

TESTES BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS NA MEDICINA VETERINÁRIA - REVISÃO DE LITERATURA

Recebido em: 29/05/2023
Aceito em: 30/06/2023
DOI: 10.25110/arqvet.v26i1cont-011

Vitória Stefani Magalhães Trentin ¹
Deborah de Oliveira Soares ²
Maria Eduarda de Souza Pinto Albano ³
Gabriel Batistuta de Souza Lima ⁴
Ana Luiza Nunes Galdino ⁵
Andressa de Sousa Martins ⁶
Renata Leão do Nascimento ⁷
Débora Luíza de Souza Machado Teixeira ⁸
Jéssica Fernanda Timóteo ⁹
Rafael Carneiro Ranucci ¹⁰
Tamyres Izarely Barbosa da Silva ¹¹

RESUMO: As leveduras são fungos de importância à medicina veterinária por causarem doenças infecciosas em diferentes hospedeiros animais. A presente revisão de literatura teve como objetivo relatar os principais testes bioquímicos capazes de auxiliar na identificação de fungos leveduriformes de interesse veterinário e zoonótico. Para o levantamento bibliográfico, foram consideradas 48 publicações científicas selecionadas na área e indexadas nas principais bases de dados, entre os anos de 1988 e 2020. Como resultados, observou-se que oito provas são as mais empregadas na rotina micológica. Devido à baixa variabilidade morfológica das espécies leveduriformes, testes bioquímicos complementares são fundamentais na rotina laboratorial. A análise do perfil bioquímico de leveduras contribui na determinação taxonômica dos fungos a partir de

¹ Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: vitória.trentin@sou.ufac.br

² Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: deborah.soares@sou.ufac.br

³ Graduado em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: maria.albano@sou.ufac.br

⁴ Graduado em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: gabriel.batistuta@sou.ufac.br

⁵ Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: ana.galdino@sou.ufac.br

⁶ Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: andressa.martins@sou.ufac.br

⁷ Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: renata.nascimento@sou.ufac.br

⁸ Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: debora.teixeira@sou.ufac.br

⁹ Graduada em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: jessica.temoteo@sou.ufac.br

¹⁰ Graduado em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC).

E-mail: rafael.ranucci@sou.ufac.br

¹¹ Doutora em Ciência Veterinária. Universidade Federal do Acre (UFAC). E-mail: tamires.silva@ufac.br

reações químicas, visto que o metabolismo varia de acordo com a espécie, resultando em metabólitos distintos, os quais podem ser avaliados por diferentes provas. Conclui-se que a identificação fenotípica das leveduras é imprescindível no diagnóstico, prognóstico, tratamento e controle de doenças fúngicas e contribui para a manutenção da saúde animal. **PALAVRAS-CHAVE:** Diagnóstico; Fungos Leveduriformes; Perfil Bioquímico.

BIOCHEMICAL TESTS TO YEAST IDENTIFICATION IN VETERINARY MEDICINE - LITERATURE REVIEW

ABSTRACT: Yeasts are fungi of importance to veterinary medicine because they cause infectious diseases in different animal hosts. This literature review aimed to report the main biochemical tests capable of assisting in the identification of yeast-like fungi of veterinary and zoonotic interest. For the bibliographical survey, 48 selected scientific publications in the area and indexed in the main databases, between the years 1988 and 2020, were considered. As a result, it was observed that eight tests are the most used in the mycological routine. Due to the low morphological variability of yeast species, complementary biochemical tests are fundamental in the laboratory routine. The analysis of the biochemical profile of yeast contributes to the taxonomic determination of fungi based on chemical reactions, since the metabolism varies according to the species, resulting in different metabolites, which can be evaluated by different tests. It is concluded that the phenotypic identification of yeasts is essential in the diagnosis, prognosis, treatment and control of fungal diseases and contributes to the maintenance of animal health.

KEYWORDS: Diagnosis; Yeast-Like Fungi; Biochemical Profile.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN LA MEDICINA VETERINARIA - REVISIÓN DE LITERATURA

RESUMEN: Las levaduras son hongos de importancia para la medicina veterinaria porque causan enfermedades infecciosas en diferentes animales huéspedes. Esta revisión de la literatura tuvo como objetivo informar las principales pruebas bioquímicas capaces de ayudar en la identificación de hongos tipo levadura de interés veterinario y zoonótico. Para el levantamiento bibliográfico se consideraron 48 publicaciones científicas seleccionadas en el área e indexadas en las principales bases de datos, entre los años 1988 y 2020. Como resultado se observó que ocho pruebas son las más utilizadas en la rutina micológica. Debido a la baja variabilidad morfológica de las especies de levaduras, las pruebas bioquímicas complementarias son fundamentales en la rutina del laboratorio. El análisis del perfil bioquímico de la levadura contribuye a la determinación taxonómica de los hongos en base a reacciones químicas, ya que el metabolismo varía según la especie, dando como resultado diferentes metabolitos, los cuales pueden ser evaluados mediante diferentes pruebas. Se concluye que la identificación fenotípica de levaduras es fundamental en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y control de enfermedades fúngicas y contribuye al mantenimiento de la salud animal.

PALABRAS CLAVE: Diagnóstico; Levaduras; Perfil Bioquímico.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucariontes, heterotróficos e onipresentes, classificados em filamentosos ou leveduriformes, com base nos aspectos morfológicos, sendo estes pluricelulares ou unicelulares, respectivamente. Existem ainda os fungos dimórficos, os quais podem se apresentar de forma filamentosa ou leveduriforme, de acordo à temperatura, composição de substratos presentes, pH, concentração de gás carbônico, dentre outros (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Características coloniais como textura e aspecto da superfície, diâmetro, velocidade de crescimento, bordas, pigmentação de verso e reverso, devem ser observadas na análise macroscópica. As leveduras, em particular, possuem velocidade de crescimento mais rápida quando comparada aos filamentosos, menor diâmetro, textura cremosa e superfície lisa ou rugosa. Na microscopia, são observadas apenas células arredondadas a ovaladas, com presença ou não de blastoconídios, além de pseudo-hifas e hifas verdadeiras, em alguns casos. Todavia, devido à pouca variedade micromorfológica, há necessidade de verificar o perfil bioquímico dos isolados para identificação de diferentes espécies leveduriformes (BRASIL, 2004a; ANDRADE, 2015).

As leveduras possuem mecanismos metabólicos distintos, dessa forma, a análise dos metabólitos produzidos exige a aplicação de testes, denominados de provas bioquímicas, que são capazes de identificar a utilização ou fermentação de compostos nitrogenados e carboidratos, além de atividades enzimáticas (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004b; ELISEI, 2009). As referidas provas são muito úteis e constantemente empregadas no ambiente laboratorial, sendo de baixo custo, de fácil acesso e de rápida execução (GAW *et al.*, 2015).

A identificação correta de leveduras na medicina veterinária, por meio de exames laboratoriais, permite não apenas o reconhecimento e confirmação de doenças fúngicas, mas também podem auxiliar no direcionamento terapêutico e na determinação do prognóstico do paciente acometido (GAW *et al.*, 2015). Neste contexto, objetivou-se, com esta revisão de literatura, descrever os principais métodos utilizados na detecção de fungos leveduriformes, conforme 48 publicações científicas selecionadas na área e indexadas nas principais bases de dados, entre os anos de 1988 e 2020.

2. DESENVOLVIMENTO

Para a diferenciação entre gêneros ou espécies fúngicas leveduriformes, é necessária a realização de técnicas bioquímicas e metabólicas complementares, visto a baixa variabilidade macro e micromorfológica (GALVÃO, 2004). Dentre os testes laboratoriais empregados na rotina microbiológica, cita-se a prova da urease, o microcultivo em lâmina, o zimograma, o auxonograma, a prova do tubo germinativo, o cultivo em ágar cromogênico, o teste da catalase e da fenol-oxidase (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015), os quais serão melhor abordados a seguir.

A prova da urease consiste em identificar a presença da atividade da enzima urease, que pode ou não ser produzida pela levedura (FEDER, 2012). Esta enzima hidrolisa a ureia e produz conseqüentemente a amônia, que alcaliniza o meio (RAGAVAN; DAS, 2017). O carbamato também é produzido, o qual reage com a água e se decompõe, dando origem ao gás carbônico e outra molécula de amônia (MOBLEY *et al.*, 1995).

Para execução da prova de urease, uma alçada da colônia suspeita é semeada no meio ágar ureia de *Christensen* e incubada a 37° C, com resultado visualizado após 24 a 72 horas em média (BRASIL, 2004a). O tempo para a visualização pode variar, visto que alguns isolados demoram 96 horas ou mais para se apresentarem positivos à prova, sendo considerado positivo quando ocorre a mudança da coloração do meio, que passa de amarelo para róseo. Se o meio permanecer da mesma coloração, a amostra é, então, considerada negativa para urease (GIRÃO *et al.*, 2004; FACCO *et al.*, 2016).

Na espécie *Paracoccidioides brasiliensis*, a urease possui o tripeptídeo RGD (arginina, glicina e ácido aspártico), que é uma sequência de aminoácidos presente na sequência proteica da matriz extracelular. Dessa forma, a urease pode se ligar aos receptores das integrinas, que são proteínas de adesão que reconhecem e se ligam ao RGD das células do hospedeiro. Logo, favorece a adesão e a disseminação do fungo, aumentando a sua capacidade de invasão tecidual e exercendo uma grande importância na colonização fúngica no hospedeiro. Portanto, a presença da urease é responsável pela patogenicidade no *P. brasiliensis* (FERNANDES, 2009).

A presença de urease é considerada um importante fator de virulência na espécie *Cryptococcus neoformans*, embora o mecanismo ainda não seja bem elucidado (TOPLIS *et al.*, 2020). A capacidade de hidrolisar ureia pode se relacionar à permanência dessa espécie fúngica (ELKADY; TORKY, 2016). Segundo pesquisa realizada por Cox *et al.*

(2000), camundongos infectados com um mutante urease negativo de *C. neoformans* conseguiram sobreviver.

Assim como o *Cryptococcus*, o gênero *Rhodotorula* também é urease positivo. A diferenciação entre as duas espécies se dá pela coloração das colônias, na qual *Rhodotorula* sp. apresenta pigmento salmão, alaranjado ou avermelhado, enquanto as colônias de *Cryptococcus* sp. são de cor bege a marrom. Desse modo, por meio desse critério, os gêneros são de fácil distinção (CORDEIRO, 2019).

A *Malassezia pachydermatis*, por sua vez, também é classificada como urease positiva, sendo um importante fator de identificação da espécie. Porém, de acordo com Brito *et al.* (2006), em um estudo feito com 32 colônias, provenientes de dermatites e otites externas caninas, isoladas em meio ágar Dixon a 20°C, 34,4% desses fungos foram considerados urease negativos. Mas, segundo Girão *et al.* (2004), a produção de urease depende das condições de armazenamento na qual a colônia é submetida. Dessa forma, o referido estudo mostra que as características fenotípicas de *M. pachydermatis* podem não ser conservadas no meio ágar Dixon a 20°C, o que dificulta a identificação da espécie.

A hidrólise da ureia é realizada pela espécie *Trichophyton mentagrophytes*, o que é importante para diferir das demais espécies de *Trichophyton* (CHEN *et al.*, 2016). O que pode ser mostrado em um estudo de diferenciação entre *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* realizado por Summerbell *et al.* (1988). Nele, os isolados de *T. mentagrophytes* apresentavam forte capacidade de atividade de urease, enquanto os isolados de *T. rubrum* eram urease negativos.

Além disso, pesquisas revelaram que a produção de urease é positiva na etapa de modificação da fase saprofítica para a fase infectante em *Coccidioides* sp (FERNANDES, 2009). *Candida* sp. e outros gêneros fúngicos também são capazes de sintetizar a urease, entretanto, são, principalmente, caracterizados e identificados através de outros testes bioquímicos mais específicos (BRASIL, 2004a).

Uma prova metabólica complementar recorrente no laboratório de microbiologia, para avaliação de fungos leveduriformes, é microcultivo em lâmina, que permite o reconhecimento de características micromorfológicas específicas de determinados gêneros fúngicos, como hifas verdadeiras, pseudo-hifas, clamidósporos e blastoconídios (TRABULSI; ALTERTHUM 2015). Por exemplo, a presença de hifas hialinas sem divisão e clamidósporos terminais ou intercalares são comuns à espécie *Candida albicans* (BRASIL, 2004b).

Os clamidósporos, na maioria das vezes, são compostos por células redondas, com bastante volume e um citoplasma recoberto por uma dupla camada de parede celular. As células dos clamidósporos podem ser encontradas na região terminal do micélio ou na região intercalar da hifa. Sua presença é observada principalmente em estados hostis de sobrevivência, nas quais são capazes de se formar (MINATEL, 2011). Na superfície terrestre, os clamidósporos germinam e o micélio construído se torna prolífero, povoando o ambiente radicular e parasitando-o (MARTINS, 2016).

Para realização do microcultivo em lâmina, um pequeno bloco de ágar farelo de milho, preferencialmente acrescido de polissorbato 80, é depositado na superfície de uma lâmina (MIOTTO, 2004), a qual deverá estar firmada por um bastão de vidro dentro de uma placa de Petri (ESPERIDIÃO *et al.*, 2016). A semeadura do isolado suspeito deve ser feita com uma alça de platina, previamente flambada, depositando o material em três estrias na mesma direção sobre o ágar, de forma que permita a separação de possíveis microrganismos que possam vir a contaminar a lâmina. Posteriormente, deve-se revestir as estrias com uma lamínula estéril (BRASIL, 2004a).

É sempre importante lembrar de verificar condições de umidade e temperatura para que o meio de cultura permaneça em sua consistência e que evite dessecação. Posteriormente, deve-se utilizar 2 mL de água destilada na placa, que deverá ser tampada e incubada. Para a incubação é sugerido uma temperatura de 30° C (BRASIL, 2013). A análise pode ser feita em microscópio óptico com aumento de 100X, após dois a três dias de incubação (SILVA, 2015).

A prova bioquímica da fermentação de açúcares, ou zimograma, é uma atividade que resulta na conversão de álcool etílico e dióxido de carbono, a partir de açúcares, a exemplo da frutose, sacarose, maltose, lactose, glicose, dentre outros, sem requerer a utilização de oxigênio. Esse processo é realizado por determinadas espécies de leveduras e ocorre no citoplasma das mesmas, visando produzir ATP para suprir funções fisiológicas, bem como participar dos processos de crescimento e reprodução. A concentração de açúcar fermentado, bem como a quantidade de leveduras que o fermenta são fatores que influenciam diretamente na velocidade deste processo (GOES-FAVONI *et al.*, 2018).

A ocorrência ou não de fermentação do açúcar é uma informação que auxilia a distinguir as espécies de leveduras (LEITE JÚNIOR, 2016). Geralmente, os fungos utilizam para seu crescimento açúcares simples, principalmente a D-glicose. Outros

carboidratos, todavia, como sacarose, maltose, e fontes de carbono menos simples, podem também ser usados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

No final do processo de fermentação, tem-se a formação de álcool e CO₂. Isso envolve um número de doze reações seguidas e para que esse processo ocorra é necessário a presença desses substratos, ou seja, os carboidratos. Estes podem ser de dois tipos: endógenos e exógenos. Os endógenos são aqueles que pertencem ao próprio fungo, como por exemplo, o glicogênio e a trealose. Os exógenos, por sua vez, são aqueles concedidos à levedura, como sacarose, glicose, frutose e outros (PACHECO, 2010).

Na fermentação de açúcares, o percurso mais utilizado é a glicólise. Neste processo, duas moléculas de piruvato são originadas a partir da metabolização de uma molécula de glicose. Na falta de oxigênio, através da conversão do piruvato, o CO₂ e etanol se desprendem através das dozes reações supracitadas, que são catalisadas por enzimas específicas (CRUZ, 2015).

Para a execução do zimograma, o isolado é semeado em meio de cultura líquido, com grande diversidade de constituintes, sendo utilizados 3 g de extrato de carne, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 20 g de carboidrato e 1.000 ml de água destilada, com pH 7,2 (FERREIRA; MORAES, 2013).

No momento da preparação do meio em tubos de ensaio, adiciona-se tubos menores chamados de Durhan (que devem estar na posição invertida), além das fontes de açúcares (MELO, 2016). As leveduras são semeadas nesses tubos de ensaio preparados anteriormente. A positividade para a fermentação do carboidrato pelo respectivo fungo pode ser analisada através da origem de bolhas gasosas formadas depois de até 15 dias numa temperatura a 25°C (OKAMURA, 2019).

Candida albicans é positiva para a fermentação de glicose, maltose e variável para trealose. *Candida tropicalis* é positiva para glicose, maltose e trealose e variável para sacarose. *Candida parapsilosis* é positiva para glicose e variável para trealose. *Candida krusei* é positiva somente para a fermentação de glicose. *Candida guilliermondii* é positiva para a fermentação de glicose, sacarose, rafinose e variável para a trealose. *Candida glabrata* é positiva para glicose e trealose. *Geotrichum*: é variável para glicose. *Saccharomyces* é positivo para glicose, sacarose, maltose, rafinose e variável para trealose. Este é o perfil de zimograma de algumas leveduras de interesse médico-veterinário (BRASIL, 2004a).

O auxonograma, ou prova de assimilação de açúcares, representa o teste bioquímico para avaliar o consumo de carbono ou de nitrogênio, fornecido como única fonte de energia possível para metabolização e crescimento fúngico. Observa-se se o meio de cultura irá suprir as necessidades dos fungos, de acordo com os nutrientes adicionados, possibilitando a multiplicação do microrganismo (SOUZA, 2018).

Na assimilação de fonte carbono em meio sólido, utiliza-se placa de Petri, onde a levedura é inoculada no ágar. Como desvantagem na utilização da placa de Petri, tem-se o ressecamento das mesmas, algumas vezes impossibilitando a detecção de assimilações atrasadas. No entanto, o uso das placas é vantajoso devido à rápida leitura dos resultados que ocorre após dois ou até quatro dias, além de que qualquer contaminação é facilmente detectada (KURTZMAN, 2011).

Ainda de acordo com Kurtzman (2011), o teste de assimilação de fonte de carbono usando meio líquido é realizado em tubos de teste sem aro, preferencialmente usando tampas de algodão. Os tubos deverão conter cerca de 5 ml de meio à base de nitrogênio líquido. Para obter resultados mais rápidos e confiáveis é recomendado que a incubação aconteça por meio de agitação, o que pode ser obtida por meio de um agitador rotativo.

A princípio, utiliza-se os meios Yeast Carbon Base constituído de azoto de levedura, sendo um meio sintético e mínimo para seu crescimento, todavia não possui aminoácidos. E o Yeast Nitrogen Base possui nitrito e nitrato. A semeadura em meio sólido em placas de Petri é realizada por meio da técnica Pour-plate ou disseminação, sendo a observação das placas efetuada a cada 24 horas (CARNEIRO, 2011).

Além disso, é de suma importância observar temperatura e tempo. Há um predomínio de temperatura de 30 e 37°C entre as leveduras, sendo recomendado incubar por sete dias e de acordo com a espécie do fungo a temperatura ideal pode ter variações para suprir as suas necessidades metabólicas. O diagnóstico será pelo crescimento ou não do halo de turvação em volta do ágar, sendo positiva para fonte de carbono ou nitrogênio caso haja o crescimento (BRASIL, 2004a).

Na assimilação de nitrogênio, as leveduras necessitam de várias fontes para o seu crescimento, sendo o nitrato e a creatina exemplos. Os métodos para a assimilação de nitrogênio são semelhantes ao de carbono, pode-se usar tanto meio sólido ou líquido (KURTZMAN, 2011; LEITE JÚNIOR, 2016; SOUZA, 2016).

A assimilação das fontes de carbono e nitrogênio, como sacarose, maltose, lactose, celobiose, trealose, rafinose, xilose, inositol, galactose, melibiose, L- arabinose, dulcitol,

ramnose, inulina, manitol, nitrato e outros, permite a identificação de leveduras de interesse à medicina veterinária, a exemplo de espécies de *Candida*, bem como *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* (BRASIL, 2004a; GIRÃO *et al.*, 2004 *apud* ELISEI, 2009).

As espécies *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus neoformans* possuem assimilação positiva para sacarose, maltose e trealose. Todavia todas as espécies do gênero *Candida* possuem assimilação negativa para lactose e nitrato. A espécie *C. neoformans* é a única positiva para inositol e *Trichosporon* é variável (BRASIL, 2004a). O perfil bioquímico descrito está disponível em quadro comparativo elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013).

O aumento da incidência de infecções causada por fungos do gênero *Candida*, evidencia sua importância tanto na medicina humana como na veterinária. Além disso, essas leveduras mostram maior resistência aos antifúngicos. Conseqüentemente, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para a compreensão da epidemiologia e patogênese da candidose. As técnicas para a identificação das espécies de *Candida* são os testes bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, mas o principal é a capacidade em formar tubos germinativos a 37° C em soro sanguíneo, sendo presuntivo à espécie *C. albicans* (SANTOS *et al.*, 2009; NAVARRO, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2019).

O teste é realizado em um tubo de ensaio com 0,5 ml de soro humano ou animal. Deve-se fazer uma suspensão com uma alçada da colônia fúngica isolada. Em seguida, incubar o meio a 37° C de uma até no máximo três horas. Após esse período, deve-se depositar uma gota da solução em uma lâmina, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio óptico. A presença de tubo germinativo na área de brotamento é sinal positivo para a identificação de *C. albicans* (BRASIL, 2013; FERNANDES, 2019).

Outro teste empregado para diferenciação de espécies de *Candida* é o cultivo em ágar cromogênico, por meio de reação enzimática e colorimétrica. A partir de cada colônia suspeita isolada, realiza-se o repique por esgotamento com alça de platina estéril na superfície de um ágar cromogênico. As microplacas de Petri devem ser incubadas em estufa à temperatura de 37° C por até 72 horas, para posterior avaliação das características de crescimento das colônias (NOSTER *et al.*, 2022).

As colônias de coloração verde claro-médio são indicativas da espécie *C. albicans*. Colônias de coloração rosa lisa e rosa rugosa são indicativas de *C. parapsilosis*

e *C. krusei*, respectivamente. As colônias de coloração lilás são indicativas de *C. glabrata* e colônias com a cor azul metálico são indicativas de *C. tropicalis* (NOSTER *et al.*, 2022).

A enzima catalase é também um dos fatores para a diferenciação fúngica, já que a mesma é produzida por determinados fungos leveduriformes. A catalase realiza a quebra do peróxido de hidrogênio, originando, então, água e oxigênio (TRAWCZYNSKA, 2019).

O teste consiste em colocar uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em cima de uma lâmina, em seguida, com o auxílio de uma alça de platina, deve-se colocar a colônia fúngica sobre a gota de peróxido de hidrogênio (BRASIL, 2004b). Se o contato entre a amostra e o peróxido de hidrogênio resultar em formação de bolhas sobre a lâmina, a amostra será positiva para catalase. Porém, se a amostra for negativa nada acontecerá com o líquido (FONSECA, 2015).

Segundo Moreira *et al.* (2004), os fungos da espécie *Paracoccidioides brasiliensis*, que são dimórficos, apresentam uma maior quantidade de catalase quando estão em sua forma filamentosa, dessa forma, essa quantidade de catalase tende a aumentar durante sua transformação dimórfica e quando ocorre uma exposição a peróxido de hidrogênio. De tal modo, a catalase tem uma importante participação no mecanismo de defesa desta levedura e também atua como um fator de virulência (ANDRADE, 2006).

Por fim, o teste de fenol-oxidase é utilizado na rotina laboratorial para a identificação do gênero *Cryptococcus*. A enzima fenol-oxidase, também chamada de lacase, é encontrada, principalmente, nas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Em situações em que o fungo se desenvolve em substratos que apresentam compostos difenólicos, por exemplo de L- dopa, ágar alpiste ou ágar níger, e ágar batata, esta enzima realiza a catálise desses constituintes, gerando como resultado as quinonas (SANTOS *et al.*, 2009; HAGEN *et al.*, 2015).

Estes compostos dão origem, por meio de um mecanismo de autopolimerização, ao pigmento melanina. Dessa forma, a melanina fica confinada na parede celular dessas leveduras (LEITE JUNIOR, 2016). Assim, nessas condições, os fungos do gênero *Cryptococcus*, com destaque ao *C. neoformans* e *C. gattii*, sintetizam um pigmento escuro, podendo ser preto ou marrom, em um tempo médio de dois a cinco dias (FERREIRA, 2013).

Segundo Silva (2016), essa melanina tem um importante papel na virulência de *C. neoformans*, estando associada a evasão imunológica, já que protege o fungo contra os

macrófagos produzidos pelas células efetoras do hospedeiro. Dessa forma, as células que produzem pigmentos são mais resistentes, o que gera um aumento da persistência de infecções causadas por essa espécie.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão bibliográfica permitiu o levantamento de informações, conhecimentos e esclarecimentos sobre diversas análises laboratoriais visando a identificação de fungos leveduriformes, por meio de testes bioquímicos. Estas provas possuem a função de diferenciar gêneros e espécies fúngicas, contribuindo à confirmação de micoses superficiais, subcutâneas e sistêmicas em diferentes hospedeiros animais.

Tendo em vista que as infecções fúngicas estão em ascensão no planeta, muitas vezes associadas a resistência a fármacos antifúngicos, além de altas taxas de mortalidade, a identificação fenotípica das leveduras é imprescindível no diagnóstico, prognóstico, tratamento e controle de diversas micoses, contribuindo para a manutenção e o equilíbrio da saúde animal.

Por fim, acredita-se que ainda existam limitações para a aplicação de diferentes provas bioquímicas na rotina micológica veterinária, seja por falta de equipamentos, insumos ou mesmo negligência quanto ao diagnóstico de enfermidades fúngicas em animais. Estudos mais detalhados podem ser realizados no sentido de mapear tais limitações, buscar soluções e incentivar a identificação adequada de leveduras de interesse veterinário e zoonótico.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. T. *et al.* Identificação Morfológica de Leveduras Isoladas de Pacientes com Quadro Clínico de Candidíase Vulvovaginal. *In: V Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica*, 2015, São Paulo. **Anais[...]** São Paulo: Blucher, v. 1, n. 1, p. 83-84, 2015.

ANDRADE, R. V. **Análise de Transcriptoma e da Expressão Diferencial de Genes de Micélio e Levedura de *Paracoccidioides brasiliensis***. Brasília, 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. 2004a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. 2004b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. 2013. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/detecca-o-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica>>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BRITO, E. H. S. *et al.* Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 147-153, 2007.

CARNEIRO, M. T. **Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no lago jaternaíba, Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2011. 109 f. Dissertação (Pós-graduação em saúde pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/Fundação Oswaldo Cruz.

CHEN, Y. *et al.* Molecular identification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains in Hubei province. **Chinese Journal of Dermatology**, China, v. 49, n. 11, p. 796-800, 2016.

CORDEIRO, R. A. **Pocket Guide to Mycological Diagnosis**. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. 157p.

COX, G. M. *et al.* Urease as a Virulence Factor in Experimental *Cryptococcosis*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

CRUZ, M. L. **Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica**. Minas Gerais, 2015. 86 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia.

ELISEI, R. M. T. **Infecções por leveduras do gênero *Candida* em pacientes imunossuprimidos.** Belo Horizonte, 2009. 46 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

ELKADY, E. A.; TORKEY, H. *Cryptococcus Neoformans* Isolated from Pigeon, Chicken Dropping Samples and Dust Collected From Their House on Urease Hydrolysis. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, Alexandria, v. 51, n. 2, p. 122-126, 2016.

ESPERIDIÃO, E. S. et al. Avaliação da biodiversidade fúngica em mamão através do microcultivo. **Atas de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 4, p. 71–77, 2016.

FACCO, N. L.; PAULA, M.; HAS, M. **Caracterização Morfológica e Fisiológica de Leveduras Submetidas a Preservação Prolongada.** Ponta Grossa, 2016. 33 f. Monografia (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

FEDER, V. **O papel da urease e proteínas acessórias na virulência de *Cryptococcus gattii*.** Porto Alegre, 2012. 107f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERNANDES, A. O. **Avaliação microbiológica e físico-química das águas minerais comercializadas na cidade de cajazeiras – PB.** Cajazeiras, 2019. 31 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Campina Grande.

FERNANDES, M. R. A. **Caracterização Molecular e Funcional da Urease de *Paracoccidioides brasiliensis*.** Goiânia, 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Autoimune.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 477p.

FONSECA, I. C. F. **Relato das atividades realizadas no laboratório de microbiologia veterinária do hospital veterinário – UnB.** Brasília, 2015. 31 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília.

GALVÃO, C. **Identificação de leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto* por PCR e PCR-RFLP.** Lavras, 2004. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras.

GAW, A. et al. **Bioquímica clínica.** 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 196p.

GIRÃO, M. D. et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n.3, p. 229–233, 2004.

GOES-FAVONI, F. P. et al. Fermentação aeróbica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018.

HAGEN et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Gen Biol**, v. 78, p. 16-48, 2015.

KURTZMAN, C.P. *et al.* Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. **Elsevier Science**, 5ed, p. 88-110, 2011.

LEITE JÚNIOR, D. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de espécies de leveduras do complexo *Cryptococcus* isoladas de amostras da poeira de bibliotecas de Cuiabá e várzea grande e sua relação com árvores hospedeiras.** Cuiabá, 2016. 47 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Mato Grosso.

MARTINS, O. A. **Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior.** Pelotas, 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Sanidade Animal) - Universidade Federal de Pelotas.

MELO, A. P. V. **Fatores de virulência de *Candida spp.* Obtidas de hemoculturas de pacientes com candidemia atendidas em hospitais terciários do nordeste do Brasil.** Natal, 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MINATEL, I. O. **Clamidósporos do *Paracoccidioides brasiliensis*: isolamento e estudo da infectividade em modelo experimental murino.** São Paulo, 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia), Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

MIOTTO, N. M. L. *et al.* Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida* sp. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 27-33, 2004.

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 451-480, 1995.

MOREIRA, S. F. I. *et al.* **Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis.** v. 21, p. 173-182, 2004.

NAVARRO, B. S. **Fenótipos e perfis de sensibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas da mucosa oral de cães da cidade de Campinas, São Paulo.** São Paulo, 2016. 165 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

NOSTER, J. *et al.* Bloodstream Infections Caused by *Magnusiomyces capitatus* and *Magnusiomyces clavatus*: Epidemiological, Clinical, and Microbiological Features of Two Emerging Yeast Species. **American Society for Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 1-9, 2022.

OKAMURA, L. S. **Avaliação do potencial do extrato da própolis verde contra leveduras do gênero *Candida spp.*** Cuité, 2019. 40 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Uberlândia, 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia.

RAGAVAN, M. L.; DAS, N. Molecular Identification of Probiotic Yeast Strains and Their Characterization. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Asia, v. 10, n. 10, p. 339-343, 2017.

RIBEIRO, M. D., et al. Compêndio de métodos e de boas práticas em coleção de cultura de leveduras do Instituto de Biologia do Exército. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, n. 2, p. 11. 2019.

SANTOS, L. L., et al. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp. em excretas de psitacídeos e passeriformes cativos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2009.

SILVA, F. B. A. **Aspectos epigenéticos da virulência em *Cryptococcus neoformans*: papel das histonas desacetilases**. Brasília, 2016. 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) -Universidade de Brasília.

SILVA, M. D. *et al.* Produção de conídios e clamidósporos de *Dunndingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* em diferentes meios sólidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.82, p. 1-5, 2015.

SOUZA, A. F. **Caracterização molecular, taxonomia polifásica, Susceptibilidade a antifúngicos e extratos das sementes de *Vatairea guianensis* em isolados clínicos de *Candida* spp.** Manaus, 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

SOUZA, F. P. **Processos fermentativos em resíduos agroindustriais utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* qu69**. Laranjeiras do Sul, 2018. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade Federal da Fronteira Sul.

SUMMERBELL, R. C.; ROSENTHAL, S. A.; KANE, J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. **National Library of Medicine**, Ontario, v. 26, n. 11, p. 2279–2282, 1988.

TOPLIS, B. *et al.* The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 20, n. 4, 2020.

TRAWCZYNSKA, I. Immobilization of permeabilized cells of baker's yeast for decomposition of H₂O₂ by catalase. **Polish Journal of Chemical Technology**, Szczecin, v. 21, n. 2, p. 59-63, 2019.

TRABULSI, L. R.; ALTER THUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 888p.