis* identificadas e utilizadas no processo de validação.

Espécie	Número de estirpes
<i>Candida orthopsilosis</i>	12
<i>Candida parapsilosis</i>	24
<i>Candida metapsilosis</i>	12

4.2 Condições de cultura e crescimento das estirpes de levedura

Uma vez que um dos objetivos principais deste trabalho foi o desenvolvimento de meios de cultura diferenciais, a metodologia utilizada foi diversificada, tendo-se experimentado vários meios de cultura. Assim, na descrição dos meios de cultura diferenciam-se os meios para isolamento, os meios de crescimento e manutenção das leveduras, e os meios diferenciadores para a identificação das 3 espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Para o crescimento de rotina utilizou-se o meio sólido YPD esterilizado em autoclave à temperatura de 121 °C, à pressão atmosférica de 1,2 atm, durante 15 minutos e por fim distribuído em placas de Petri com 90 mm de diâmetro.

As estirpes foram mantidas neste meio de YPD e, sempre que necessário, incubadas à temperatura de 30 °C durante 2 a 3 dias, de modo a obter-se culturas frescas (Figura 4).



Figura 4 - Levedura isolada por esgotamento em meio sólido YPD.

4.3 Otimização de meios diferenciais para a identificação das leveduras do complexo *Candida parapsilosis*

4.3.1 Desenvolvimento de meios de cultura diferenciadores

Foram testadas várias formulações para a obtenção de meios diferenciais ou diferenciadores para a identificação das leveduras do grupo *C. parapsilosis*. Não só foram testadas diferentes composições como, também várias condições, como o pH, o tempo de esterilização e a temperatura de incubação.

No dia anterior ao ensaio foram preparadas as soluções stock e material necessário para o ensaio. No dia do ensaio fez-se o meio final em microplacas de 6 poços e em placas de Petri

de 90 mm de diâmetro. Cada placa de Petri recebeu cerca de 25 mL de meio de cultura não solidificado (Figura 5 I) e 7 mL por poço da microplaca (Figura 5 II). Após a solidificação do agar fez-se a sementeira destes meios diferenciais pela técnica do riscado. Após o riscado, as placas foram mantidas em estufa, observando-se o resultado após 48 a 72 h. Os ensaios dos meios diferenciais foram realizados com culturas de leveduras obtidas em meio sólido, YPD, com um tempo de crescimento não inferior a 2 dias nem superior a 3 dias.

Os meios específicos usados foram o Meio A¹ (meio base suplementado com a Substância A), o Meio X¹ (meio base suplementado com a Substância X), o Meio F (YNB w/o aa suplementado com a Substância X), o Meio B¹ (meio base suplementado com a Substância B) e o Meio C¹ (YNB w/o aa suplementado com a Substância B).

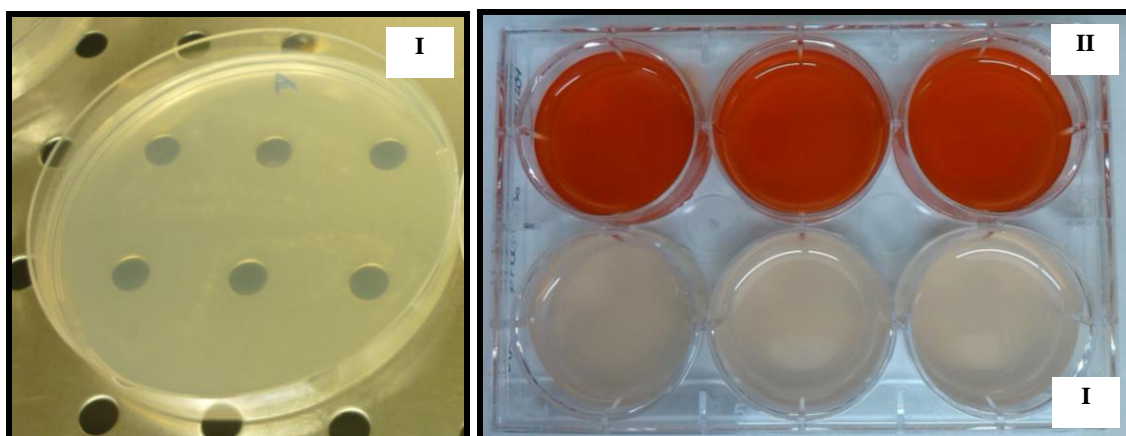


Figura 5 - Placa de Petri com Meio A (I) e microplaca de 6 poços com Meio A (I) e Meio X (II).

4.3.1.1 Meio A (Substância A)

Para a preparação do meio final (meio específico) adicionaram-se meio base, tal como descrito a seguir e uma solução contendo Substância A.

O meio base é constituído por KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico; Sigma, 60220), 0,25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio heptahidratado; Sigma, 63140) a pH 5,5. A solução stock para este meio contém 0,1% de asparagina (Sigma, A0884), 0,1% de glicina (Sigma, 33226), 0,1% de glutamina (Sigma, G3126), 1 mL de solução de biotina 20 mg/L (Sigma, B4501), 1 mL de solução de tiamina 10 g/L (Sigma, T4625) e, como fonte de carbono e energia, 0,05% de glucose (Sigma, G8270). Para a solidificação do meio foi usado agar a 2% (Panreac-Cultimed, 401792). De forma a garantir a esterilidade dos meios, apenas o

¹ Nota importante: uma vez que esta tecnologia se encontra em fase de submissão de Pedido de Patente, os meios diferenciadores aqui descritos passam a ser designados por siglas, de acordo com os princípios ativos dos mesmos. Estes princípios ativos serão designados como Substância A, Substância B e Substância X.

meio base foi autoclavado, a 121 °C, durante 15 minutos; a glucose e os aminoácidos foram esterilizados por filtração através de filtros de 50 mm de diâmetro, com 0,2 µm (Whatman, 10406972).

Foi também preparada a solução com reagente específico, contendo Substância A a 0,1%. Por uma questão prática esta solução foi preparada conjuntamente com a solução de glucose e aminoácidos, tendo-se acertado o pH a 5,5 e filtrado com filtro de 50 mm de diâmetro, com 0,2 µm. Esta solução foi mantida num banho a 55 °C durante alguns minutos.

Neste meio foram testadas ainda várias outras composições/condições: diferentes tipos de riscado em microplaca a 37 °C; adição de diversas concentrações de sulfato de cobalto, CoSO₄ (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM); incubação a diferentes temperaturas e UVs (30 °C; 30 °C com luz enriquecida em UV; 37 °C); diferentes valores de pH (4,5, 5,5 e 7); em microplaca de 6 poços e em placa de Petri. As concentrações da Substância A testadas foram de 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L a 37 °C.

4.3.1.2 Meio X (Substância X)

Este meio foi preparado da forma descrita para o Meio A mas em que o princípio ativo é a Substância X, o qual foi adicionado à concentração final de 0,01%.

A solução com o reagente específico foi preparada com a Substância X em conjunto com a solução de aminoácidos mas sem glucose. Após dissolução, acertou-se o pH a 5,5 e a solução foi filtrada com filtro de 50 mm de diâmetro, com 0,2 µm. Esta solução foi mantida num banho a 55 °C durante alguns minutos.

Neste meio foram testadas as seguintes composições/condições: diferentes temperaturas (30 °C; 30 °C com luz enriquecida em UV; 37 °C); diferentes valores de pH (4,5, 5,5 e 7); substituição da glucose como fonte de carbono e energia por glicerol (0,51%, 0,85%, 1,7% e 3%).

4.3.1.3 Meio F (Substância X em YNB)

Para a elaboração deste meio foi utilizado, como meio base, não uma solução de sais mas sim um meio comercial designado por YNB w/o aa ("Yeast Nitrogen Base" sem aminoácidos; BD Difco, 291940). Foram preparados dois diferentes tipos de Meio F, o Meio 10F com 0,001% de Substância X, e o Meio 100F, com 0,01% de Substância X. A percentagem de agar foi também de 2% e como fonte de carbono e energia foi utilizado o glicerol a 3%.

O meio foi distribuído por placas de Petri e estas guardadas a 4 °C.

4.3.1.4 Meio B (Substância B)

Para a preparação deste meio foram utilizadas as condições e composições descritas em 4.3.1.1, para o Meio A.

A solução com o reagente específico (Substância B) foi preparada com 0,125% da Substância B com a solução de aminoácidos mas sem glucose. Após dissolução, o pH foi acertado a 5,5 e a solução foi filtrada com filtro de 0,2 μm . Esta solução foi mantida num banho a 55 °C durante alguns minutos.

Este meio foi distribuído em microplacas de 6 poços e em placa de Petri a 30 °C e a 37 °C de forma a testar diferentes tipos de cultura.

Para além disso foram testadas várias técnicas de sementeira ("spotting", riscado com palito e com ansa de diferentes volumes).

4.3.1.5 Meio C (Substância B em YNB)

Para a elaboração deste meio foi utilizado YNB w/o aa (BD Difco, 291940). No entanto, foram preparados meios com diferentes concentrações de YNB, a 0,17% e a 0,05%, ambas com sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄; M&B) a 0,5%, e com a Substância B a 0,138%.

As duas soluções, mantidas a 55 °C, foram misturadas e distribuídas pelas placas de Petri.

4.3.2 Inoculação dos meios diferenciadores

Foram realizados ensaios para otimização da técnica de inoculação dos meios diferenciadores de forma a obter os melhores resultados na diferenciação das espécies de leveduras alvo (Figura 6). Utilizou-se o palito estéril e ansas calibradas de 1 μL e de 10 μL .

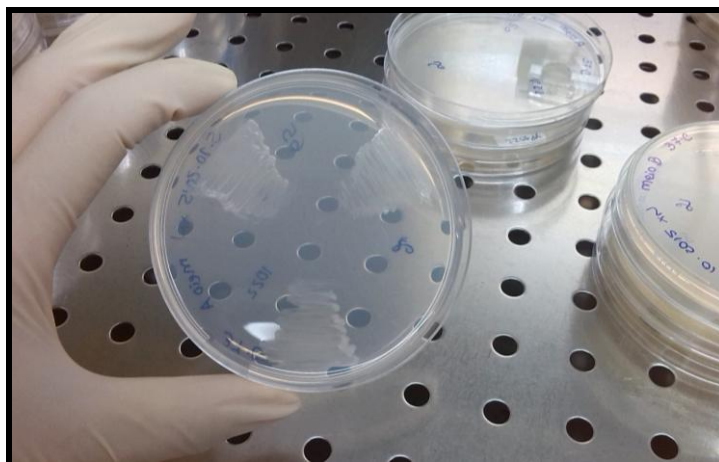


Figura 6 - Modo de riscado no Meio A numa placa de Petri.

Foi ainda feita a tentativa de padronizar a quantidade de leveduras inoculadas nos meios utilizando-se uma suspensão de leveduras (em água destilada estéril) com a absorvância de 0,5 de acordo com a escala de Mc Farland.

4.3.3 Técnica de inoculação por "spotting"

Para as leveduras com resultados inconclusivos no Meio B e no Meio C foram testadas várias diluições seriadas de 1 a 1/100 000. Acertou-se a densidade óptica (D.O.) ao valor de 1 a um comprimento de onda de 600 nm. O "spotting" foi feito com 5 µL de cada diluição numa placa de Petri. As placas foram colocadas em estufa a 37 °C, e os resultados observados após 72 h.

4.4 (Re)-Identificação de isolados de leveduras por biologia molecular

A (re)-identificação de leveduras por biologia molecular foi realizada pela técnica de PCR). A reação de PCR foi feita a partir de DNA total extraído de amostras utilizando o kit Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, D6005) de acordo com as indicações do fabricante, e pelo método do isopropanol (Paulo *et al.*, 2009), o qual se passa a descrever.

4.4.1 Extração de DNA pelo método de isopropanol

A extração de DNA foi realizada a partir de uma suspensão de levedura cultivada em meio YPD líquido num tubo eppendorf. Esta foi deixada em estufa a 30 °C durante a noite com agitação de 100 rpm.

Esta suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 13 000 rpm, a 4 °C (centrífuga Heraeus, Biofuge Fresco). O sobrenadante foi desprezado, ressuspendeu-se o sedimento com água destilada estéril e repetiu-se o passo anterior. Retirou-se então o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento obtido em 500 µL de uma solução de 0,9 M sorbitol e 0,1 M EDTA. Adicionou-se 30 µL de solução de liticase 1mg/mL. Agitou-se no vórtex durante 1 minuto e incubou-se a 37 °C num termobloco (Biosan, TDB-100) durante 1 hora, agitando várias vezes no vórtex de forma a que a liticase possa hidrolisar a parede da célula facilitando assim a extração de DNA.

Em seguida centrifugou-se 5 minutos a 12 000 rpm. Após a centrifugação retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 500 µL de uma solução de 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,4. Adicionou-se 13 µL de uma solução de SDS a 10% e agitou-se no vórtex durante 1 minuto para lavar a solução. Entretanto incubou-se a 65 °C durante 5

minutos, em seguida adicionou-se 200 µL de acetato de potássio 5 M e colocou-se em gelo durante 10 minutos, após o que se centrifugou a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante que daí resultou adicionou-se 700 µL de isopropanol, agitando suavemente. Deixou-se o tubo à temperatura ambiente durante 10 minutos, após os quais se fez nova centrifugação a 12 000 rpm durante 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 500 µL de etanol 70%. Centrifugou-se a 12 000 rpm durante 3 minutos, retirou-se o etanol com muito cuidado. Colocou-se o tubo aberto na câmara de fluxo laminar até evaporação total do etanol. O sedimento foi ressuspensão em 20-25 µL de água estéril. Levou-se ao vórtex e fez-se um Spin.

4.4.2 Quantificação de DNA

No final da extração, procedeu-se à quantificação de DNA. Determinou-se a concentração de DNA em ng/µL, bem como grau de pureza no Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

4.4.3 Preparação das misturas para reação de PCR do fragmento ITS-5.8S

Esta reação de PCR permite, por sequenciação do fragmento de DNA amplificado, identificar as espécies de leveduras.

A mistura da reação consistiu em 36 µL de água Milli Q estéril, 5µL de 10x buffer Complete NH₄⁺ (fornecida juntamente com a taq), 2,5 µL a [10 µM] de cada primer ITS1 e ITS4 (invitrogen), 1 µL de dNTP's a [10 mM] (Soli, 02-21-00400), 1 µL de Taq DFS (Bioron, 101005 – 500 units) com 2 µL de DNA extraído da amostra para um volume final de 50µL. A sequência de oligonucleótidos iniciadores (primers) utilizados foi a seguinte: forward ITS1 ◊ 5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3'; reverse ITS4 ◊ 5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' (Paulo *et al.*, 2009).

O programa utilizado no termociclador (Biometra, T-personal) foram os seguintes: pré-aquecimento a 94 °C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos de amplificação a 94 °C por 10 segundos, “*annealing*” 56 °C durante 20 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% marcado com Red Safe (Intron Biotechnology, IN2114) e visualizados num transiluminador (Vilber Lourmat) com luz ultravioleta.

Para cada amostra foram colocados 2 µL de "loading buffer" com 20 µL de produto PCR em cada poço do gel. O marcador molecular utilizado foi de 100 bp (Fisher Scientific, #SM0241).

Após confirmação do amplificado, o produto de PCR foi purificado, usando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609) seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, as amostras foram enviadas para uma empresa externa “LGC Genomics” para sequenciação.

As sequências obtidas foram usadas comparando com as sequências já disponíveis na base de dados do GenBank utilizando o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), disponível na rede NCBI para identificação da levedura no site www.ncbi.nlm.nih.gov.

4.4.4 Re-identificação de leveduras identificados como *C. parapsilosis* por PCR de SADH e restrição com Ban I

Este método descrito por Tavanti *et al.* (2005) baseia-se na restrição do gene SADH por uma endonuclease. O gene de SADH (“Secondary Alcohol Dehydrogenase”) foi amplificado em várias amostras de *C. parapsilosis* da coleção, usando os oligonucleótidos iniciadores S1F: 5’-GTT GAT GCT GTT GGA TTG T-3’ e SIR: 5’-CAA TGC CAA ATC TCC CAA-3’ (Tavanti *et al.*, 2005). O fragmento de 546 bp resultante da reação de PCR foi digerido com a enzima Ban I (Thermo Scientific, [10 U/μL], 2000 U) para posterior análise do número de fragmentos de restrição obtidos.

A mistura de reação consistiu em 36 μL de água Milli Q estéril, 5 uL de 10x buffer Complete NH₄⁺ fornecido juntamente com a DNA polimerase utilizada (DFS-Bioron, 101005), 2,5 uL a [10 μM] de cada primer S1Fe S1R, 1 μL de dNTP’s a [10 mM] (Soli, 02-21-00400), 1 μL Taq DFS (Bioron, 101005) com 2 μL de DNA extraído da amostra para o volume final de 50 μL.

Os passos do programa utilizado no termociclador foram os seguintes: pré-aquecimento a 94 °C por 2 minutos, seguido de 29 ciclos de amplificação a 94 °C por 10 segundos, “annealing” 48 °C durante 20 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto.

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5% marcado com Red Safe (Intron Biotechnology, IN2114) e visualizados num transiluminador com luz ultravioleta.

As bandas com 700 bp foram cortadas e o produto de PCR foi purificado, usando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609).

Os fragmentos purificados de SADH foram digeridos com a enzima Ban I durante 90 minutos, num volume de reação de 40 μL, contendo 20 μL do produto de PCR, 4 μL do tampão 10x (fornecido com a enzima), 2 μL da enzima Ban I a 10 U/μL (Thermo Scientific,

#ER1001-2000U) e 14 uL de água Milli Q estéril. Os produtos da digestão foram separados num gel de agarose a 1,5%, marcado com Red Safe (Intron Biotechnology, IN2114). O tampão de corrida utilizado foi TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA) e o marcador de peso molecular de DNA foi o marcador molecular de 100bp (Fisher Scientific, #SM0241). As bandas foram visualizadas no transiluminador com luz ultravioleta e fotografadas no Geldoc (Bio-Rad, Universal Hood II) com o software Quantity One[®] (Bio-Rad), distinguindo entre *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* de acordo com o padrão de restrição descrito por Tavanti *et al.* (2005).

5. RESULTADOS

O presente estudo decorreu ao longo de um ano em que se fez a parte final da optimização de meios de cultura diferenciais para a distinção de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*. A validação destes meios foi realizada com 48 leveduras previamente identificadas por técnicas de biologia molecular de acordo com o descrito por Tavanti e colaboradores (2007), como pertencentes ao grupo *C. parapsilosis*. Como uma das aplicações práticas destes meios realizou-se um estudo com o objetivo de isolar e identificar leveduras deste complexo em situações de mastites em ovelhas. Foi realizada a análise de 16 colheitas de leite de ovelha com mastites.

5.1 Colheita de amostras e isolamento de bactérias e leveduras do leite

Das 12 amostras de jacto de leite e 4 amostras com zaragatoa nenhuma apresentou crescimento de leveduras, pois nos espalhamentos em SAB-CL não surgiu nenhum crescimento de levedura. No meio de Columbia houve crescimento de um grande número de colónias, e destas, algumas colónias suspeitas de levedura (Figura 7 I).

Algumas das colónias suspeitas de serem leveduras foram cultivadas em SAB-CL e colocaram-se numa estufa a 30 °C. Uma dessas apresentou colónias grandes e, por observação microscópica de preparação a fresco com lâmina e lamela (Figura 7 II) identificou-se um microrganismo com dimensões superiores a bactérias. No entanto, após várias as tentativas, por métodos clássicos e de biologia molecular não foi possível identificar essa suspeita de levedura.

Fizeram-se algumas preparações com coloração de Gram de colónias eventualmente suspeitas de serem leveduras, mas constatou-se que eram todas bactérias pelo seu tamanho reduzido observado ao microscópio. Foram observados cocos Gram⁺, cocos Gram⁻, e bacilos Gram⁺.

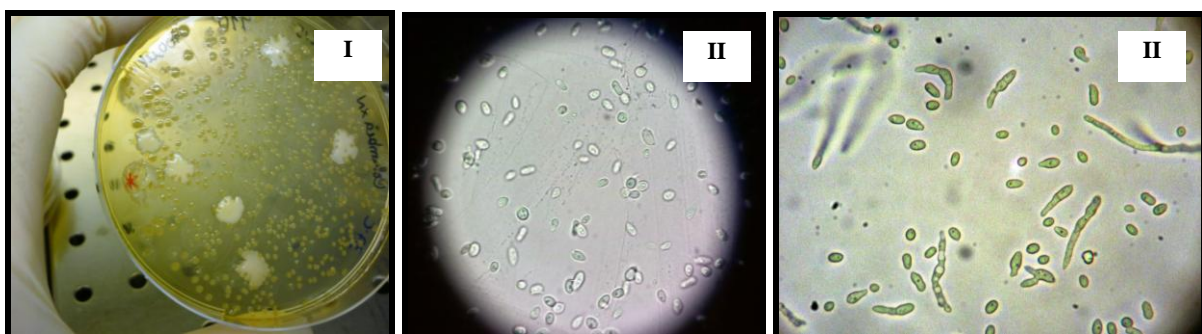


Figura 7 - Suspeita de levedura numa amostra de leite espalhada em meio de Columbia (I) e observação ao microscópio 100x (II).

5.2 Optimização de meios de cultura diferenciais específicos para a identificação de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*

5.2.1 Inoculação das leveduras

Para a inoculação das leveduras nos meios diferenciadores A e X testou-se apenas uma levedura de cada espécie, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, e *C. metapsilosis*.

O riscado feito diretamente da cultura de meio YPD sólido, com uma ansa calibrada de 1 μL teve melhor crescimento que o riscado com ansas calibradas a partir de uma suspensão de 0,5 na Escala Mc Farland (Figura 8).

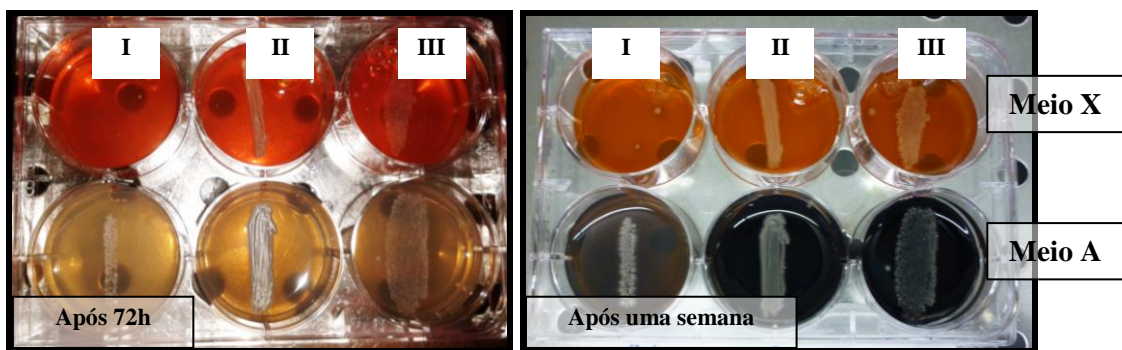


Figura 8 - Riscado de *C. parapsilosis* a partir de uma suspensão de leveduras de 0,5 da escala Mc Farland com ansa calibrada de 1 μL (I) e de 10 μL (III) e a partir de uma cultura em meio sólido com ansa calibrada de 1 μL (II).

Posteriormente testou-se o riscado a partir da levedura isolada mas utilizando um palito de plástico, uma ansa de 1 μL e uma ansa de 10 μL (Figura 9), não se notando diferença no crescimento. Dado este resultado optou-se pela utilização do palito nos ensaios posteriores.

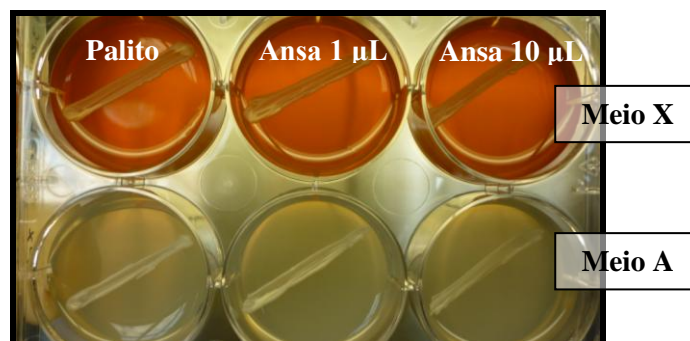


Figura 9 - Riscado com palito (I), ansa calibrada de 1 μL (II) e ansa calibrada de 10 μL (III) a partir de leveduras isoladas em YPD sólido, em Meio X e em Meio A, após 24 h a 30 °C.

5.2.2 Temperatura

À temperatura de 30 °C obtiveram-se resultados significativos após 72 h nos meios com Substância A e com Substância B. A incubação à temperatura de 30 °C com luz enriquecida em UV não resultou em qualquer diferença nos resultados obtidos em qualquer dos meios utilizados concluindo-se ser desnecessária a sua utilização.

A 37 °C, uma vez que o crescimento das leveduras é superior, foi possível observar resultados a partir das 48 h e não só às 72 h, como observado a 30 °C.

5.2.3 Alteração de cor e/ou de crescimento nos meios específicos

5.2.3.1 Substância A

Para este meio foram testadas várias composições já referidas nos Materiais e Métodos no capítulo 4.3.1.1. Este meio, cromogénico, caracteriza-se pelo aparecimento de uma auréola escura (castanho/negro) em redor das leveduras que reagiram positivamente com o meio de cultura e com o princípio ativo do mesmo (Substância A). Assim, os resultados mostraram que as 3 estirpes de leveduras que utilizámos como padrão, representativas das 3 espécies-alvo, YP1022 (*C. orthosilosis*), YP002 (*C. parapsilosis*) e YP0065 (*C. metapsilosis*), só *C. orthosilosis* e *C. parapsilosis* são positivas.

A utilização de sulfato de cobalto (CoSO₄) em diversas concentrações (0,25 mM, 0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM) no meio com a Substância A resultou no aparecimento de uma auréola mais nítida na concentração de 1 mM. No entanto, uma vez que mesmo na ausência de sulfato de cobalto a auréola era nítida, descartou-se a utilização deste composto, considerado desnecessário para a discriminação entre as 3 espécies.

Por outro lado testaram-se várias concentrações da Substância A, 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L concluindo-se que na concentração menor não havia o aparecimento de qualquer auréola. Na Figura 10 mostra-se, como exemplo as leveduras *C. metapsilosis* (não formadora de auréola) e *C. parapsilosis* (formadora de auréola) cultivadas em várias concentrações de Substância A. Ao testar as concentrações 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L da Substância A neste meio, em 0,1g/L não apareceu nenhuma diferença nas espécies, nem houve alteração de cor do meio, nem da cultura. Para as restantes concentrações, *C. orthosilosis* e *C. parapsilosis* apresentaram sempre uma auréola escura em redor do riscado, embora menor na concentração 0,5 g/L.

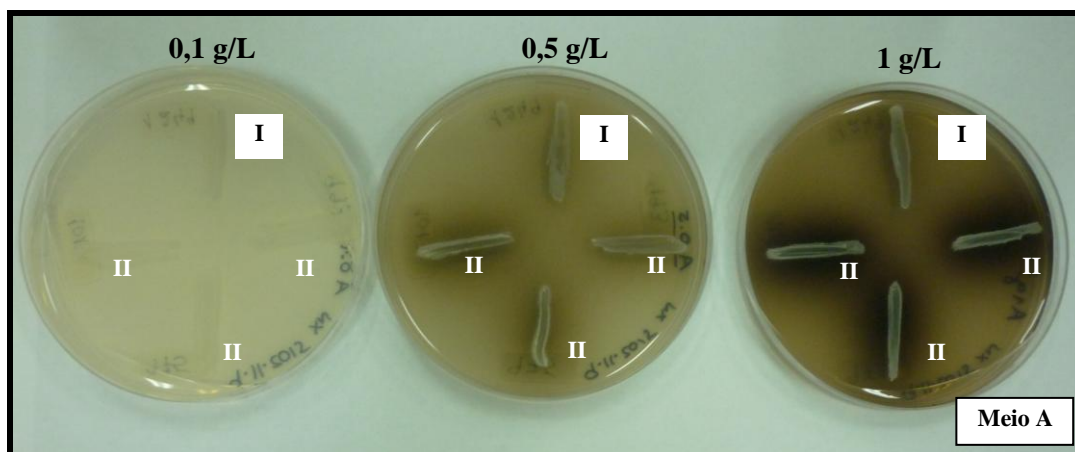


Figura 10 - *C. metapsilosis* (I) e *C. parapsilosis* (II) riscadas em Meio A com concentrações 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L, após 5 dias de incubação a 37°C. Nestas condições é possível observar que *C. metapsilosis* nunca forma auréola enquanto *C. parapsilosis* forma auréola quando a Substância A está em concentrações superiores a 0,5 g/L.

Em conclusão, obteve-se melhor resultado após 24 - 48 h na estufa a 37 °C utilizando-se o Meio A com a concentração de 1 g/L de Substância A.

Assim, uma vez encontradas as melhores condições de meio foram-se testar um conjunto de 48 leveduras da coleção. Destas, 44 apresentaram o resultado esperado, mas 4 (YP336, YP1243, YP1251, YP0079) suscitaram dúvidas no resultado (Figura 11). No entanto, a levedura com a referência YP0079 acabou por ser retirada do estudo pois a re-identificação por biologia molecular mostrou que não se tratava do grupo alvo (capítulo 4.4).

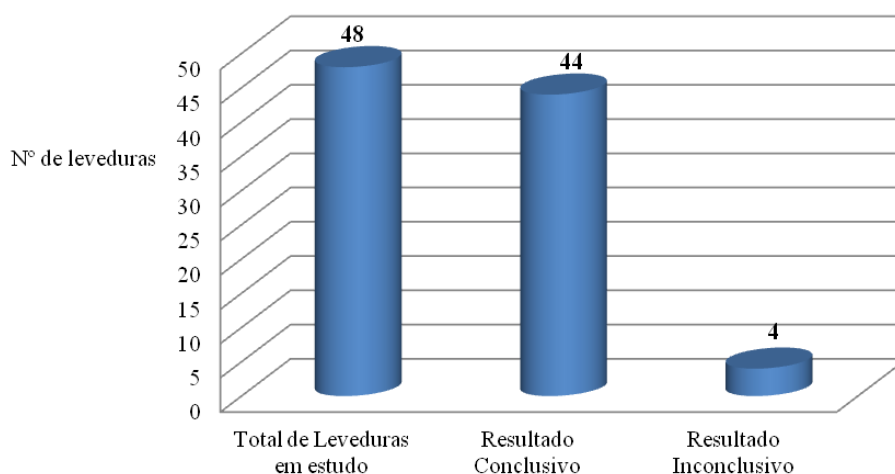


Figura 11 - Quantidade representativa de leveduras estudadas no Meio A.

Foram também realizados ensaios de estabilidade do meio para as condições de armazenagem, ou seja refrigeração a 4 °C, com proteção de luz e, em saco de plástico fechado. Concluímos que, após reconstituição este meio é instável, mesmo sem levedura

escureceu tanto na estufa como no frigorífico passado cerca de uma semana, e com a levedura escureceu mais rapidamente.

5.2.3.2 Substância B

Para o Meio B com a Substância B determinou-se que as condições de preparação do mesmo eram 0,125% de Substância B, tal como referidas nos Materiais e Métodos no capítulo 4.3.1.4.

Neste meio, não cromogénico mas sim de crescimento diferencial, determinou-se que *C. parapsilosis* é a única das 3 espécies que tem um crescimento significativo após 48 a 72 h em estufa a 37 °C (Figura 12).

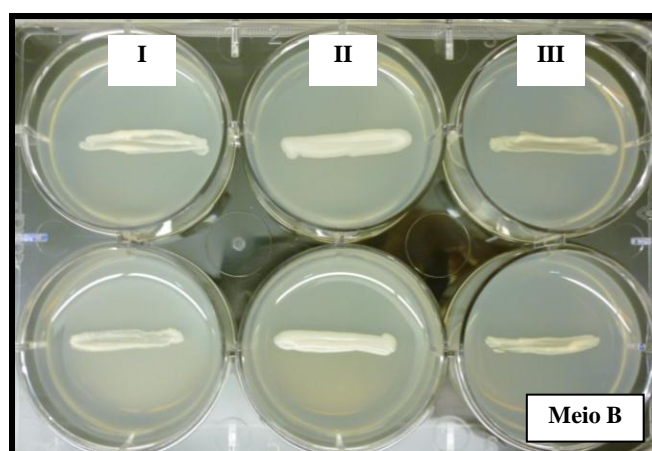


Figura 12 - Resultado no Meio B em microplaca de 6 poços após 72 h de incubação a 37 °C. *C. orthopsilosis* (I), *C. parapsilosis* (II), *C. metapsilosis* (III).

No total das 48 leveduras testadas, em 41 obteve-se o resultado esperado e 7 levantaram dúvidas no resultado (YP336, YP1239, YP1245, YP1249, YP1250, YP1251, YP0079), tal como apresenta a Figura 13. No entanto, a levedura com a referência YP0079 acabou por ser retirada do estudo pois a re-identificação por biologia molecular mostrou que não se tratava do grupo alvo (capítulo 4.4), tal como no Meio A. Todos os resultados dúbios parecem ter crescido.

Os ensaios de estabilidade, realizados tal como referido para o Meio A, mostraram que este meio é estável, mantendo-se sempre de cor clara, seja com ou sem levedura, na estufa a 37 °C ou no frigorífico a 4 °C.

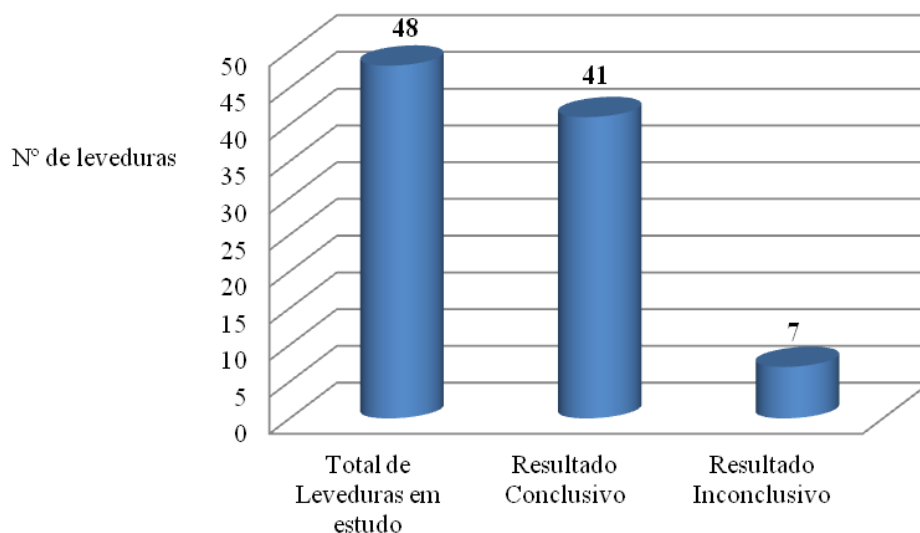


Figura 13 - Quantidade representativa de leveduras estudadas no Meio B.

Com a Substância B foi também desenvolvido um Meio C que, foi preparado não com o meio base (descrito em Materiais e Métodos) mas sim com YNB ao qual foi adicionado a Substância B. Foram testadas várias concentrações de YNB, a de 0,17% (recomendada pelo fornecedor) e a de 0,05%. O melhor resultado foi obtido com a concentração de 0,17% de YNB. Com esta concentração, num total de 46 leveduras, em 45 obteve-se o resultado esperado e apenas uma levedura com resultado inconclusivo (YP336), tal como apresenta a Figura 14.

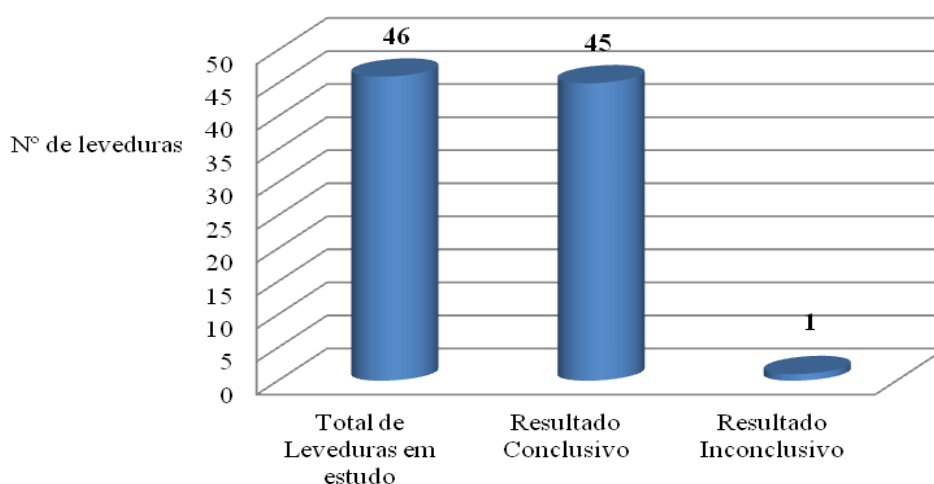


Figura 14 - Quantidade representativa de leveduras estudadas no Meio C.

A *C. parapsilosis* apresentou maior crescimento do que a *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, após 48-72 h na estufa a 37 °C como se pode ver na Figura 15.

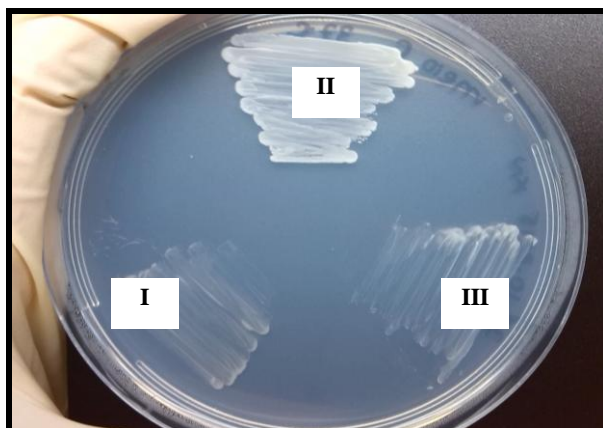


Figura 15 - Resultado no Meio C em placa de Petri após 72 h de incubação a 37 °C. *C. orthopsilosis* (I), *C. parapsilosis* (II), *C. metapsilosis* (III)

Este meio é estável, mantendo a cor clara, seja com ou sem levedura, na estufa a 37 °C ou no frigorífico a 4 °C.

5.2.3.3 Substância X

O Meio X, que inclui na sua constituição o princípio ativo designado como Substância X, foi preparado e testaram-se as concentrações de 0,1 g/L e 0,2 g/L. Não se registaram diferenças em nenhuma das 3 leveduras-alvo deste estudo (*C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis*), nem na cor de levedura nem do meio, nem do crescimento diferencial (Figura 16).

A substituição da fonte de carbono por glicerol também não originou qualquer diferença entre espécies. Quando se utilizou a glucose como fonte carbono ou se retirou do meio qualquer outra fonte de carbono e energia o resultado foi igualmente indiferencial entre espécies. Também as temperaturas e pH testados não originaram diferenças.

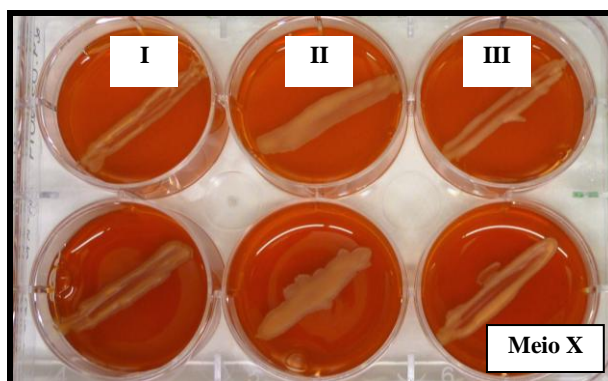


Figura 16 - Resultado no Meio X em microplaca de 6 poços com 0,1 g/L e 0,2 g/L. *C. orthopsilosis* (I), *C. parapsilosis* (II), *C. metapsilosis* (III)

Tal como o Meio X também o Meio F continha como princípio ativo a Substância X. No entanto, este meio foi preparado, não com o meio base descrito no capítulo Materiais e Métodos mas sim com YNB. Foram testadas diferentes concentrações da Substância X em YNB não se registrando qualquer diferença no aspeto das leveduras.

Após vários dias (cerca de 5 dias) os meios apresentaram uma cor diferente da cor inicial em que o Meio 10F alterou a cor laranja para amarelo e o Meio 100F alterou de cor avermelhada para laranja, o que demonstrou não serem estes meios muito estáveis nas condições de trabalho. Apesar da alteração da cor do meio, as leveduras apresentaram o mesmo aspeto como se pode ver na Figura 17.

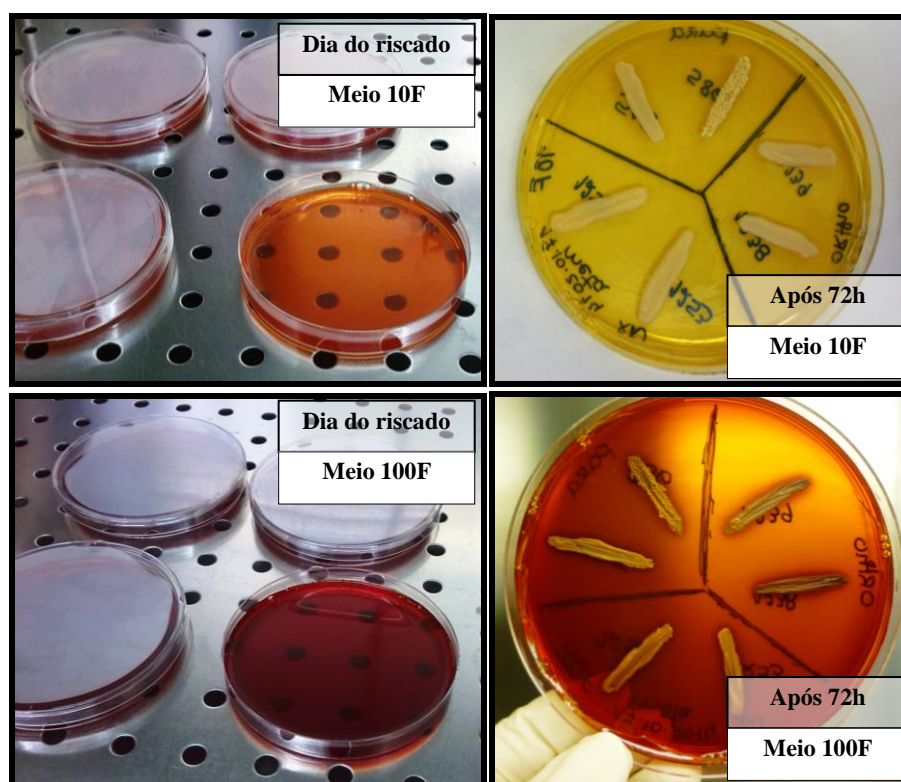


Figura 17 - Meio F preparado com várias concentrações de YNB (0,001% e 0,01%). Alteração de cor dos meios após 72 h de incubação a 30 °C.

5.2.3.4 Ensaios de inoculação pela técnica de “spotting”

Algumas leveduras foram testadas por “spotting” no Meio A, Meio B e Meio C a 37 °C, entre outras, as que tiveram resultado inconclusivo.

No Meio A, após 72 h, apenas a *C. parapsilosis* formou auréola escura, mas após 4 dias a *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* apresentaram uma auréola escura em redor da levedura (Figura 18).

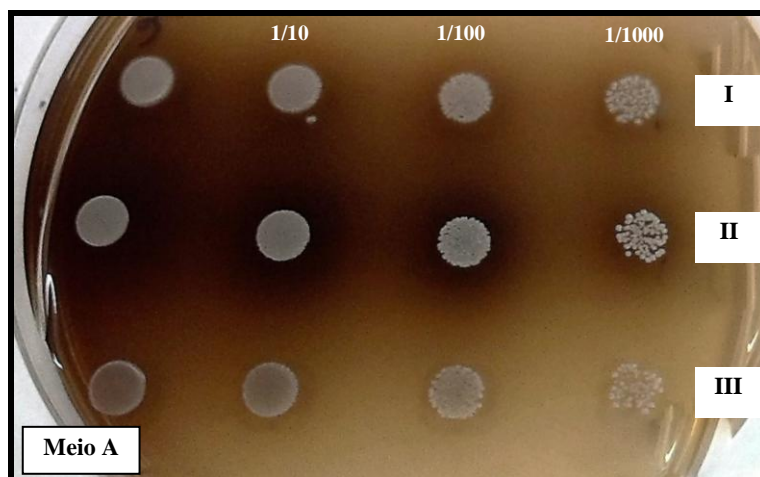


Figura 18 - Resultado da inoculação pela técnica de “spotting” no Meio A após 4 dias de incubação a 37 °C. As leveduras foram inoculadas no Meio A após preparação de suspensão de 0,5 na escala de Mc Farland e diluições seriadas de 1, 1/10, 1/100 e 1/1000. *C. orthopsilosis* (I), *C. parapsilosis* (II), *C. metapsilosis* (III).

Pela técnica de “spotting” no Meio B foram analisadas 20 leveduras em que todas tiveram resultado conclusivo.

Por esta técnica, no Meio C foram analisadas 15 leveduras sendo as 15 conclusivas. Pela técnica de “spotting” em ambos os meios, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* apresentaram crescimento menor que a *C. parapsilosis*.

Nas diluições 1/100 e 1/1000 registaram-se diferenças, em que *C. parapsilosis* cresce mais do que as outras espécies. Na diluição 1/10000 há diferenças no tamanho das colónias, sendo maiores para *C. parapsilosis* e menores na *C. orthopsilosis* e na *C. metapsilosis* (Figura 19).

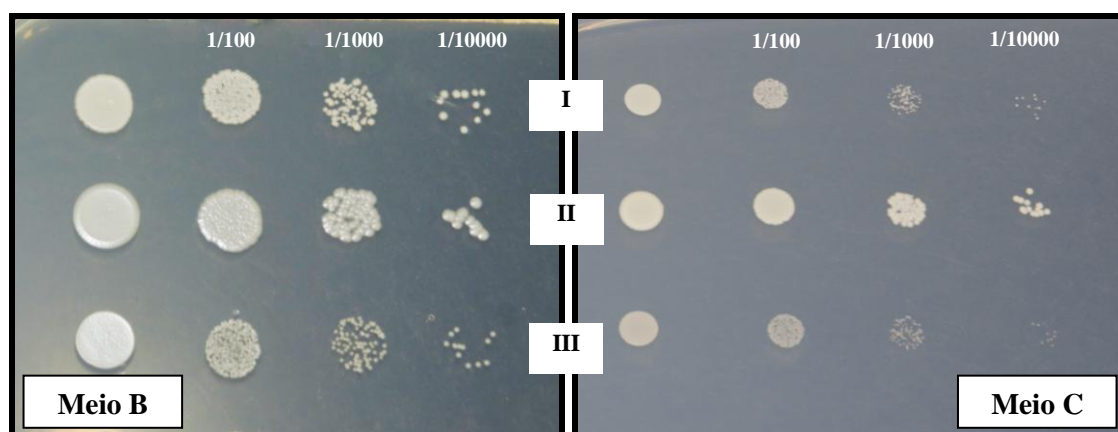


Figura 19 - “Spotting” no Meio B e no Meio C após 72 h de incubação a 37 °C. *C. orthopsilosis* (I), *C. parapsilosis* (II), *C. metapsilosis* (III).

Todas as *C. parapsilosis* tiveram colónias maiores na diluição 1/10000 e colónias mais pequenas na *C. orthopsilosis* e na *C. metapsilosis*.

5.2.3.5 Tipos de riscado das leveduras

Após diversas formas de riscado nos meios A e B, apareceu auréola mais nítida no exemplo 1 e 2, embora por vezes se tenha verificado no exemplo 3 (Figura 20). Optou-se por utilizar o riscado do tipo 1.

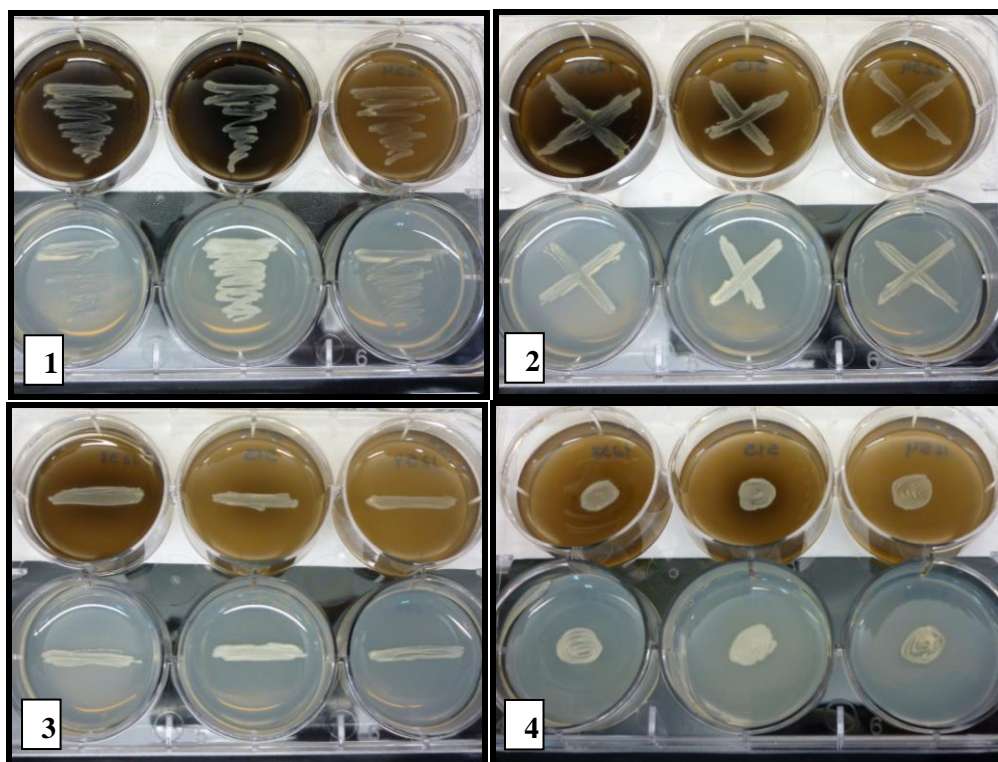


Figura 20 - Técnicas de inoculação das leveduras em microplacas de 6 poços.

5.3 Utilização dos meios diferenciais na discriminação das 3 espécies em estudo. Algoritmo de identificação.

Após a validação de cada um dos meios *per se*, foi-se realizar o estudo conducente à optimização de numa combinação de resultados nos vários meios de forma a desenvolver um algoritmo de identificação das 3 espécies alvo. Como foi referido atrás, os meios com a Substância X como princípio ativo foram abandonados pois não ocorriam diferenças no crescimento, ou na cor do meio ou das colónias, que fossem discriminatórias entre as diferentes espécies. Pelo contrário, o Meio A revelou-se positivo para *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*. Quanto aos meios contendo a Substância B como princípio ativo, meios B e C, considerou-se como resultado positivo o crescimento abundante e “coalescente” de colónias

de leveduras. De acordo com isto só *C. parapsilosis* apresentou um resultado positivo para o mesmo (Figura 21). Tendo em conta que no Meio B se obtiveram mais leveduras com resultado inconclusivo validou-se o Meio C para a combinação com o Meio A.

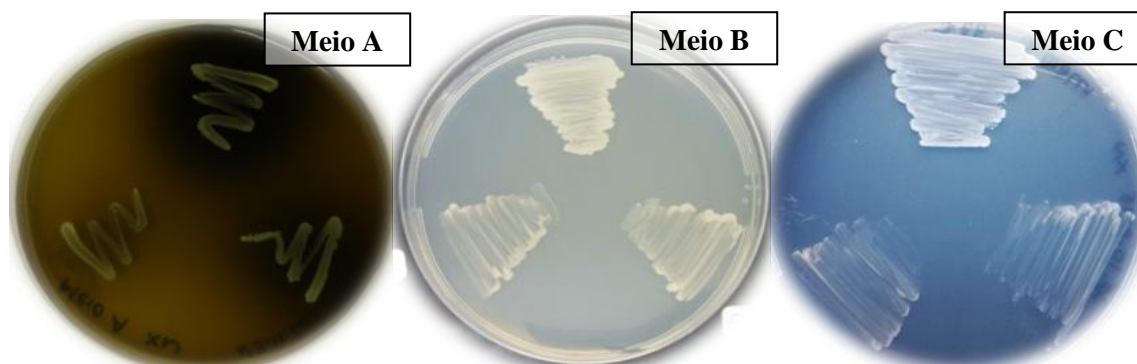


Figura 21 - Resultados no Meio A, Meio B e Meio C em placa de Petri após 72 h a 37 °C.

De acordo com os resultados obtidos nos meios específicos para as leveduras que se utilizaram como estirpes padrão das 3 espécies, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis*, bem como para o conjunto de leveduras nas quais se testaram os meios, foi possível construir um algoritmo de identificação com o Meio A e o Meio C (Tabela II).

Tabela II - Interpretação dos resultados obtidos nos meio A, B e C.

Espécie	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
Meio A	+	+	-
Meio C	-	+	-

5.4 Re-identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* por técnicas de biologia molecular (sequenciação do gene SADH e restrição com Ban I)

No decurso deste trabalho, por observação de leveduras cujo resultado em termos dos meios de cultura aqui desenvolvidos não eram concordantes com o esperado (Tabela III), houve a necessidade de verificar a identificação de algumas estirpes cujos resultados nos meios diferenciais não estavam de acordo com o previsto. Assim, algumas das leveduras a utilizar na validação foram sujeitas a re-identificação pela metodologia de biologia molecular primeiro descrita por Tavanti *et al.* (2005) de forma a clarificar se a divergência em relação aos meios diferenciais era real ou apenas decorrente de uma identificação prévia errada.

Tabela III - Leveduras submetidas a re-identificação por biologia molecular.

Identificação	Número da Coleção	Identificação	Número da Coleção	Identificação	Número da Coleção
<i>C. orthopsilosis</i>	YP0336	<i>C. parapsilosis</i>	YP0002	<i>C. metapsilosis</i>	YP0065
<i>C. orthopsilosis</i>	YP1022	<i>C. parapsilosis</i>	YP0515	<i>C. metapsilosis</i>	YP0079
<i>C. orthopsilosis</i>	YP1243	<i>C. parapsilosis</i>	YP0586	<i>C. metapsilosis</i>	YP1246
<i>C. orthopsilosis</i>	YP1244	<i>C. parapsilosis</i>	YP0612	<i>C. metapsilosis</i>	YP1249
		<i>C. parapsilosis</i>	YP0716	<i>C. metapsilosis</i>	YP1250
		<i>C. parapsilosis</i>	YP0975	<i>C. metapsilosis</i>	YP1251
		<i>C. parapsilosis</i>	YP0993	<i>C. metapsilosis</i>	YP1254
		<i>C. parapsilosis</i>	YP1017		

5.4.1 Identificação por sequenciação de ITS-5.8S

Para a re-identificação começou-se por identificar a espécie de levedura, não especificamente no complexo *Candida parapsilosis*, utilizando metodologia de sequenciação da região ITS-5.8S.

Através deste método, das 19 leveduras analisadas todas apresentaram uma banda de cerca de 500 bp no gel de agarose, exceto a levedura YP0586. Esta apresentou duas bandas (uma a 500 bp e outra a 800 bp). Este resultado indica uma contaminação no stock a -80 °C, que incluía não uma mas duas leveduras. Após repetição do processo de isolamento por esgotamento em meio YPD, foi selecionada uma colónia com aspecto suspeito de se tratar de *C. parapsilosis* (colónia lisa enrugada), foi feita uma nova extração de DNA, fez-se uma amplificação do fragmento ITS-5.8S e correu-se novamente no gel, em que se verificou apenas uma banda de aproximadamente 500 bp.

A levedura YP0079, previamente identificada como *C. metapsilosis*, ao ser estudada pela técnica sequenciação da região ITS, deu uma banda superior a 500 bp, pelo que se suspeitou não pertencer ao grupo de leveduras em estudo. A sequenciação do fragmento de DNA obtido por esta técnica de amplificação mostrou tratar-se de *Meyerozyma guilliermondii*, o anamorfo de *Candida guilliermondii*. Por esta razão esta levedura foi excluída deste estudo.

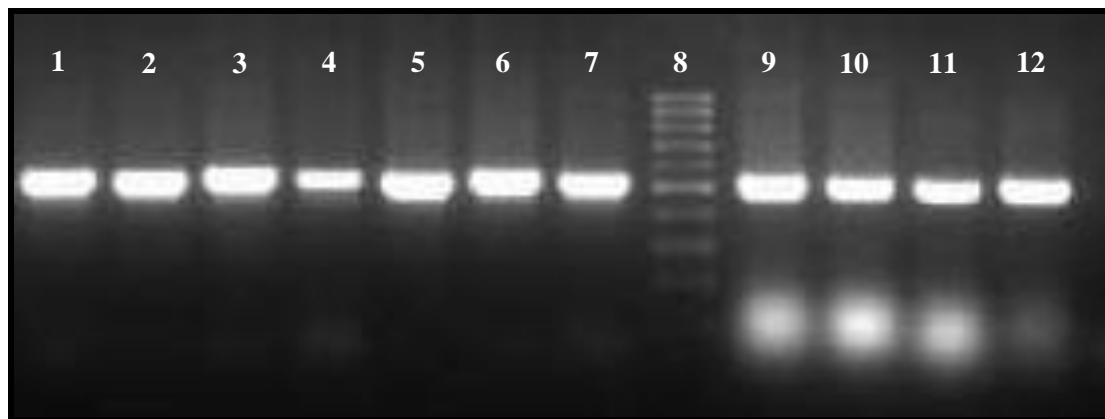


Figura 22 - Identificação de algumas amostras pela técnica de sequenciação da região ITS-5.8S do rDNA. A ordem das amostras nos poços do gel é a seguinte: **1**-YP0515, **2**-YP1244, **3**-YP1254, **4**-YP1246, **5**-YP1022, **6**-YP0065, **7**-YP002, **8**-marcador de peso molecular 100 bp, **9**-YP1243, **10**-YP1249, **11**-YP1250, **12**-YP1251 (GelDoc - Universal Hood II, Bio-Rad).

5.4.2 Re-identificação das leveduras do complexo *Candida parapsilosis*

Dos 18 isolados identificados como pertencentes ao complexo *Candida parapsilosis* quatro foram re-identificadas como *C. orthopsilosis* (YP0336, YP1022, YP1243 e YP1244), seis como *C. metapsilosis* (YP0065, YP1246, YP1249, YP1250, YP1251, YP1254) e oito como *C. parapsilosis* (YP002, YP0515, YP0586, YP0612, YP0716, YP0975, YP0993, YP1017). A distinção destas espécies foi realizada pela técnica de amplificação do gene SADH e posterior digestão com uma enzima de restrição Ban I, tal como descrito no capítulo Materiais e Métodos. Pela análise do padrão de corte do fragmento do gene SADH amplificado e pela digestão com a enzima Ban I foi possível ver que entre elas originavam um número diferente de locais de corte. Assim, na *C. metapsilosis* existem dois locais de corte originando 3 fragmentos com 100 bp, 200 bp e 400 bp, na *C. parapsilosis* um local de corte com duas bandas de 200 bp e 500 bp e na *C. orthopsilosis* não existe nenhum local de corte ou seja fica uma banda de 700 bp (Figura 23).

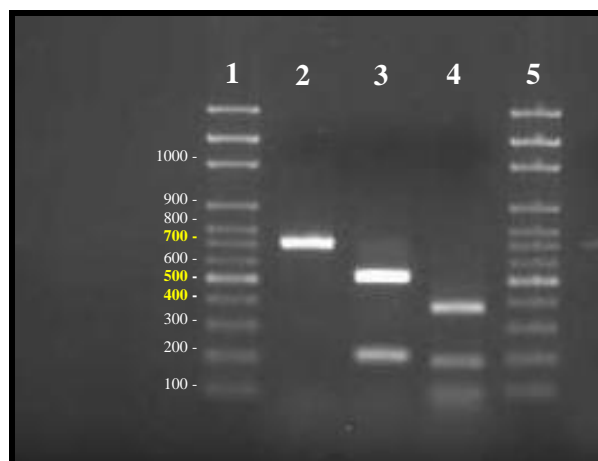


Figura 23 - Re-identificação de leveduras por restrição de SADH com a enzima Ban I. **1 e 5**- marcador molecular, **2**-YP1022 *C. orthopsilosis*, **3**- YP002 *C. parapsilosis*, **4**-YP0065 *C. metapsilosis* (GelDoc - Universal Hood II, Bio-Rad).

Após esta re-identificação das leveduras foi necessário re-avaliar a eficiência dos meios diferenciais desenvolvidos e testados no decurso deste trabalho. Em suma, no conjunto dos resultados obtidos pelo riscado de leveduras nos meios A, B e C e pela técnica de “spotting” no Meio B e no Meio C, obtivemos resultados inconclusivos em apenas 3 espécies das 47 testadas pertencentes ao complexo *Candida parapsilosis* (Figura 24), a YP0336 (*C. orthopsilosis*), a YP1243 (*C. orthopsilosis*) e a YP1251 (*C. metapsilosis*) cujos resultados se mostraram diferentes do esperado.

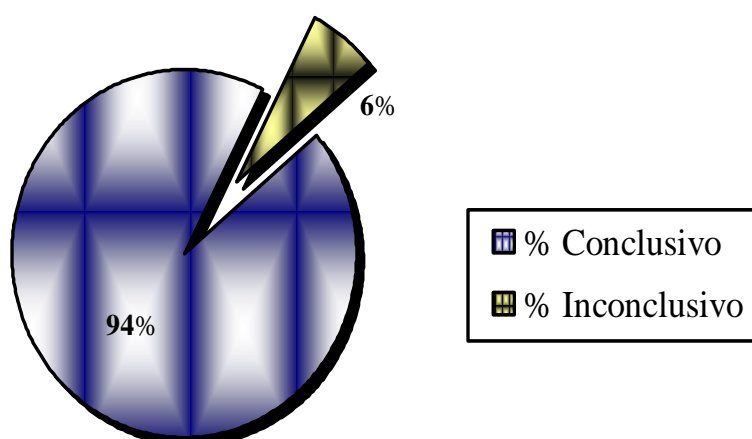


Figura 24 - Resultados obtidos pelo Meio A, B e C em percentagem.

6. DISCUSSÃO

As mastites em ovelhas são uma fonte de grandes perdas económicas em explorações agro-pecuárias (Spanamberg, 2009). Os agentes etiológicos destas mastites são muito diversificados. Apesar de haver uma predominância de bactérias, há no entanto agentes fúngicos em particular leveduras. As leveduras representam parte importante da microflora de produtos lácteos, sendo geralmente detetadas em grandes contagens no leite e nos seus derivados, devido à sua riqueza em proteínas, lípidos, açúcares e ácidos orgânicos (Lopandic *et al.*, 2006). As espécies mais frequentes em isolados de leite cru de cabra são *C. parapsilosis*, *C. catenulata* e *C. guilliermondii*. Isto levanta uma grande preocupação porque estas espécies são consideradas como potencialmente patogénicas para os seres humanos e outros animais (Barchiesi *et al.*, 2006).

Foram realizadas colheitas numa exploração agro-pecuária, em ovelhas com diagnóstico de mastites microbianas, de forma a obter isolados clínicos das espécies-alvo, a identificar também por biologia molecular e sequenciação. Embora se tenha efetuado várias colheitas, o resultado foi sempre negativo para leveduras. Segundo alguns autores (Fleet & Mian, 1987), o leite em cru, contém baixos níveis de leveduras. Esta poderá ser a razão pela qual no decurso deste trabalho não foi possível isolar leveduras. Uma outra explicação, pode ser o rápido crescimento bacteriano, em amostras inicialmente também contaminadas com bactérias, o qual inibiria o desenvolvimento de leveduras presentes no leite (Deak, 1991). Ou ainda pelo facto de ser uma exploração com elevados cuidados de higiene tanto ao nível das instalações da exploração, como dos animais e dos funcionários que reduz a quantidade de leveduras propícias a ocorrer.

Inserido num projeto a decorrer no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina e no grupo "Medical Microbiology" do Centro de Neurociências e Biologia Celular, pretendeu-se realizar um trabalho de otimização e validação de meios diferenciais para a distinção de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis* e a aplicação desta nova tecnologia a leveduras isoladas de leite de ovino.

Existem vários métodos para identificar leveduras do género *Candida*. A pesquisa na literatura disponível mostra que existem alguns meios já disponíveis e comercializados, mas apesar de serem muito precisos e eficientes para a identificação de *C. albicans*, têm algumas limitações na identificação de outras espécies do género *Candida*. Trata-se por exemplo do CHROMagar *Candida* que identifica *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e do CandiSelect 4 desenvolvido para a identificação de *C. albicans* e a identificação presumível de outras

espécies de levedura, como por exemplo *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Sendid *et al.*, 2007). No que diz respeito às espécies do complexo *Candida parapsilosis*, o procedimento atual consiste em técnicas moleculares avançadas como PCR, com a identificação das 3 espécies pela análise de ácidos nucleicos, baseado numa reação de PCR seguida de uma reação de restrição com uma enzima Ban I (Tavanti *et al.*, 2005). A análise de ácidos nucleicos, é também utilizada recorrendo à técnica de MALDI-TOF MS (De Carolis *et al.*, 2014). Esta última metodologia requer recursos dispendiosos e apenas laboratórios de grandes hospitais estão equipados com ela, mas surgiram como ferramentas rápidas para a discriminação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* (Carbonnelle *et al.*, 2011). O sucesso do tratamento dessas infecções depende da identificação da espécie e do padrão de sensibilidade aos antifúngicos. Portanto, um diagnóstico rápido e específico é fundamental para a precoce introdução de terapêutica adequada (Mímica *et al.*, 2009).

Torna-se importante desenvolver métodos de identificação mais práticos, económicos e fáceis de utilizar. Desta forma, avaliámos as relações fenotípicas das 3 espécies na tentativa de encontrar meios que nos permitissem distingui-las, através de meios diferenciais que revelassem propriedades fenotípicas distintas. Foram desenvolvidos vários meios cromogénicos para ajudar na rápida identificação de leveduras.

O meio cromogénico é um meio de cultura microbiológica apropriada para incubação, diferenciação ou seleção de diversos microrganismos, utilizando um substrato cromogénico que resulta na alteração de cor devido à metabolização por alguns microrganismos. Esta cor é característica de cada organismo sendo mais fácil e precisa a sua diferenciação.

Estes meios cromogénicos contêm nutrientes, tais como peptonas, aminoácidos, extracto de levedura, vitaminas e minerais, e o substrato cromogénico ou cromógeno. Os substratos cromogénicos são uma ferramenta poderosa na identificação de microrganismos devido à deteção de enzimas específicas produzidas pelos microrganismos em estudo. Estes substratos cromogénicos reagem com enzimas segregadas por células de levedura e resultam em colónias com várias pigmentações. Estas enzimas são específicas, permitindo a identificação dos organismos ao nível da espécie pela cor e características da colónia (Sendid *et al.*, 2007).

Ao longo deste trabalho, durante o processo de otimização dos meios foram realizados ensaios, onde foram testadas várias condições tais como a temperatura de inoculação e utilização de UV, pH, concentrações dos compostos, várias técnicas de inoculação, desde a criação de suspensões de leveduras pela escala de Mc Farland e com densidade D.O. 1 pela absorvância, com ansas de diferentes volumes de inoculação e um palito de plástico esterilizado, em placa de Petri e em microplaca de 6 poços.

Inicialmente utilizou-se o Meio A e o Meio X, contendo Substância A e Substância X, respetivamente, de forma a obter as cores nos meios ou nas leveduras que as distinguíssem, de acordo com trabalho já desenvolvido anteriormente. Após vários ensaios, só o Meio A é que se revelou útil, por, através da formação de uma auréola escura em redor da levedura inoculada, permitir a distinção entre leveduras do complexo *Candida parapsilosis*. Introduziram-se então dois novos meios, o Meio B e mais tarde o Meio C, ambos contendo a Substância B, que, embora não se trate de um meio cromogénico é um meio diferencial em que só se obtém um bom crescimento de *C. parapsilosis*.

Quanto à estabilidade dos meios testaram-se as condições de incubação e de armazenagem, nomeadamente o tempo de armazenagem. Para este efeito foram preparados meios, sendo colocados na estufa e no frigorífico em simultâneo, com e sem inoculação de leveduras. Verificou-se que o Meio A mudou rapidamente de cor na presença de levedura, e embora mais lentamente, também escureceu sem a presença de levedura na estufa logo após 48 a 72 h de incubação a 37 °C. Após uma semana, escureceu também no frigorífico sem levedura. Concluiu-se que ainda haveria algum trabalho a realizar para aumentar a estabilidade e o tempo de prateleira de um meio como este. No caso dos meios com a Substância B, nenhum se alterou nem na estufa nem no frigorífico, sendo então um meio estável, podendo ser conservado no frigorífico por mais tempo até ser necessário usar. Para este trabalho foram selecionados isolados conservados na coleção do Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, uma vez que já estavam previamente identificadas como pertencentes ao complexo *Candida parapsilosis*. Foram identificados por sequenciação e biologia molecular. A melhor temperatura a utilizar foi a de 37 °C, pois obteve-se um resultado mais rápido visível entre 48 - 72 h.

O Meio A tratou-se de um dos meios diferenciadores, sendo este cromogénico (indicador de cor) e permitiu determinar a espécie de levedura no tempo máximo de 72 h. Este meio permitiu distinguir *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* da espécie *C. metapsilosis*. No Meio A removeu-se o sulfato de cobalto (CoSO₄) pois este resultava numa oxidação mais rápida à temperatura de incubação de 37 °C.

O Meio B permitiu diferenciar a *C. parapsilosis* das outras duas espécies em estudo. Pela técnica de riscado foram analisadas 47 leveduras, das quais apenas seis apresentaram resultados inconclusivos. Posteriormente efetuou-se a técnica de “spotting”. Para tal, foram selecionadas 20 leveduras, nas quais constavam as 6 leveduras com resultados ambíguos. Por esta técnica, todos os resultados obtidos foram conclusivos e de encontro com o que seria esperado.

Tal como o meio B, também o meio C permitiu distinguir a *C. parapsilosis* das outras duas espécies em estudo, quando submetidas às mesmas técnicas. Para este meio foram utilizadas 46 leveduras para o teste do riscado, das quais 15 foram selecionadas e submetidas à técnica de “spotting”. Pelo primeiro teste surgiu apenas um resultado dúbio, que foi clarificado no recurso à segunda técnica. Com base nestes dados, através da técnica de “spotting” todas apresentaram resultado conclusivo e confirmaram os resultados com os obtidos por biologia molecular. No entanto, o meio C é o que apresenta melhores resultados pela técnica do riscado. Tendo em conta os resultados de ambas as técnicas, o meio C será o mais indicado para a combinação com o Meio A.

Para o desenvolvimento de um protótipo de identificação das leveduras organizaram-se os resultados de acordo com o algoritmo representado na Tabela II que permite perceber a forma como distinguir as espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Para o Meio A, o resultado positivo (+), refere-se à formação de uma auréola escura em redor da levedura e o resultado negativo (-), na ausência de auréola escura em redor da colónia. Em relação ao Meio C, temos como resultado positivo (+) um crescimento significativo e para o resultado negativo (-) um crescimento mínimo da levedura.

Utilizando estes meios diferenciais é possível distinguir as 3 espécies de levedura do grupo em estudo. Considera-se então estarmos perante uma nova tecnologia, já submetida como um Pedido Provisório de Patente (Plataforma do INPI, n.º 109204 B), que constituirá o primeiro dispositivo de identificação rápida das espécies de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* que não se baseia na análise de ácidos nucleicos mas sim em propriedades bioquímicas e fisiológicas destas leveduras e que são discriminatórias das espécies. Esta tecnologia poderá ter utilidade para o diagnóstico de infeções por fungos, tanto na saúde humana, como na saúde animal, mas também no ramo alimentar, e para a correta identificação destas leveduras em laboratórios de investigação.

7. CONCLUSÃO

O leite, quando contaminado e ingerido *in natura*, assim como os produtos lácteos produzidos a partir de leite cru, podem ser veiculadores de uma grande diversidade de agentes potencialmente patogénicos, desenvolvendo problemas a nível da saúde pública. No que se refere à produção de derivados lácteos e desde que não haja tratamento térmico prévio, a contaminação do leite por leveduras pode afetar o produto final por meio de alterações organoléticas que ocorrem pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas, além de outros derivados.

Ainda existem poucos estudos relativamente à presença e identificação de leveduras em leite de ovelha, pelo que é necessário continuar a desenvolver estudos.

A metodologia estudada baseou-se em dois princípios de utilização de meios de crescimento diferenciais que permitem resultados em 48-72 h. São metodologias que permitem distinguir as 3 espécies de leveduras por uma leitura simples pela alteração da cor no Meio A e pela capacidade de crescimento microbiano no Meio C.

Isso aumenta a eficiência dos testes e poupa tempo e custos comparados aos procedimentos tradicionais. A interpretação do resultado é apenas o aspeto visual, sem necessidade de hardware, software ou formação especializada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, T A C P. 2010. Mastites em Bovinos : caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa.

Arsenault J, Dubreuil P, Higgins R, Bélanger D. 2008. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. *Journal Preventive Veterinary Medicine*. 87:373–393.

Barbedo L S, Vaz C, Pais C, Figueiredo-Carvalho, M H G, Muniz M M, Zancope-Oliveira R M, Sampaio P. 2015. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. *Journal of Medical Microbiology*. 64: 7–17.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Vittoria A D, Arzeni D, Manso E & Scalise G. 2006. Effects of Caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2719-2727.

Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. 2000. Yeast, characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University. 3:1150.

Benjamin D K, DeLong E, Cotten C M, Garges H P, Steinbach W J, Clark R H. 2004. Mortality Following Blood Culture in Premature Infants: Increased with Gram-negative Bacteremia and Candidemia, but Not Gram-positive Bacteremia. *Journal Perinatology*. 24: 175–180.

Blowey R & Edmondson P. 2000. Mastitis control in dairy herds. Farming Press Books, United Kingdom.

Bradley A J. 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *Journal Veterinary*. 163: 1–13.

Carbon J P. 1968. Contribution à l'étude de mamite mycosique de la vache. Tese Doutorado em Medicina Veterinária – École Nationale de Vétérinaire D'Alfort (ENVA), França. 59.

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*. 44: 104–109.

- Chen L, Daniel R M, Coolbear T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Journal International Dairy*. 13: 255–275.
- Chengappa M M, Maddux R L, Greer S C, Pincus D H, Geist L L. 1984. Isolation and Identification of Yeasts and Yeastlike Organisms from Clinical Veterinary Sources. *Journal Clinical Microbiology*. 19(3): 427–428.
- Colombo A L, Guimarães T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(5): 599–607.
- Coutinho D A, Costa J N, Ribeiro M G, Torres J A. 2006. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*. 7(2):139–151.
- Crawshaw W M , MacDonald N R, Duncan G. 2005. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Veterinary Record*. 156: 812–813.
- Deak, T. 1991. Foodborn yeast. *Advances in Applied Microbiology*. 36: 180–277.
- De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Posteraro P, Ricciardi W, Sanguinetti M, Posteraro B. 2014. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *Journal Clinical Microbiology*. 52(5): 1453–1458.
- De Hoog G S, Guarro J, Gené J, Figueras M J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmislcultures. 2^a ed. Baarn.
- Deak, T. 1991. Foodborn yeast. *Advances in Applied Microbiology*. 36:180–277.
- Fleet G H & Mian M A. 1987. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *Journal International Food Microbiology*. 4: 145–155.
- Fleet G H. 1990 Yeasts in dairy products, A Review. *Journal Applied Bacteriology*. 68: 199–211.
- Fthenakis G C. 1995. California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Ruminant Research*. 16: 271–276.

- Green T J. 1984. Use of somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in ewes. *Veterinary Record*. 114:43.
- Gross S J, Pollack E J, Anderson J G, Torell D T. 1978. Incidence and importance of subclinical mastitis in sheep. *Journal of Animal Science*. 46(1).
- Guillamón J M, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal (ITS) regions. *Archives Microbiology*. 169: 387– 392.
- Keller B, Scheibl P, Bleckmann E, Hoedemaker M. 2000. Differentiation of yeasts in mastitis milk. *Mycoses*. 1: 17–19.
- Lacaz C da S, Porto E, Martins J E C, Heins-Vaccari E M, Takahashi de Melo N. 2002. *Tratado de Micologia Médica - Lacaz*. 9ª ed. Sao Paulo: Sarvier.
- Lopandic K, Zelger S, Bánszky L K, Eliskases-Lechner F, Prillinger H. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*. 23: 341–350.
- Mímica L M J, Ueda S M Y, Martino M D V, Navarini A, Martini I J. 2009. 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*. 45 (1): 17–23.
- Mota R A. 2008. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*. 2(3): 57–61.
- Paula C R, Matsumoto F E, Melo T A. 1999. Possible catheter-related infections in public children's hospital of São Paulo, Brazil. *ASM Conference on Candida and Candidiasis*. Charleston, Spath Carolina, USA. 35.
- Paulo C, Mourão C, Veiga P M, Marques J M, Rocha G, Alves A F, Querol A, Meliço-Silvestre A A, Gonçalves I, Flores O, Clemente C, Gonçalves T. 2009. Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Medical Mycology*. 47(8): 836–44.

Radostits O M, Gay C C, Blood D C, Hinchcliff K W. 2002. Mastite - In: (2002). Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9ª ed: 541–629.

Radostits O M, Gay C C, Hinchcliff K W, Constable P D. 2007. Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders Elsevier Company. 10ª ed.

Richard J L, McDonald J S, Fichtner R E, Anderson A J. 1980. Identification of Yeasts from Infected Bovine Mammary Glands and Their Experimental Infectivity in Cattle. American Journal Veterinary Research. 41(12): 1991–1994.

Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Dotis J, Hatzioannidis E, Tsvitanidou M, Bibashi E, Filioti I, Sofianou D, Gil-Lamaignere C, M-Mueller F, Kremenopoulos G. 2004. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. European Journal Clinical Microbiology and Infectious Disease. 23: 745–750.

Ruz-Perez M, Yokoya E, Passarelli D, Cantarino S C. 2004. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. Arquivo Instituto Biológico. 71: 663–665.

Sendid B, François N, Standaert A, Dehecq E, Zerimech F, Camus D, Poulain D. 2007. Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida* species. Journal Medical Microbiology. 56: 495–499.

Silva A P, Miranda, I M, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues A G. 2009. Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a Tertiary Care Hospital. Journal of Clinical Microbiology. 47(8):2392.

Spanamberg A, Sanches E M C, Hummel J, Valente P. 2008. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de células leveduriformes. Acta Scientiae Veterinariae. 36 (1): 43–45.

Spanamberg A, Ramos J P, Leoncinis O, Alves S H, Valente P. 2009. High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. Acta Scientiae Veterinariae. 37 (2): 133–141.

- Spanamberg A, Sanches E M C, Santurio J M, Ferreiro L. 2009. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural*, Santa Maria. 39 (1): 282–290.
- Spanamberg A, Fraga C F, Ferreiro L, Aginsky M S, Sanches E M C, Roehle C, Lautert C, Santurio J M. 2014. Yeasts in the Raw Ewe's Milk. *Acta Scientiae Veterinariae*. 42: 1236.
- Tavanti A, Davidson A D, Gow N A R, Maiden M C J, Odds F C. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal Clinical Microbiology*. 43(1): 284–292.
- Tavanti A, Hensgens L A M, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. 2007. Genotyping of *Candida orthopsilosis* Clinical Isolates by Amplification Fragment Length Polymorphism Reveals Genetic Diversity among Independent Isolates and Strain Maintenance within Patients. *Journal Clinical Microbiology*. 45(5): 1455–1462.
- Wawron, W; Szczubial, M. 2001. Treating mastitis mycotica in cows. *Medycyna Weterynaryjna*. 57: 863–866.
- Yamamura A A M, Müller E E, Pretto-Giordano L G, Cosenza M, Silva P F N da, Godoy A de. 2007. Isolamento de *Prototheca* spp. De vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. *Seminário: Ciências Agrárias, Londrina*. 28(1): 105–114.