

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO *CAMPUS*
UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde

**SCREENING DE LEVEDURAS EM FEZES DE AVES
EM ÁREAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE SINOP -
MT**

LARYSSA DE BRYTO SOUZA

Sinop, Mato Grosso
Julho, 2023

LARYSSA DE BRYTO SOUZA

**SCREENING DE LEVEDURAS EM FEZES DE AVES
EM ÁREAS PÚBLICAS NO MUNICÍPIO DE SINOP -
MT**

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Cristina Donofrio
Coorientador: Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde.

**Sinop, Mato Grosso
Julho, 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S729s Souza, Laryssa de Bryto.

Screening de leveduras em fezes de aves em áreas públicas no município de Sinop -MT. [recurso eletrônico] / Laryssa de Bryto Souza. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 58 f., il. color., pdf). -- 2023.

Orientadora: Fabiana Cristina Donofrio.

Coorientador: Manoel Marques Evangelista de Oliveira Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2023.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. leveduras. 2. fezes de pombos. 3. doenças infecciosas. I. Donofrio, Fabiana Cristina, *orientador*. II. Oliveira, Manoel Marques Evangelista de Oliveira, *coorientador*. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Screening de leveduras em fezes de aves em áreas públicas no município de Sinop -MT".

AUTOR (A): Mestranda **Laryssa de Bryto Souza**

Dissertação defendida e aprovada em **28/07/2023**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutor(a) Fabiana Cristina Donofrio (Presidente Banca / Orientador(a))

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

2. Doutor(a) Roberta Vieira de Moraes Bronzoni (Examinador(a) Interno(a))

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

3. Doutor(a) Lilian Cristiane Baeza (Examinador(a) Externo(a))

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

4. Doutor(a) Cibele Bonacorsi (Examinador(a) Suplente)

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

5. Doutor(a) LILIANA SCORZONI (Examinador(a) Suplente)

INSTITUIÇÃO: Universidade de Guarulhos - UNG

SINOP, 28/07/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Cristiane Baeza, Usuário Externo**, em 01/08/2023, às 22:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **FABIANA CRISTINA DONOFRIO**, **Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 02/08/2023, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ROBERTA VIEIRA DE MORAIS BRONZONI**, **Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 07/08/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5969288** e o código CRC **5D378DF7**.

Dedico a conclusão de mais uma etapa aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões e me proporcionaram condições para percorrer esta trajetória da melhor maneira que eu pudesse.

Agradecimento

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder oportunidade de trilhar meu caminho.

Agradeço em especial aos meus pais Kênia e Antônio pelos anos de investimento em educação, apoio e amor, sem eles eu não seria nada e por eles me esforço todo dia em tentar ser minha melhor versão.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Fabiana e ao meu Coorientador Prof. Dr. Manoel pelos conselhos e ensinamentos durante o delineamento e a realização da pesquisa, assim como também agradeço a Neocimar, Francielle e aos alunos de iniciação científica Geovana, Luís, Elvira e Jéssica por me auxiliarem nesta jornada não somente na parte prática do laboratório, mas na vida.

Agradeço as minhas amigas Marina, Carol e Mayara que mesmo distantes fisicamente não deixaram de torcer por mim e enviaram as boas energias que eu precisava.

Agradeço aos amigos que fiz por estarem do meu lado sempre que precisei e as pessoas que cruzaram meu caminho e me marcaram de alguma forma nesse tempo em que estive realizando o mestrado em outro estado, vocês fizeram com que eu me sentisse bem e acolhida.

Ao finalizar agradeço por ter tido esses conjuntos de experiencias que acredito terem me tornado uma pessoa mais forte e obstinada.

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

Saúde única é um conceito que abrange a interdependência entre saúde humana, saúde animal e ecossistemas. Leveduras podem causar micoses oportunistas em humanos e animais, e são frequentemente encontradas em fezes de aves. As aves, principalmente pombos urbanos possuem alta capacidade de albergarem micro-organismos como *Candida* sp., *Pichia* sp, *Rhodotorula* sp e *Trichosporon* sp, e, por circularem em vários ambientes, existe a possibilidade de transmissão aos seres humanos, podendo ocasionar contaminação ambiental e infecções. Identificar a presença de leveduras com potencial patogênico em amostras de fezes de pombos coletadas em áreas públicas no Norte de Mato Grosso representa importância pois são fatores que podem ter a capacidade de influenciar na saúde da população. Amostras foram coletadas em locais de lazer (ginásios e praças) e necessidades básicas (Unidade Básica de Saúde, supermercado) com circulação diária de pessoas na cidade de Sinop e transportadas em caixas climatizadas até o LAMP da UFMT para processamento e realização das análises clássicas macro e microscópicas como pesquisa de leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* sp através do corante tinta nanquim e cultura em CHROMagar *Candida* para identificação presuntiva de leveduras do gênero *Candida*, além da realização dos testes de tubo germinativo, azul de metileno e microcultivo em ágar Fubá Tween 80. Foram coletados 9 locais em Sinop, obtendo-se total de 86 amostras. Após os testes identificou-se *C. tropicalis* em 55 amostras (63,95%), seguida de *C. krusei* 9 (10,46%), *Rhodotorula spp* 7 (8,14%), *T. asahii* 3 (3,49%), *P. kudriavzevii* 3 (3,49%), *N. glabrata* 2 (2,33%), *D. rugosa* 2 (2,33%), outras espécies 2 (2,33%), *C. lusitaniae* 1 (1,16%), *C. africana* 1 (1,16%) e *A. loubieri* 1 (1,16%). A identificação constatou elevada presença de leveduras patogênicas isoladas em fezes de pombos em diferentes ambientes públicos em Sinop, provocando risco de infecção em seres humanos e animais que transitam por esses locais. Destaca-se a identificação, pela primeira vez no Brasil, da levedura *C. africana* presente em fezes de aves.

Palavras-chave: leveduras; fezes de pombos; doenças infecciosas.

ABSTRACT

One health is a concept that encompasses the interdependence between human health, animal health and ecosystems. Yeasts can cause opportunistic mycoses in humans and animals, and are often found in bird droppings. Birds, especially urban pigeons, are highly capable of harboring microorganisms such as *Candida sp.*, *Pichia sp.*, *Rhodotorula sp.* and *Trichosporon sp.*, and because they circulate in various environments, there is a possibility of transmission to humans, which can lead to environmental contamination and infections. Identifying the presence of yeasts with pathogenic potential in samples of pigeon droppings collected in public areas in the north of Mato Grosso is important because these are factors that can influence the health of the population. Samples were collected from places of leisure (gyms and squares) and basic needs (Basic Health Unit, supermarket) with daily circulation of people in the city of Sinop and transported in air-conditioned boxes to the UFMT LAMP for processing and carrying out classic macro and microscopic analyses such as research into capsulated yeasts of the *Cryptococcus* sp genus using India ink and culture on CHROMagar *Candida* for presumptive identification of yeasts of the *Candida* genus, as well as germ tube tests, methylene blue and microcultivation on Fubá Tween 80 agar. A total of 86 samples were collected from 9 locations in Sinop. After testing, *C. tropicalis* was identified in 55 samples (63.95%), followed by *C. krusei* 9 (10.46%), *Rhodotorula* spp 7 (8.14%), *T. asahii* 3 (3.49%), *P. kudriavzevii* 3 (3.49%), *N. glabrata* 2 (2.33%), *D. rugosa* 2 (2.33%), other species 2 (2.33%), *C. lusitaniae* 1 (1.16%), *C. africana* 1 (1.16%) and *A. loubieri* 1 (1.16%). The identification showed a high presence of pathogenic yeasts isolated in pigeon droppings in different public environments in Sinop, causing a risk of infection in humans and animals passing through these places. Noteworthy was the identification, for the first time in Brazil, of the yeast *C. africana* present in bird droppings.

Keywords: yeast; pigeon droppings; infectious diseases.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Mapa de localização de coleta das amostras de fezes na cidade de Sinop-MT.....	18
Figura 2 – Frequência absoluta das leveduras isoladas a partir das amostras de fezes de aves de acordo com os locais.....	22
Figura 3 – Frequência absoluta das espécies isoladas por locais no Norte de Mato Grosso.....	22
Figura 4 – Variantes de pigmentação das colônias identificadas sugestivamente como <i>C. tropicalis</i> em Chromagar <i>Candida</i>	24
Figura 5 – Características macromorfológicas de leveduras identificadas sugestivamente como <i>C. tropicalis</i> em ágar Sabouraud.....	24
Figura 6 – Características micromorfológicas dos isolados em ágar em Ágar Fubá Tween 80.....	26
Tabela 1 – Correlação das características cromogênicas em Chromagar <i>Candida</i> e a microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80.....	26
Figura 7 – Variantes de pigmentação das colônias identificadas sugestivamente como <i>C. krusei</i> em Chromagar <i>Candida</i>	27
Figura 8 – Características macromorfológicas de leveduras identificadas sugestivamente como <i>C. krusei</i> em ágar Sabouraud.....	27
Figura 9 – Características micromorfológicas em ágar em Ágar Fubá Tween 80.....	28
Tabela 2 – Correlação das características cromogênicas em Chromagar <i>Candida</i> e a microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80.....	28
Figura 10 – Variantes de pigmentação das colônias do gênero <i>Rhodotorula spp.</i> em Chromagar <i>Candida</i>	29
Figura 11 – Características macromorfológicas de leveduras identificadas do gênero <i>Rhodotorula spp.</i> em ágar Sabouraud.....	29
Figura 12 – Características micromorfológicas em ágar em Ágar Fubá Tween 80.....	30
Figura 13 – Pigmentação das colônias caracterizadas como outras espécies de <i>Candida</i> em Chromagar <i>Candida</i>	31

Figura 14 – Características macromorfológicas de leveduras em ágar Sabouraud.....	31
Figura 15 – Características micromorfológicas em ágar em Ágar Fubá Tween 80.....	31
Tabela 3 – Características cromógenas em Chromagar <i>Candida</i> e sequenciamento.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Local de Pesquisa.....	18
3.2 Coleta de amostras.....	18
3.3 Processamento de amostras.....	19
3.4 Testes de identificação.....	19
3.4.1 Teste tinta nanquim.....	19
3.4.2 Cultura em CHROMagar <i>Candida</i>	19
3.4.3 Testes de azul de metileno.....	19
3.4.4 Testes de tubo germinativo.....	20
3.4.5 Testes de microfilamentação em Ágar Fubá.....	20
3.5 Sequenciamento.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
7. ARTIGO.....	47
ANEXO I.....	56

1. INTRODUÇÃO

Diversos aspectos da saúde humana podem sofrer influência tanto por animais quanto pelo ambiente em que estão inseridos. Utilizando o conceito de Saúde Única, entende-se a interdependência entre a saúde humana, animal e do ecossistema. Partindo deste princípio, qualquer desequilíbrio entre um dos participantes desta tríade (humano/animal/ecossistema) pode afetar e prejudicar um dos outros grupos de integrantes. Principalmente quando se tratam de patógenos, visto que, alguns conseguem fazer essa transição entre o meio ambiente, animais e humanos, podendo, em alguns casos, trazerem malefícios para essas populações que foram afetadas e alteradas (ELLWANGER; CHIES, 2022).

A Saúde Única é um conceito amplo que visa auxiliar indivíduos e organizações a prevenir, detectar e conseguir responder às ameaças à saúde da forma mais sustentável possível, não somente, mas principalmente em relação a doenças zoonóticas. Com isto, é necessário identificar possíveis fatores que possam alterar este equilíbrio e ocasionar consequências prejudiciais para a saúde coletiva (ELLWANGER; CHIES, 2022).

O Brasil é um país conhecido por sua biodiversidade, dentro desta característica atribuída, pode-se destacar a variedade de espécies de aves presentes em ambientes urbanos e rurais. Essas aves, em sua maioria, são migratórias e possuem a capacidade de albergarem micro-organismos, dois fatores que podem contribuir para a disseminação e manutenção de patógenos, uma vez que estas aves propiciam a sobrevivência do micro-organismo em seu trato gastrointestinal e podem despejá-los por meio de suas fezes em ambientes os quais façam parte, contaminando-o e podendo ser fonte de possíveis focos de infecção; gerando uma preocupação especialmente para a população imunocomprometida (BOURSCHEID et al., 2020; FENG et al., 2020; SIQUEIRA et al., 2022).

Uma das aves com a habilidade de estar presente em diversos ambientes são os pombos, com enfoque aos da espécie *Columba livia*. São aves comuns em regiões urbanas e rurais que ofereçam disponibilidade e facilidade de adaptação, alimentação, abrigo e reprodução e tem a capacidade de albergarem micro-organismos, servindo de reservatório para fungos patogênicos e não patogênicos, muitas das vezes, tornando-se portadores assintomáticos destes agentes. Diversas pesquisas relatam a presença de fungos tais como *Cryptococcus* sp, *Candida* sp, *Pichia* sp, *Rhodotorula* sp, *Trichosporon* sp, *Aspergillus fumigatus* sp e *Histoplasma capsulatum* sp em excretas de pombos que podem ser potencialmente patogênicos, oferecendo risco a saúde humana e animal e gerando um problema de saúde pública (AMÂNCIO et al.,

2008; MARINHO *et al.*, 2010; CALDAS, 2017; PINTO *et al.*, 2019; GLUSHAKOVA; RODIONOVA; KACHALKIN, 2020, SARMENTO *et al.*, 2021).

As excretas de aves representam um importante fator quando levado em conta a contaminação ambiental, em razão de que apresentam micro-organismos, em sua maioria fungos, colonizadores do trato gastrointestinal das aves como alguns dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*, os quais estão bastante relacionados a algumas ocorrências de doenças aviárias e humanas e podem ser relacionados como propagadores de doenças zoonóticas (GLUSHAKOVA; RODIONOVA; KACHALKIN, 2020).

De acordo com Charles Darwin e alguns autores, os pombos são um exemplo de diversidade sob domesticação, eles são variados e algumas diferentes espécies podem se relacionar e gerar indivíduos viáveis, aumentando a população e podendo, sem o controle devido, vir a ser um problema. Em paralelo a isto, quando considerado que estas aves podem propiciar um reservatório de micro-organismos e estão espalhados por praticamente todos os ambientes que o favorecem, tornam-se um agente de destaque para estudos (POLLOCK, 2003; SHAPIRO; DOMYAN, 2013; DOMYAN; SHAPIRO, 2017).

Destaca-se que através da capacidade migratória intrínseca dos pombos por informações posicionais através do campo geomagnético, históricos e referências anteriores, a procura de abrigos e alimentos, isto pode contribuir na disseminação de diversos agentes por meio da eliminação de seus excrementos (LUSCHI, DALL'ANTONIA, 1993; WALLRAFF, 1999).

Existem dois casos descritos na literatura que indicam infecção de humanos através de fezes de aves de animais que coabitavam com o ser humano. Nos dois casos a levedura infectante foi *C. neoformans* (SILVA; CAPUANO, 2008; MOUTINHO *et al.*, 2015; REIS, 2015; FARIAS, 2016).

Devido à alta possibilidade de dispersão destes fungos por aerossóis a partir do acúmulo das excretas secas das aves em ambientes, os quais podem ser inalados por crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, ocasionando micoses oportunistas (VAZQUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2013; SHARIATI *et al.*, 2020), torna-se necessária a implantação de medidas de controle populacional como a redução da disponibilidade de alimento, água e, principalmente, abrigos, visando diminuir ou mesmo impedir a disseminação desenfreada desses agentes que podem ocasionar micoses oportunistas (MARANHÃO *et al.*, 2019), dado que doenças de origens fúngicas e caráter invasivo são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (FARIAS, 2016; BONGOMIN *et al.*, 2022).

No Brasil, não existem indicadores de vigilância epidemiológica sobre a ocorrência e a extensão destas micoses no Sistema Nacional de Agravos Notificáveis (SINAN), o que ocasiona uma preocupação porque caso houvessem estas informações disponíveis, medidas de controle seriam implementadas e áreas de riscos identificadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Em estudos semelhantes realizado em Cuiabá – MT foram isoladas a partir de amostras de fezes de aves de espécies estipuladas (*Busarellus nigricollis*, *Rupornis magnirostris*, *Sarcoramphus papa*, *Spizaetus melanoleucus* e *Buteogallus urubitinga*), amostras de leveduras de *Cryptococcus albidus* (8,90%), *Rhodotorula mucilaginosa* (19,85%), *Candida kefyr* (33,08%) e *Trichosporon inkin* (38,17%) (SIMI *et al.*, 2019). Outro estudo realizado em Mato Grosso, nas cidades de Campo Verde, Várzea Grande e Cuiabá isolou excretas das espécies de aves *Nymphicus hollandicus*, *Canário serinus*, *Psittacula krameri*, *Platycercus super*, *Psittacus erithacus*, *Erythrura gouldiae*, *Taeniopygia guttata*, *Padda oryzivora*, *Lonchura striata domestica*, *Neopsephotus bourkii*, *Psephotus haematonotus*, *Falco gavião*, *Psittacula eupatria*, *Columba livia*, *Psittacula cyanocephala* e *Bolborhynchus lineola*, onde isolou leveduras de *Cryptococcus neoformans* (73,2%) e *Cryptococcus deuterogattii* (26,3%) (SIQUEIRA *et al.*, 2022).

Sinop é uma região localizada no Norte do estado do Mato Grosso, no Brasil e possui área territorial de 3.990,870 km² e uma população de 196.067 pessoas; com atividades relacionadas a extração vegetal, silvicultura, pecuária e agricultura, além de grande potencial madeireiro, segundo o IBGE (2022). A vegetação predominante é de floresta tropical, já que grande parte da sua extensão é recoberta pela Floresta Estacional Amazônica Semidecidual da Meridional, e encontra-se em uma área de transição do Cerrado Amazônia, além de o município ser banhado pelo Rio Teles Pires (ROCHA; PAULA; SOUZA, *et. al.*, 2015). Por conta do constante crescimento e desenvolvimento e da disponibilidade de abrigo e alimentos para estas aves, visto que, a atividade agrícola é um ponto forte, Sinop é uma região que desperta o interesse para realizar estudos, dentre eles se faz necessário pesquisas sobre o possível papel das fezes das aves na cadeia epidemiológica dos fungos na região Norte de Mato Grosso, uma vez que o conhecimento a respeito da microbiota presente em uma população de pombos poderá permitir a identificação de possíveis reservatórios que possam ser responsáveis pela transmissão de fungos patogênicos, podendo contribuir como um alerta para implementação de maior vigilância sanitária com o intuito de impedir a proliferação e, consequente, a transmissão de fungos potencialmente patogênicos causadores de micoses oportunistas.

2. OBJETIVO

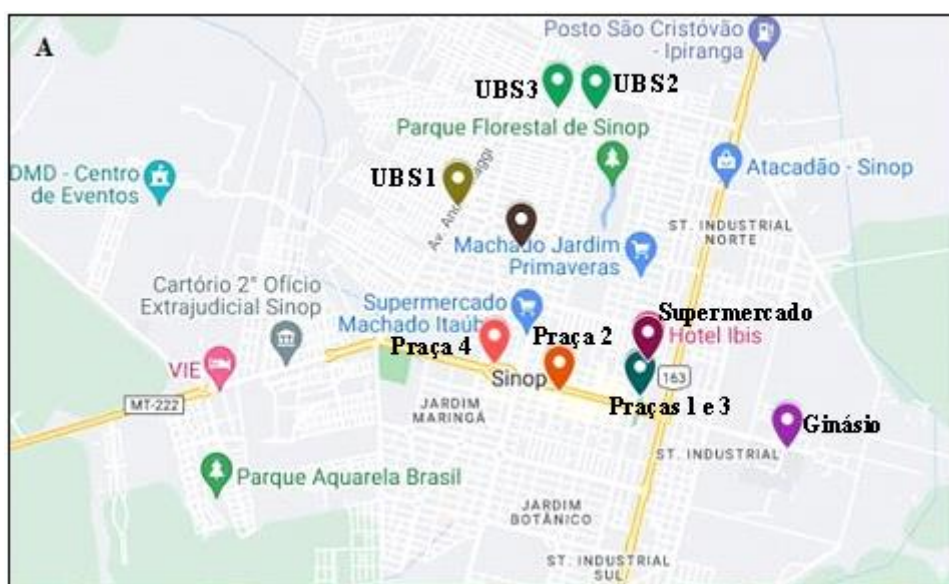
Identificar leveduras patogênicas e não patogênicas em amostras de fezes de aves com potencial risco de infecção para seres humanos e animais em Sinop no Mato Grosso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

As amostras de fezes de aves foram coletadas no período de outubro de 2021 a outubro de 2022 resultando em 26 amostras de fezes em 9 locais na cidade de Sinop-MT (Praça 1 n = 2; Ginásio n = 2; Praça 2 n = 1; Praça 3 n = 2; Supermercado n = 6; Unidade Básica de Saúde – UBS 1 n = 6; UBS 2 n = 1; Praça 4 n = 2; UBS 3 n = 4) que apresentam circulação diária de pessoas e animais, por serem considerados ambientes de lazer e necessidades básicas.

Figura 1 – Mapa de localização de coleta das amostras de fezes na cidade de Sinop-MT.



Fonte: INDE 2023 (<https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-sobre-posicionamento-geodesico/redegeodesica/16284-rede-planialtimetrica.html?=&t=acesso-ao-produto>).

3.2 Coleta das amostras

As amostras de fezes de aves foram coletadas com auxílio de espátulas, pinças, e acondicionadas em frascos estéreis, devidamente identificados, posteriormente transportados em caixas climatizadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas e Parasitológicas (LAMP) da UFMT, Campus Sinop para processamento. Em todo o processo foram utilizados EPI, como luvas e máscaras durante as coletas.

3.3 Processamento das amostras

As amostras foram pesadas e 0,5 g de cada foi suspensa em 5 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril, homogeneizada vigorosamente em vórtex por 5 minutos e mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi semeado em meio Ágar Sabouraud Dextrosado a 2% acrescido de cloranfenicol a 0,5%, incubado a 25°C por um período de 5 a 7 dias. Após crescimento fúngico, as colônias foram analisadas quanto as suas características macroscópicas: coloração (superfície e reverso), textura cremosa e tempo de crescimento. Essas características foram importantes, pois ajudaram na identificação do provável agente etiológico. As colônias com características leveduriformes foram reisoladas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose a 4% e submetidas às mesmas condições de incubação e temperatura para a obtenção de colônias puras.

3.4 Testes de identificação morfológica

3.4.1 Teste tinta nanquim

Para verificar a presença de leveduras capsuladas foi realizado o teste de tinta da China também conhecido como teste Tinta de Nanquim, na qual foi pego uma alçada de colônia isolada e passada em uma lâmina, gotejou 1 gota de tinta de nanquim preto e colocou a lamínula para realizar a visualização por microscópio óptico. Quando as leveduras possuíam capsulas eram presuntivos de *Cryptococcus* sp.

3.4.2 Cultura em CHROMagar *Candida*

Todas as amostras analisadas foram semeadas em CHROMagar *Candida* e a partir da coloração visualizada após o crescimento das colônias pode-se presumir algumas espécies, sendo azul para *C. tropicalis*, rosa *C. krusei*, laranja *Rhodotorula* spp, branca outra espécie.

3.4.3 Testes de azul de metileno

As amostras foram analisadas entre lâmina e lamínula adicionadas ao corante azul de metileno que confere uma coloração azulada e permite a visualização das formas estruturais dos fungos.

3.4.4 Testes de tubo germinativo

Após a amostra ser reisolada em sabouraud, foi escolhida uma colônia isolada para fazer suspensão em tubo de ensaio de capacidade de 5ml contendo 0,5 mL de soro humano. Realizou-se a incubação em estufa a 37°C por um período de 2 horas. Quando o horário foi atingido, uma gota da suspensão foi posicionada entre lâmina e lamínula e observada a formação do tubo germinativo em microscópio óptico. É considerado presuntivo para *Candida albicans* quando positivo para formação de tubo germinativo.

3.4.5 Testes de microfilamentação em Ágar Fubá

Utilizando a técnica de Rivalier & Seydel foi montado um microcultivo utilizando placa de Petri, lâmina com uma película do meio de ágar fubá com tveem 80, lamínula, algodão, água destilada e tampa de plástico. Após fazer 3 estrias na lâmina com ágar fubá colocou-se a lamínula e na placa de Petri, esta lâmina foi posicionada sobre tampa de plástico. Para manter reduzir a probabilidade de o meio secar, é adicionada água destilada no fundo da placa e colocado um algodão também embebido de água. Com a finalização deste preparo, o cultivo foi incubado em BOD a 37°C por 72h e realizou-se a verificação da formação de filamentação através de microscópio óptico com lente de 40 X.

3.5 Sequenciamento

A confirmação da espécie de leveduras foi realizada pelo sequenciamento parcial da região intergênica (ITS1-5.8S-ITS2) de DNA ribossomal (rDNA) por meio das seguintes sequências iniciadoras *Senso* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e *Anti-senso* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). As condições de PCR utilizadas foram iguais as previamente descritas para amplificação da região intergênica (ITS1-5.8S-ITS2) (WHITE, 1990). O sequenciamento foi realizado nas direções 5' e 3' por meio do sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems) e kit comercial *Big Dye Terminator Sequencing* (Applied Biosystems) na plataforma de sequenciamento da Fiocruz, sob supervisão do Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista Oliveira.

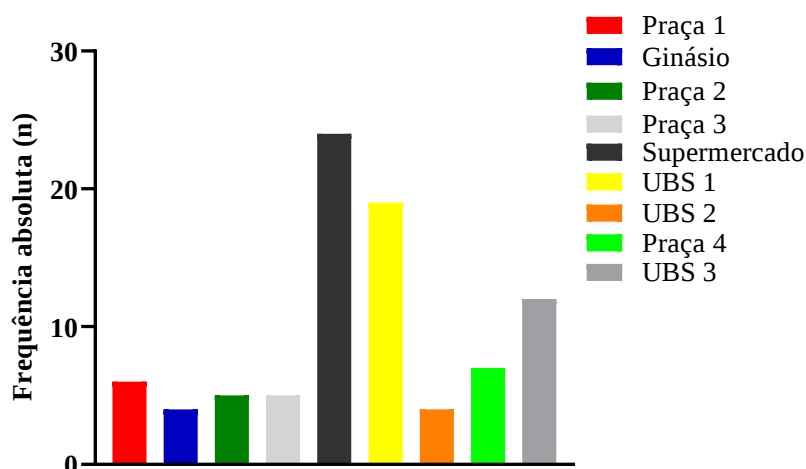
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 26 amostras de fezes secas de aves coletadas em diferentes locais na cidade de Sinop-MT, no período de outubro de 2021 a novembro de 2022, foram isoladas 86 leveduras, sendo 6 na Praça 1, 5 na Praça 2, 5 na Praça 3, 7 na Praça 4, 4 no Ginásio, 24 no Supermercado, 19 na UBS 1, 4 na UBS 2, 12 na UBS 3 (Figura 2), identificadas por método cromógeno e caracterização morfológica, sendo 19 confirmadas por sequenciamento conforme Tabela 1 (Anexo I). Todos os isolados, exceto *Candida africana*, foram negativos para prova do tubo germinativo.

Os locais de coleta escolhidos apresentam alta circulação de pessoas diariamente, sendo locais de lazer e necessidades básicas, onde as praças eram locais com bastante árvores e vegetação, sendo visitada principalmente no final da tarde e fins de semana por famílias, o ginásio ao entorno também possuía vegetação e é utilizado principalmente por universitários e servidores da UFMT, as UBS possuem vegetação próxima e são frequentadas diariamente pela população, nelas a coleta foi realizada na parte externa, e o supermercado apesar de ser mais urbanizado também continha vegetação ao redor e é bastante visitado diariamente pela população consumidora, as coletas neste último ponto foi realizada no estacionamento. Nestes ambientes é comumente possível visualizar algumas aves, principalmente passarinhos de diversas espécies, pombos e araras, contribuindo para que nestes locais seja encontrada excreta de aves. O P1 foi considerado o ponto central. A distância entre o P1 e o P2 foi de 1,1 km, entre o P1 e o P3 270 metros, entre o P1 e o P4 de 1,8 km, entre o P1 e o G 2,3 km, entre o P1 e U1 3,5 km, entre o P1 e U2 4,7 km, entre P1 e U3 3,1 km e entre P1 e S 400 metros. Em todos os locais, foram isoladas leveduras, sendo maior no Supermercado, seguido por UBS 1, UBS3, Praça 4, Praça1, Praça 2, Praça 3, Ginásio e UBS2 (Figura 2).

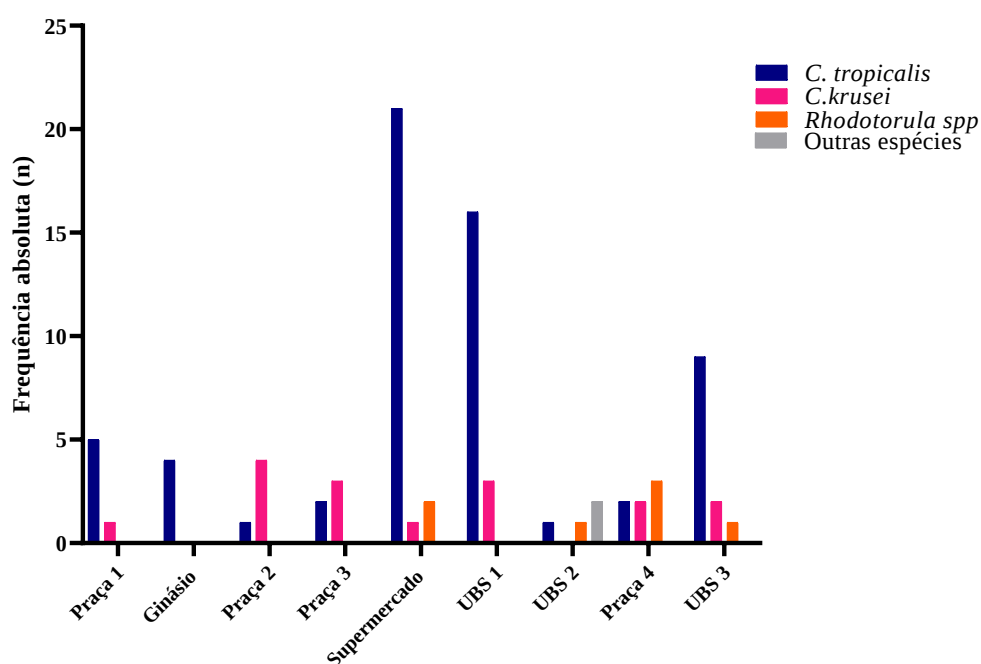
Esse indicador pode ser estabelecido pelo fato de que as aves estão em constante mudança de local de acordo com suas necessidades básicas como alimentação, abrigo e reprodução, e podem ter passado por todos esses locais ou podem ser vários indivíduos aviários diferentes que continham em sua microbiota leveduras e acabaram por despejar-las junto a suas excretas no ambiente. Este conhecimento, pode despertar um importante fator de risco para as pessoas imunologicamente sensíveis que circulam por estes locais, uma vez que estão mais suscetíveis a infecções (SIQUEIRA *et al.*, 2022).

Figura 2 – Frequência absoluta das leveduras isoladas a partir das amostras de fezes de aves de acordo com os locais.



Do total de isolados a partir de amostras de fezes de aves, 61 (70,93%) assumiram uma pigmentação azul, sugestivamente identificados como *Candida tropicalis*, 16 (18,60%) com coloração rosa *C. krusei* – nova nomenclatura *Pichia kudriavzevii*, 7 (8,14%) com coloração alaranjada *Rhodotorula spp.*, 2 (2,33%) com coloração branca, como sendo outras espécies, havendo diferença estatística entre as espécies identificadas e os locais de coleta ($p < 0,0001$) (Figura 3).

Figura 3 – Frequência absoluta das espécies identificadas presuntivamente em Chromágar *Candida* por locais no Norte de Mato Grosso.

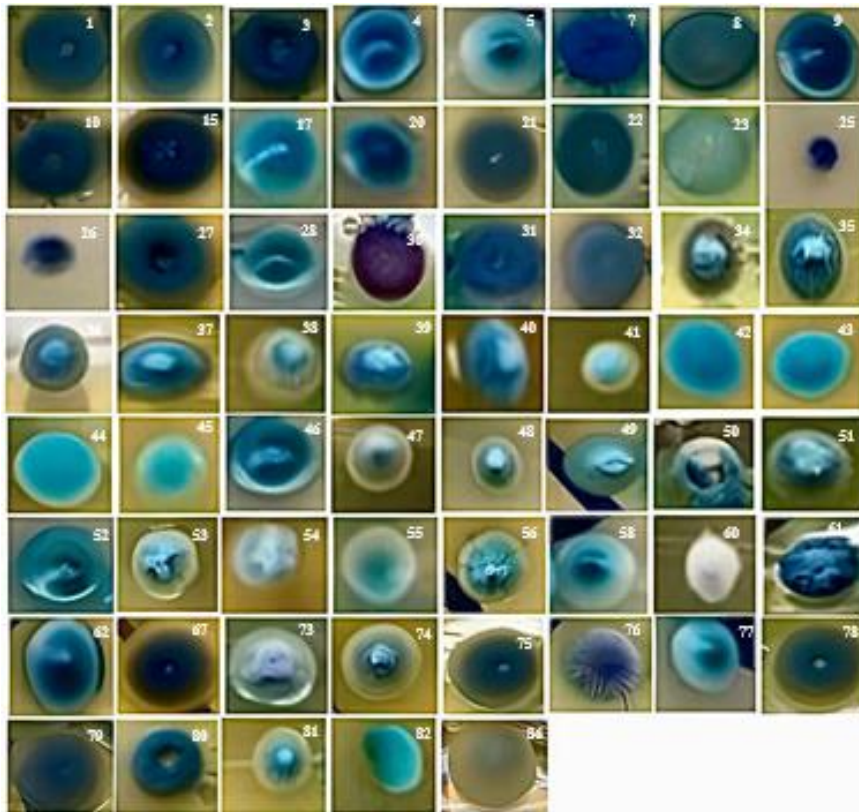


A riqueza e a composição da população de aves fornecem dados valiosos para entender a sensibilidade e a resistência das espécies em diferentes habitats, locais de nidificação e migração, podendo ser adversamente afetadas por infecções oportunistas (MANICA *et al.*, 2010). Diversos estudos relatam que diferentes espécies de *Candida spp.* frequentemente causam doenças respiratórias e gastrintestinais em aves e, também podem causar doenças graves em indivíduos imunocomprometidos, pois a maioria das infecções humanas são adquiridas de exposição ambiental (EVANS, 2010; GNAT *et al.*, 2021; MALEKIFARD; GHANIEI; EIDI, 2023).

As leveduras do gênero *Candida sp.* são consideradas um dos principais patógenos oportunistas a causar infecções nos seres humanos. Encontrada na microbiota normal de um ser humano saudável, em situações adversas pode se tornar patogênica, ocasionando infecções superficiais ou sistêmicas (KIM; KIM, 2021). De acordo com McCarty *et al.* (2021), existem pelo menos seis patógenos mais comuns capazes de evoluírem para infecções invasivas em humanos, como *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. auris*.

Dos 61 isolados sugestivamente identificados como *Candida tropicalis* em meio cromógeno (Figura 4), 5 (1, 2, 22, 78 e 79) apresentaram colônias circulares, convexas, bordos inteiros, brilhosas e superfície lisa em ágar Sabouraud (Figura 5 A) e 56 (3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 17, 20, 21, 23, 25, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 61, 62, 67, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 86) apresentaram colônias circulares, bordos ondulados, papiladas, foscas e com diferentes perfis de rugosidade (Figura 5 B). Todos os isolados apresentaram características micromorfológicas semelhantes, leveduras redondas e grandes, entretanto as características macroscópicas das colônias foram diferentes na forma, bordos, superfície, brilho, elevação e consistência. Diversos autores relatam que *C. tropicalis* possui a capacidade de realizar comutação fenotípica e alterar suas características morfológicas, fisiológicas e patogênicas a partir de um genótipo conservado (SUZUKI; MIYAMAE; ISHIDA, 1991; JOLY *et al.*, 1996; MORALES *et al.*, 2014; MOREIRA, 2019).

Figura 4 – Variantes de pigmentação das colônias identificadas sugestivamente como *C. tropicalis* em Chromagar Candida.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5 – Características macromorfológicas de leveduras identificadas sugestivamente como *C. tropicalis* em ágar Sabouraud.



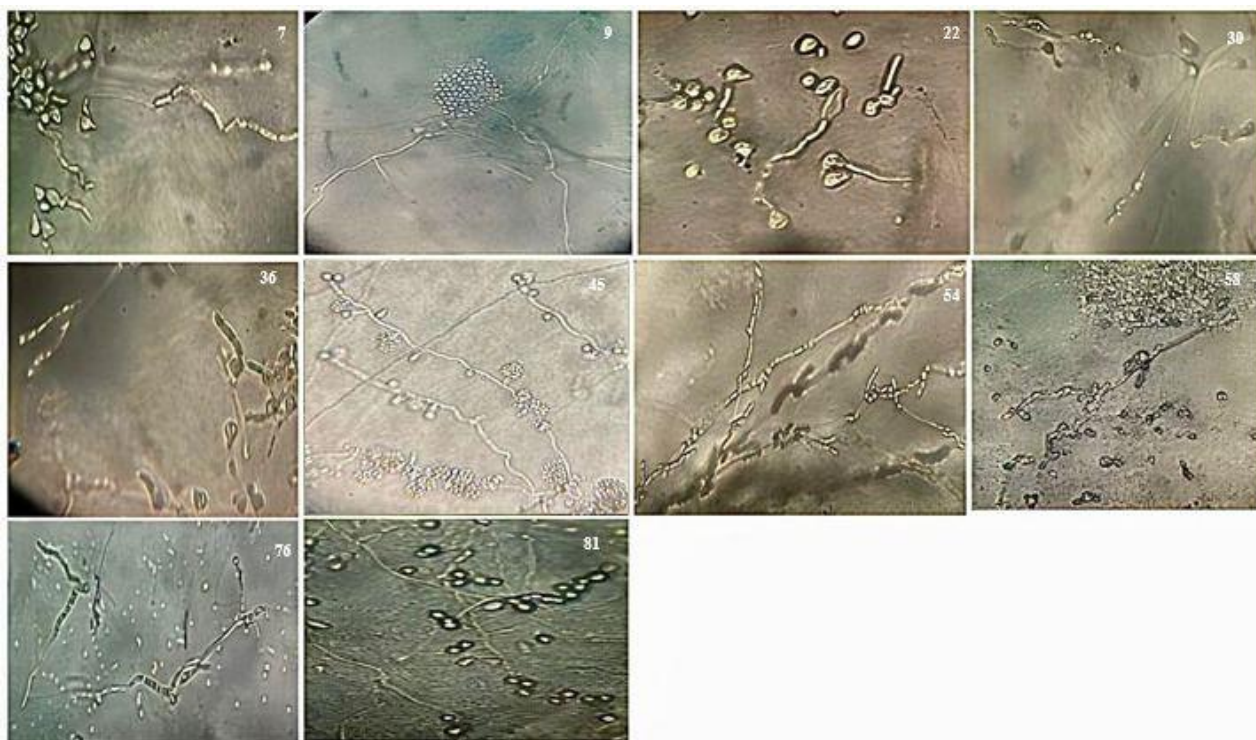
Fonte: Arquivo pessoal.

Após a identificação sugestiva, 10 isolados foram submetidos a identificação fenotípica por meio da microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80 e, destes, 6 isolados (7, 22, 36, 58, 76 e 81) apresentaram blastoconídios ovais, pseudo-hifas abundantes em cadeia simples ou ramificadas, longas condizentes com *C. tropicalis*, 1 (9) apresentou característica semelhante a *Candida guilliermondii* com blastoconídios na constrição da pseudohifa e pseudomicélio muito fino e ramificado, 2 (30 e 54) apresentaram características de *Trichosporon spp.*, com presença de artroconídios, 1 (45) apresentou blastoconídios em cacho e pseudohifas (Figura 6) semelhante a *Candida africana*, porém todos os sugestivos se fazem necessário confirmação através de biologia molecular. Alguns resultados foram semelhantes aos encontrados por Jafarian *et al.* (2022), Pfaller e colaboradores (2006); Silva *et al.* (2019), Tietz *et al.* (2001), respectivamente.

A identificação por intermédio do meio cromógeno com a micromorfologia demonstrou que 60 % (n = 6) das espécies tiveram sua micromorfologia compatível com a encontrada no meio CHROMagar *Candida*, conforme demonstrado na Tabela 1.

De acordo com Francisco e Hagen (2022), leveduras do gênero *Trichosporon sp.* podem ser encontradas no ambiente e em excretas de aves e são capazes de causador micoses superficiais, consideradas benignas e acometem, preferencialmente, o couro cabeludo, a axila e a região pubiana, entretanto, pode ocasionar infecções sistêmicas como endocardite, peritonite, infecções do sistema nervoso central e infecções do trato urinário, principalmente em pacientes graves, imunossuprimidos, sujeitos a longo período de internação e submetidos a procedimentos invasivos. Além disso, a inalação persistente ou recorrente de antígenos de *Trichosporon* pode causar uma reação de hipersensibilidade, ocasionando pneumonia por hipersensibilidade. As espécies associadas a Piedra branca são *Trichosporon asahii*, *Cutaneotrichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon ovoides* e *Trichosporon loubieri*, já a associada a onicomiose é somente a *Cutaneotrichosporon cutaneum* (MEHTA *et al.*, 2021; KIDD; ABDOLRASOULI; HAGEN, 2023). Algumas espécies de *Trichosporon* são intrinsicamente resistentes, como é o caso do *Trichosporon asahii* (FRANCISCO; HAGEN, 2022).

Figura 6 – Características micromorfológicas dos isolados em ágar em Ágar Fubá Tween 80.



Fonte: Arquivo pessoal.

A *Candida africana* (45) previamente identificada através na microfilamentação, foi enviada para sequenciamento em biologia molecular juntamente com outras 18 amostras, uma vez que apesar do presuntivo de acordo com sua forma estrutural é necessária esta confirmação, visto que em relação a *Candida africana*, é a primeira vez no Brasil que esta espécie é identificada em outro sítio que não o vaginal humano. Esta espécie é relacionada a infecções vulvovaginais (HAZIROLAN *et al.*, 2017).

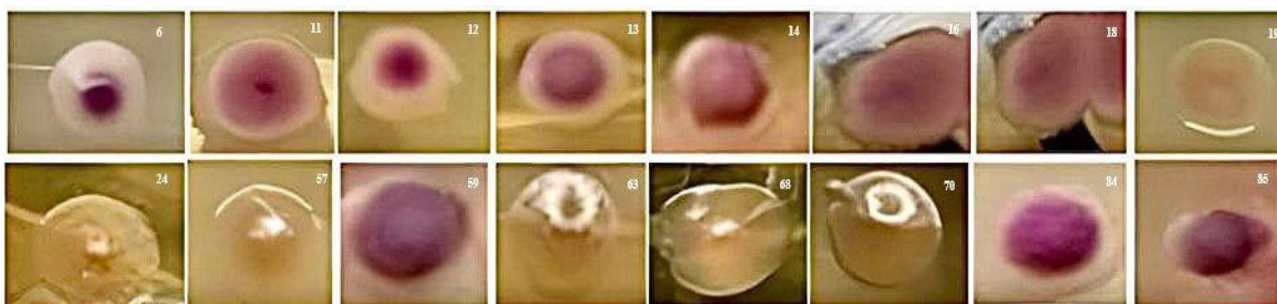
Tabela 1 – Correlação das características cromogênicas em Chromagar *Candida* e a microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80.

ID	IDENTIFICAÇÃO	
	Chromoagar <i>Candida</i>	Ágar Fubá Tween 80
7	Azul	<i>C. tropicalis</i>
9	Azul	<i>C. guilliermondii</i>
22	Azul	<i>C. tropicalis</i>

30	Azul	<i>Trichosporon spp.</i>
36	Azul	<i>C. tropicalis</i>
45	Azul	<i>C. africana</i>
54	Azul	<i>Trichosporon spp.</i>
58	Azul	<i>C. tropicalis</i>
76	Azul	<i>C. tropicalis</i>
81	Azul	<i>C. tropicalis</i>

Os 16 isolados sugestivamente identificados como *Candida krusei* (Figura 7) (6, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 24, 57, 59, 63, 68, 70, 84 e 85) apresentaram colônias circulares, bordos ondulados, papiladas, foscas e com diferentes perfis de rugosidade (Figura 8). Todos os isolados apresentaram características micromorfológicas semelhantes, leveduras ovais e alongadas, e colônias com perfis de rugosidade diferentes.

Figura 7 – Variantes de pigmentação das colônias identificadas sugestivamente como *C. krusei* em Chromagar *Candida*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 – Características macromorfológicas de leveduras identificadas sugestivamente como *C. krusei* em ágar Sabouraud.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80, 2 (16, 57) isolados apresentaram blastoconídios alongados agrupados nas constrições do pseudomicélio condizentes com *C. krusei*, corroborando com resultados descritos por Sachivkina, Podoprighora e Bokov (2021), isolado 6 apresentou pseudohifas abundantes e blastoconídios com brotamento constricto condizente com *C. lusitaniae* (MENDOZA-REYES; GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2022), 14 apresentou pequenos blastoconídios agrupados características de *C. glabrata* (NAICKER et al., 2023) e, o isolado 19 apresentou hifas e artroconídios em formatos cúbicos e cilíndricos curtos, condizentes com *Apiotrichum loubieri* (MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2021) (Figura 9). A identificação por intermédio do meio cromógeno com a micromorfologia demonstrou que 40 % (n = 2) das espécies tiveram sua micromorfologia compatível com a encontrada no meio CHROMagar *Candida*, conforme demonstrado na Tabela 2.

Figura 9 – Características micromorfológicas em ágar em Ágar Fubá Tween 80.



Fonte: Arquivo pessoal.

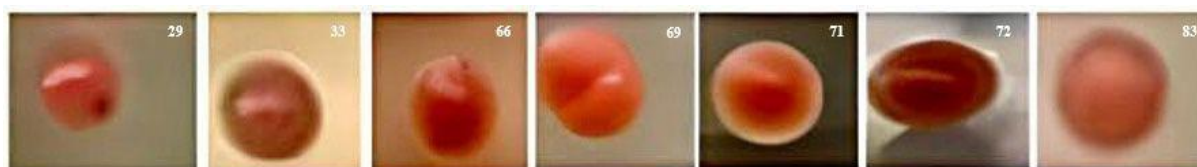
Tabela 2 – Correlação das características cromogênicas em Chromagar *Candida* e a microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80.

ID	IDENTIFICAÇÃO	
	Chromagar <i>Candida</i>	Ágar Fubá Tween 80
6	Rosa	<i>C. lusitaniae</i>
16	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
14	Rosa	<i>N. glabrata</i>
19	Rosa	<i>A. loubieri</i>
57	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>

Foram identificadas 7 leveduras do gênero *Rhodotorula spp.* (Figura 10), e destas, 3 (29, 33 e 69) apresentaram colônias circulares, convexas, bordos inteiros, brilhosas e superfície

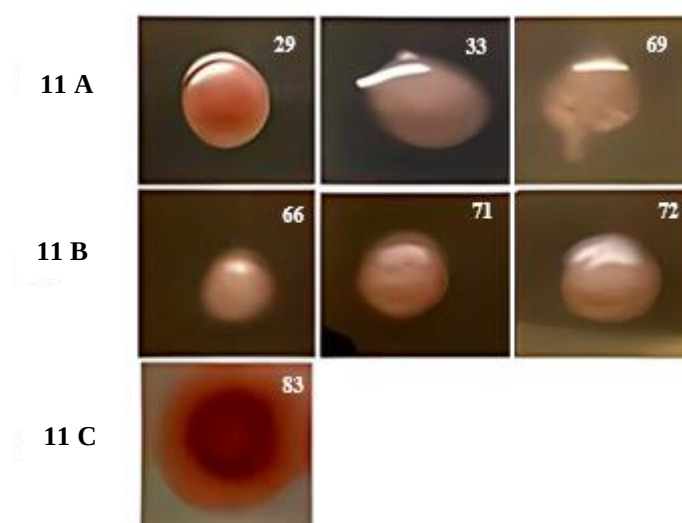
lisa em ágar Sabouraud (Figura 11 A) semelhantes, 3 (66, 71, 72) (Figura 11 B) colônias circulares, bordos ondulados, papiladas, foscas e com diferentes perfis de rugosidade e 1 (83) (Figura 11 C) colônia circular, bordo inteiro, plana, fosca e superfície miceliar. Todos os isolados apresentaram características micromorfológicas semelhantes, leveduras redondas e grandes, ausência de cápsula, e as características macromorfológicas diferentes. As características microscópicas do gênero incluem células leveduriformes ovais, esferoidais ou alongadas, com brotamento polar ou multilateral, ausência ou formação de pseudo-hifa, e algumas espécies podem apresentar cápsula e, as colônias são facilmente detectáveis visualmente, devido a produção de pigmento carotenoide típico, variando de cor laranja a avermelhada, podendo apresentar diferenças na forma, bordos, superfície, brilho, elevação e consistência conforme a espécie (NASCIMENTO *et al.*, 2015; ALVES, 2019).

Figura 10 – Variantes de pigmentação das colônias do gênero *Rhodotorula spp.* em Chromagar *Candida*.



Fonte: Arquivo pessoal.

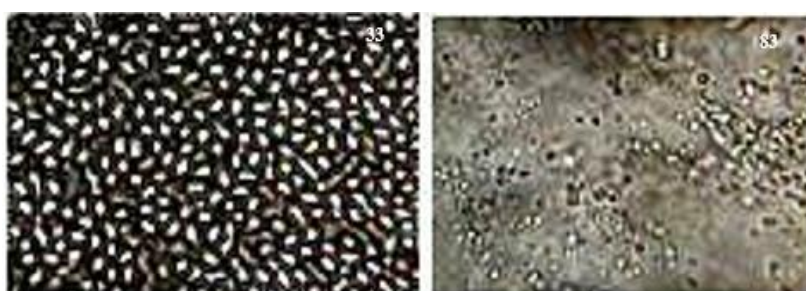
Figura 11 – Características macromorfológicas de leveduras identificadas do gênero *Rhodotorula spp.* em ágar Sabouraud.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na microfilamentação em Ágar Fubá Tween 80, 2 isolados (33, 83) apresentaram células leveduriformes e ausência de pseudo-hifa condizentes com *Rhodotorula spp.* (Figura 12). *Rhodotorula* é uma levedura amplamente encontrada em animais, plantas, rios, lagos e oceanos, pode constituir transitoriamente a microbiota gastrintestinal de seres humanos e animais e ser considerada um patógeno oportunista, induzindo fungemia frequentemente associados a cateteres centrais e até mesmo infecções de órgãos sólidos, como endoftalmite endógena (HOF, 2019; SACHIVKINA; PODOPRIGORA; BOKOV, 2021).

Figura 12 – Características micromorfológicas em ágar em Ágar Fubá Tween 80.



Fonte: Arquivo pessoal.

O gênero *Rhodotorula sp.* compreende leveduras consideradas patógenos emergentes e oportunistas comumente encontradas no ambiente e responsáveis por causar diversas infecções em humanos como meningite, peritonite associada à diálise peritoneal e ceratite, além de manifestações mais raras como infecções de pele, ossos e articulações. As espécies mais proeminentes são *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula minuta* (GARCÍA-SUÁREZ et al., 2011; IOANNOU; VAMVOUKAKI; SAMONIS, 2018). As espécies de *Rhodotorula* são consideradas menos virulentas do que as de *Candida*, porém *R. mucilaginosa* é designada como a quarta espécie mais comum de causar fungemia em pacientes imunocomprometidos (HIRANO, MITSUHASHI, OSANAI; 2022). Ayaz (2020) relatou 4 casos de *Rhodotorula mucilaginosa* em 4 pacientes hospitalizados e que foram a óbito na Turquia.

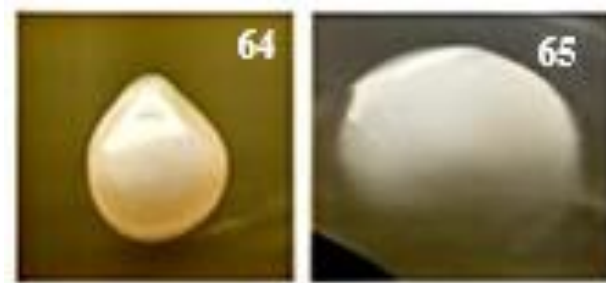
Na identificação presuntiva como sendo outras espécies de *Candida* (Figura 13), 2 (64 e 65) isolados apresentaram colônias circulares, convexas, bordos inteiros, brilhosas e superfície lisa (Figura 14), e microscopicamente, leveduras redondas. Na microfilamentação em ágar fubá com Tween 80, o isolado 64 apresentou células grandes e pseudohifas curvas e finas condizentes com *C. parapsilosis* (Figura 15).

Figura 13 – Pigmentação das colônias caracterizadas como outras espécies de *Candida* em Chromagar *Candida*.



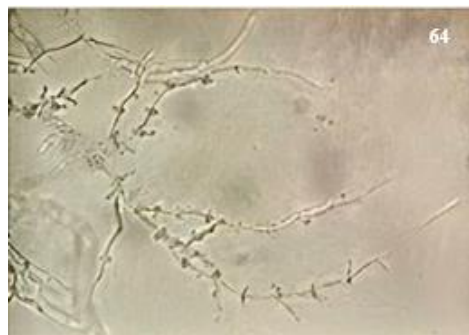
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 – Características macromorfológicas de leveduras em ágar Sabouraud.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15 – Características micromorfológicas em ágar em Ágar Fubá Tween 80.



Fonte: Arquivo pessoal.

O meio cromógeno CHROMagar *Candida* é um meio seletivo amplamente utilizado para a identificação presuntiva de algumas espécies de *Candida*, de forma simultânea e mais rápida, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, possibilitando a orientação da terapêutica correta (GASCHET et al., 2008; TAMURA; ALSHAHNI; MAKIMURA, 2022). Entretanto, diversos autores relatam pigmentações semelhantes a verde, rosa e azul para outras

espécies como *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. auris*, entre outras, diminuindo assim a sensibilidade e especificidade do meio (WILLINGER *et al.*, 2001; GASCHET *et al.*, 2008; TAMURA; ALSHAHNI; MAKIMURA, 2022). Portanto, para evitar possíveis erros de identificação de algumas espécies são necessários testes moleculares para a confirmação (DU *et al.*, 2020).

Para a confirmação das espécies, foi realizada a identificação molecular de 19 isolados pela amplificação e posterior sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal, sendo 4 (21,05%) como *Candida tropicalis* (1, 7, 20, 28), 1 (5,26%) como *Clavispora lusitaniae* (6), 3 (15,79%) como *Pichia kudriavzevii* (12, 16, 18), 2 (10,53%) como *Nakaseomyces glabrata* (14, 59), 1 (5,26%) como *Apiotrichum loubieri* (19), 2 (10,53%) como *Rhodotorula spp.* (33, 66), 3 (15,79%) como *Trichosporon asahii* (34, 35, 60), 2 (10,53%) como *Diutina rugosa* (43, 44) e 1 (5,26%) como *Candida africana* (45) (Tabela 3).

Tabela 3 – Características cromógenas em Chromagar *Candida* e sequenciamento.

LOCAL	ID	IDENTIFICAÇÃO	
		Chromoagar <i>Candida</i>	Sequenciamento
Praça 1	1	Azul	<i>C. tropicalis</i>
	6	Rosa	<i>C. lusitaniae</i>
Ginásio	7	Azul	<i>C. tropicalis</i>
Praça 2	12	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
	14	Rosa	<i>N. glabrata</i>
Praça 3	16	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
	18	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
	19	Rosa	<i>A. loubieri</i>
	20	Azul	<i>C. tropicalis</i>
	28	Azul	<i>C. tropicalis</i>
Supermercado	33	Laranja	<i>Rhodotorula spp.</i>
	34	Azul	<i>T. asahii</i>
	35	Azul	<i>T. asahii</i>
	43	Azul	<i>D. rugosa</i>
	44	Azul	<i>D. rugosa</i>
UBS 1	45	Azul	<i>C. africana</i>
	59	Rosa	<i>N. glabrata</i>

	60	Azul	<i>T. asahii</i>
UBS 2	66	Laranja	<i>Rhodotorula spp.</i>

A capacidade de identificação do meio cromógeno comparada com o método molecular demonstraram que 36,84% apresentaram resultados semelhantes pelos dois métodos e 63,16% apresentaram resultados discrepantes. Oliveira *et al.* (2006) correlacionaram os métodos de identificação do meio cromógeno e molecular, sendo utilizados 52 isolados clínicos de *Candida spp.*, e destes, 65,4% apresentaram resultados semelhantes pelos dois métodos, 23,1% apresentaram resultados discrepantes e 11,5% das cepas não puderam ser identificadas. Martins *et al.* (2010) compararam o meio cromógeno com a técnica molecular de PCR e a sensibilidade e especificidade encontrada foi de 97,9% e 83,3%, respectivamente, para *C. albicans*, 66,7%, e 100%, respectivamente, para *C. tropicalis*. Os meios cromógenos de identificação de espécies do gênero *Candida spp.* vem sendo desenvolvidos e utilizados em diversos países do mundo, seus componentes são diferentes e as cores produzidas pelas cepas podem variar. Entretanto, são utilizados na rotina laboratorial, pois facilita a identificação presuntiva e ajuda na escolha correta da terapêutica, acelerando a liberação dos resultados dos exames (ALFONSO *et al.*, 2010).

A partir de todos os métodos de identificação utilizados, nossos resultados demonstraram maior predominância da espécie *C. tropicalis* em amostras de fezes de aves, corroborando estudos anteriores que demonstraram diferentes espécies de leveduras isoladas em amostras de fezes, e que por meio de propágulos fúngicos, podem se espalhar pelo ambiente e serem transmitidos aos seres humanos e animais, ocasionando micoses oportunistas (SILVA; CAPUANO, 2008; MOUTINHO *et al.*, 2015; FARIAS, 2016).

Gugnani *et al.* (2020) isolaram em excrementos de pombos no Caribe Holandês leveduras das espécies *C. neoformans* (7,5%), *C. albicans* (15%), *C. parapsilosis* (20%), *C. metapsilosis* (5%), *C. orthopsilosis* (5%), *C. carpophila* (5%), *C. fabianii* (5%), *C. pelliculosa* (5%), *C. famata* (5%), espécies inespecíficas de *Candida spp.* (17,5%), *Trichosporon spp.* (12,5%) e *Sporobolomyces spp.* (5%).

Araújo *et al.* (2020) isolaram em 75% das amostras de fezes de pombos, no Distrito Federal, *Pichia kudriavzevii*, em 15% *Cryptococcus sp.*, em 50 % *C. tropicalis*, em 15% *C. glabrata* e em 100% *Rhodotorula sp.*

As leveduras dos gêneros *Candida sp*, *Rhodotorula sp* e *Trichosporon sp* isoladas em amostras de fezes de pombos podem ocasionar micoses oportunistas (VAZQUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2013; SHARIATI *et al.*, 2020) e, nos últimos anos, dados indicam que

esses patógenos zoonóticos podem ser multirresistentes e estarem relacionados com altas taxas de mortalidade (SILVA et al., 2020; BERGAMASCO et al, 2021; FRÍAS-DE-LEON et al., 2021).

De acordo com Vishniac (2006), a diversidade de leveduras em diferentes ambientes está relacionada a temperatura, a umidade, a composição química e a localização geográfica. Como as aves são migratórias e conseguem albergar leveduras potencialmente patogênicas em seu trato gastrointestinal, ao circularem por vários ambientes e eliminarem suas excretas, podem contaminar muitos locais de acordo com os micro-organismos que estão presentes em sua microbiota. Sendo assim, as aves possuem um importante papel tanto na contaminação ambiental (CAFARCHIA et al., 2008).

Nossos resultados também demonstraram cepa de *Candida africana* (ID 45) a partir de amostras de fezes de aves, ainda não descrita no Brasil. Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1995 como sendo uma variação pertencente a *C. albicans* que apesar de produzir tubo germinativo, não forma clamidósporos e possuir a capacidade de assimilar xilose (MUCCI et al., 2017; RODRIGUES, 2020). *C. africana* raramente causa infecções invasivas nos seres humanos, contudo, foi isolada em pacientes com infecções vaginais na África, Argentina, Itália, Espanha, Polônia, Reino Unido, Chile, Nigéria, Senegal e a Alemanha (TIETZ et al., 1995; ROMEO; TIETZ; CRISEO, 2013; THEILL et al., 2016; ROSATI et al., 2022). Em contrapartida, segundo Romeo, Tietz e Criseo (2013) a *C. africana* pode estar associada a um aspecto clínico mais vasto de infecções inclusive potencialmente fatais, dando exemplo de um caso de recém-nascido com infecção sistêmica e envolvimento renal. Porém, em nosso estudo a cepa de *C. africana* foi isolada de excretas de pombos de uma UBS, trazendo um panorama de que está em território brasileiro e pode infectar seres humanos.

Apesar de algumas das espécies identificadas em nosso estudo serem colonizadores da microbiota normal, constituem um problema de saúde pública, pois podem trazer malefícios para a saúde humana e animal (ARENDRUP, 2013; MCCARTY et al., 2021).

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que houve diversidade e elevado número de leveduras isoladas a partir de amostras de fezes de aves em locais com fluxo diário de pessoas, principalmente no supermercado. Sendo a espécie mais frequente em todos os locais de coleta e predominantemente no supermercado, identificada por meio de CHROMagar® *Candida C. tropicalis* (70,93%), podendo servir de alerta para a população principalmente imunossuprimida, idosos e crianças que circulam por este ambiente.

A identificação molecular de 19 isolados pela amplificação e posterior sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal, sendo 21,05% como *C. tropicalis*, 5,26% como *C. lusitaniae*, 15,79% como *P. kudriavzevii*, 10,53% como *N. glabrata*, 5,26% como *A. loubieri*, 10,53% como *Rhodotorula spp.*, 15,79% como *T. asahii*, 10,53% como *D. rugosa* e 5,26% como *C. africana*.

Foi possível identificar pela primeira vez no Brasil, através dos métodos clássicos e do sequenciamento, a espécie *Candida africana* em fezes de aves que foram coletadas na parte externa de uma UBS localizada em Sinop no Mato Grosso, trazendo uma preocupação, uma vez que esta espécie só tinha sido identificada em amostras vulvovaginais e orais relacionadas a manifestações de candidíase, já que são relacionadas como possíveis causadores de infecções vulvovaginais. No entanto, como foram encontradas presentes nas fezes de aves que estavam no ambiente podem contribuir para uma possível disseminação desta espécie no Brasil.

Do total de leveduras isoladas e identificadas, 36,84% apresentaram resultados semelhantes pelos métodos cromógeno e sequenciamento, e 63,16% resultados discrepantes.

Portanto, para a confirmação definitiva das diferentes espécies isoladas, a partir das amostras de fezes de aves neste estudo, será necessário realizar sequenciamento para conseguir identificar a variedade de espécies confirmativamente identificadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULREESH, H. H. ORGANJI, S. R.; ELBANNA, K.; *et al.* Diversity, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Patterns of Pathogenic and Opportunistic Yeast Species in Rock Pigeon (*Columba livia*) Fecal Droppings in Western Saudi Arabia. **Polish Journal Of Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 493-504, 1 dez. 2019.

ALFONSO, C.; LÓPEZ, M.; ARECHAVALA, A. *et al.* Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de brilliance *Candida* agar. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 90-93, abr. 2010.

ALVES, K.P. **Realidade e desafios de infecções emergentes por *rhodotorula* spp. em pacientes hospitalizados.** 2019. 68 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

AMÂNCIO, S.; SOUZA, V.B.; MELO, C. *Columba livia* e *Pitangus sulphuratus* como indicadoras de qualidade ambiental em área urbana. **Revista Brasileira de Ornitologia**, n.16; p.32-37. 2008.

ARENDRUP, M.C. *Candida* and Candidaemia Susceptibility and Epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. 1-32, 2013.

AYAZ, Ç.M.; GÜLMEZ, D.; AKDAĞLI, S.A. Nadir Etken Bir Maya: Üçüncü Basamak Üniversite Hastanesinde İzlenen *Rhodotorula mucilaginosa* Enfeksiyonu Olguları. **Mikrobiyol Bul**, v. 55, n. 1, p. 91-98, 13 out. 2020.

BERGAMASCO, M.D.; PEREIRA, C.A.P.; ARRAIS-RODRIGUES, C. *et al.* Epidemiology of Invasive Fungal Diseases in Patients with Hematologic Malignancies and Hematopoietic Cell Transplantation Recipients Managed with an Antifungal Diagnostic Driven Approach. **Journal Of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 588, 23 jul. 2021.

BONGOMIN, F.; EKENG, B. E.; KIBONE, W. *et al.* Invasive Fungal Diseases in Africa: a critical literature review. **Journal Of Fungi**, v. 8, n. 12, p. 1236-1243, 22 nov. 2022.

BOURSCHEID, C.L.P. R.; MOREIRA, R.B; REISCHAK, D. et al. Surveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in backyard poultry raised near migratory bird sites in Mato Grosso state, Brazil. Surveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in backyard poultry raised near migratory bird sites in Mato Grosso state, Brazil. **Revue Scientifique Et Technique de L'Oie**, v. 39, n. 3, p. 907-922, 1 dez. 2020.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; COCCIOLI, C. *et al.* Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Medical Mycology**, v. 46, n. 5, p. 429-434, jan. 2008.

CALDAS, C.C. **Frequência de Cryptococcus spp. e outras leveduras com potencial patogênico em excretas de aves silvestres em três municípios do estado de São Paulo**. 2017. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6143/tde-10102017135641/publico/CirlenedaCunhaCaldasREVISADA.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2023.

CANÓNICO-GONZÁLEZ, Y.; ADAME-RODRÍGUEZ, J.M.; MERCADO-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Cryptococcus spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 632-640, 23 nov. 2013.

COSTA, A. K. F.; SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; *et al.* Urban Pigeons (*Columba livia*) as a Potential Source of Pathogenic Yeasts: a focus on antifungal susceptibility of cryptococcus strains in northeast brazil. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 207-213, 22 out. 2009.

DOMYAN, Eric T.; SHAPIRO, Michael D.. Pigeonetics takes flight: evolution, development, and genetics of intraspecific variation. **Developmental Biology**, v. 427, n. 2, p. 241-250, jul. 2017.

DU, H.; BING, J.; HU, T. *et al.* *Candida auris*: epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **Plos Pathogens**, v. 16, n. 10, p. 555-623, 22 out. 2020.

ELLWANGER, J. H.; CHIES, J.A.B. Saúde Única (One Health): uma abordagem para entender, prevenir e controlar as doenças infecciosas e parasitárias. **Revista Bio Diverso**, v. 2, n. 1, p. 42-65, 2022.

EVANS, S. E. Coping with Candida Infections. **Proceedings Of The American Thoracic Society**, v. 7, n. 3, p. 197-203, 12 maio 2010.

FARIAS, J. N. B. (2016). Percepção popular sobre os pombos (*Columba livia*) como animais sinantrópicos no agreste paraibano, Nordeste do Brasil.

FENG, S.; STILLER, J., DENG, Y. *et al.* Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. **Nature** v. 587, n. 7833, p. 252–257, 2020.

FERREIRA, I. S.; CARDOSO, A. M. Pesquisa de *Cryptococcus* spp. em fezes de pombos recém-emitidas coletadas em espaços públicos de Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 233-236, 2018.

FRANCISCO, E. C.; HAGEN, F. JMM Profile: trichosporon yeasts. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 109-119, 6 dez. 2022.

FRÍAS-DE-LEÓN, M.G.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; CONDE-CUEVAS, E. *et al.* *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic combination. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1529, 22 set. 2021.

GARCÍA-SUÁREZ J.; GÓMEZ-HERRUZ P.; CUADROS J.A. *et al.* Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. *Mycoses*, v.54, n.4, p.314-324, Março. 2011.

GASCHET A., L'OLLIVIER C., LAPLANCHE A. *et al.* Evaluation of CandiSelect4, a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of *Candida* species from clinical specimens. **J Mycol Med** 18: 89-95, 2008.

GHADERI, Z.; EIDI, S.; RAZMYAR, J. High Prevalence of *Cryptococcus neoformans* and Isolation of Other Opportunistic Fungi From Pigeon (*Columba livia*) Droppings in Northeast Iran. **Journal Of Avian Medicine And Surgery**, v. 33, n. 4, p. 335, 9 dez. 2019.

GHAZI, S.; RAFEI, R.; OSMAN, M. *et al.* The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, n. 3, p. 245-252, set. 2019.

GLUSHAKOVA, A.M.; RODIONOVA, E. N.; Kachalkin, A. V. *et al.* Yeasts in Feces of Pigeons (*Columba livia*) in the City of Moscow. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 238-243, 23 out. 2020.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; DYLAŁ, M. A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 2095-2113, 22 fev. 2021.

GUSHIKEN, A.C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J.W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics Of North America**, v. 35, n. 2, p. 493-514, jun. 2021.

HAZIROLAN, G.; ALTUN, H.U.; GUMRAL, R. *et al.* Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: first turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 3, p. 376-381, set. 2017.

HIRANO R.; MITSUHASHI T.; OSANAI K. *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia, a Rare Opportunistic Infection without Central Venous Catheter Implantation, Successfully Treated by Liposomal Amphotericin B. **Case Reports In Infectious Diseases**, v. 2022, p. 1-4, 3 jun. 2022.

HOF, H. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine? **Drug Resistance Updates**, v. 11, n. 1-2, p. 25-31, 2008.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Sinop**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mt/sinop.html>. Acesso em: 28 jul. 2023.

INDE. **DADOS GEOESPACIAIS**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-sobre-posicionamento-geodesico/redegeodesica/16284-rede-planialtimetrica.html?=&t=acesso-ao-produto>. Acesso em: 19 jan. 2023.

IOANNOU, P.; VAMVOUKAKI, R.; SAMONIS, G. *Rhodotorula* species infections in humans: a systematic review. **Mycoses**, v. 62, n. 2, p. 90-100, 17 out. 2018.

JAFARIAN, H.; HARDANI, A. K.; ASNAFI, A. A. *et al.* Population structure, susceptibility profile, phenotypic and mating properties of *Candida tropicalis* isolated from pediatric patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 170, p. 105690, set. 2022.

JARROS, I.C.; BARROS, I.L.E.; PRADO, A. *et al.* Rhodotorula sp. and Trichosporon sp. are more Virulent After a Mixed Biofilm. **Mycopathologia**, v. 187, n. 1, p. 85-93, 2 dez. 2021.

JOLY, S.; PUJOL, C.; SCHRÖPPEL, K. *et al.* Development of two species-specific fingerprinting probes for broad computer-assisted epidemiological studies of *Candida tropicalis*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3063-3071, dez. 1996.

KIDD, S.; ABDOLRASOULI, A.; HAGEN, F. Fungal Nomenclature: managing change is the name of the game. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 1 jan. 2023.

KIM, D.; KIM, K. Hedera rhombea inhibits the biofilm formation of *Candida*, thereby increases the susceptibility to antifungal agent, and reduces infection. **Plos One**, v. 16, n. 10, p. 1-14, 6 out. 2021.

KRANGVICHAIN, P.; NIYOMTHAM, W.; PRAPASARAKUL, N. Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 3, p. 391-396, 2016.

LUSCHI, P.; DALL'ANTONIA, P. Anosmic pigeons orient from familiar sites by relying on the map-and-compass mechanism. **Animal Behaviour**, v. 46, n. 6, p. 1195-1203, dez. 1993.

MALEKIFARD, M.; GHANIEI, A.; EIDI, S. Fungal isolation and identification from parrot excreta in northeast Iran: a threat to human health. **Veterinary Medicine And Science**, v. 9, n. 3, p. 1194-1200, 4 abr. 2023.

MANICA, L.T.; TELLES, M; DIAS, Mm. Bird richness and composition in a Cerrado fragment in the State of São Paulo. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 243-254, 19 mar. 2010.

MARANHÃO, F. C. A.; Oliveira-Júnior, J. B.; ARAÚJO, M. A. S. *et al.* Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 969-978, 28 maio 2019.

MARINHO, M.; TÁPARO, C. V.; SILVA, B. G. *et al.* Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noroeste do estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 288-292, 17 maio 2010.

MARTÍNEZ-HERRERA, E.; DUARTE-ESCALANTE, E.; REYES-MONTES, M. R. *et al.* Molecular identification of yeasts from the order Trichosporonales causing superficial infections. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 3, p. 119-124, jul. 2021.

MARTINS, H.M.L.; BERNARDO, F.M.A; MARTINS, M.L.L. Leveduras em fezes de pombos da cidade de Lisboa - Portugal, 1994 / Yeasts in pigeon fecal droppings in Lisbon - Portugal, 1994. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 34, n. 5, p. 259-276, maio 1997.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; RIBEIRO, A. P. *et al.* Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 3, p. 119-124, jul. 2010.

MCCARTY, T.P.; WHITE, C.M.; PAPPAS, P.G. *et al.* Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics Of North America**, v. 35, n. 2, p. 389-413, jun. 2021.

MEDINA, I.R.; FUENTES, L.R.; ARTEAGA, M.B. *et al.* Pigeons and their droppings as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 4, p. 211-214, out. 2017.

MEHTA, V.; NAYYAR, C.; GULATI, N.; *et al.* A Comprehensive Review of *Trichosporon* spp.: an invasive and emerging fungus. **Cureus**, v. 13, n. 8, p. 145-173, 21 ago. 2021.

MENDOZA-REYES, D. F.; GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. *Candida lusitanae*: biology, pathogenicity, virulence factors, diagnosis, and treatment. **Infection And Drug Resistance**, v. 1515, p. 5121-5135, ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Criptococose**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-az/c/criptococose#:~:text=A%20criptococose%20%C3%A9%20uma%20doen%C3%A7a,C>. Acesso em: 13 jan. 2023.

MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L. *et al.* Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, Oxford, v.52, n.1, p.106-14, jan. 2014.

MOREIRA, L. M. ***Candida tropicalis*: Epidemiologia Molecular de isolados clínicos em Hospital Universitário de Minas Gerais**. 2019. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

MOUTINHO, F.F.B.; SERRA, C.M.B.; VALENTE, L.C.M. *et al.* Distribuição espaçotemporal das reclamações sobre pombos (*Columba livia domestica*) efetuadas ao centro de controle de zoonoses de niterói, rj (2009-2013). **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 11, n. 21, p. 49-61, 28 dez. 2015.

MUCCI, M.J.; CUESTAS, M.L.; LANDANBURU, M.F.; *et al.* Prevalence of *Candida albicans* *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 2, p. 72-76, abr. 2017.

NAICKER, S. D.; SHUPING, L.; ZULU, T. G. *et al.* Epidemiology and susceptibility of *Nakaseomyces* (formerly *Candida*) *glabrata* bloodstream isolates from hospitalised adults in South Africa. **Medical Mycology**, v. 61, n. 6, p. 57-82, jun. 2023.

NASCIMENTO, J. P.; COSTA, D. A.; LIMA, E. O. *et al.* Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato etanólico bruto e frações da *Sida santaremnensis* H. MONTEIRO

(MALVACEAE) sobre cepas de *Rhodotorula* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 118-125, 13 maio 2015.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics In Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, nov. 2012.

OLIVEIRA, N. C.; RAMPAZZO, R.C.P.; MINARI, M. C. *et al.* Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Cândida*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 27, n. 2, p. 125, 15 dez. 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M. *et al.* *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: geographic and temporal trends from the artemis disk antifungal surveillance program. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3551-3556, out. 2006.

PINTO, L. M. , NETO, F. A. B; MEDEIROS, M.A.P. *et al.* *Candida* species isolated from pigeon (*Columbia livia*) droppings may express virulence factors and resistance to azoles. **Veterinary Microbiology**, v. 235, p. 43-52, ago. 2019.

PIZANI, A.T.; SANTOS, M.O. Criptococose em pacientes hiv positivos: revisão sistemática da literatura. **Revista Saúde Unioledo**, v. 1, n. 1, p. 90106, mar. 2017.

POLLOCK, Christal. Fungal diseases of columbiformes and anseriformes. **Veterinary Clinics Of North America: Exotic Animal Practice**, v. 6, n. 2, p. 351-361, maio 2003.

REIS, E.J.C. **Leveduras patogênicas em fezes de aves de cativeiro: relação fenotípica e genotípica entre os isolados**. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

ROCHA, A. F.; PAULA; D. C. J; SOUZA; N. S. Variações microclimáticas de áreas urbanas em biomas no estado de Mato Grosso: Cuiabá E Sinop. **Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, Florianópolis, v. 1, n. 2, p. 246-257, dez. 2015.

RODRIGUES, D. K. B. **Distribuição das espécies de *Candida* em isolados de corrente sanguínea no estado de São Paulo: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica.** 2020. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2020.

ROMEO, Orazio; TIETZ, Hans-Jürgen; CRISEO, Giuseppe. *Candida africana*: is it a fungal pathogen? **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 192-197, 30 maio 2013.

ROSATI, D.; BRUNO, M.; VEERDONK, F.V. *et al.* Activation of cytokine responses by *Candida africana*. **Medical Mycology**, v. 60, n. 10, p. 80-97, out. 2022.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Veterinary World**, p. 1608-1614, 22 jun. 2021.

SARDI, J. C. O; PITANGUI, N. S.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G. *et al.* Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22-29, jan. 2014.

SARMENTO, K.K.F.; SOUZA, J.E.S.; BEZERRA, V.R. *et al.* Análise de agentes patogênicos em fezes de pombos da Cidade de Campina Grande – PB. **Research, Society And Development**, v. 10, n. 10, p. 1-10, 14 ago. 2021.

SHARIATI, A. MORADABADI, A.; CHEGINI, Z. *et al.* An Overview of the Management of the Most Important Invasive Fungal Infections in Patients with Blood Malignancies. **Infection And Drug Resistance**, v. 13, p. 2329-2354, jul. 2020.

SHAPIRO, Michael D.; DOMYAN, Eric T. Domestic pigeons. **Current Biology**, v. 23, n. 8, p. 302-303, abr. 2013.

SILVA, D. R.; SILVA, J. S. A.; FERREIRA, S. D. S. *et al.* Ocorrência de leveduras na cavidade oral e traqueia de aves de rapina. **Medicina Veterinária (Ufrpe)**, v. 13, n. 4, p. 485, 8 jul. 2019.

SILVA, J.O.; CAPUANO, D.M. Ocorrência de *Cryptococcus* spp. e de parasitas de interesse em saúde pública, nas excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.2, p.137-141, 2008.

SIMI, W. B.; LEITE-JUNIOR, D. P.; PAULA, C.R. *et al.* Yeasts and filamentous fungi in psittacidae and birds of prey droppings in midwest region of Brazil: a potential hazard to human health. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 79, n. 3, p. 414-422, set. 2019.

SIQUEIRA, N. P.; FAVALESSA, O. C.; MARUYAMA, F. H. *et al.* Domestic Birds as Source of *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII): potential risk for cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 1, p. 103-111, 11 nov. 2022.

SOLTANI, M.; BAYAT, M.; HASHEMI, S.J. *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other opportunistic fungi from pigeon droppings. **Journal of Research in Medical Sciences**. v. 18, n. 1, p. 56-60, Jan 2013.

SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. *Journal of General Microbiology*, London, v. 137, n. 1, p.161-167, 1 jan. 1991.

TAMURA, T.; ALSHAHNI, M. M.; MAKIMURA, K. Evaluation of CHROMagar™ *Candida* Plus chromogenic agar for the presumptive identification of *Candida auris*. **Microbiology And Immunology**, v. 66, n. 6, p. 292-298, 7 abr. 2022.

THEILL, L.; DUDIUK, C.; MORANO, S. *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 1, p. 43-49, jan. 2016.

TIETZ, H.-J.; HOPP, M.; SCHMALRECK, A.; STERRY, W.; CZAIIKA, V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? **Mycoses**, v. 44, n. 11-12, p. 437-445, dez. 2001.

TIETZ, H.J.; KÜSSNER, A.; THANOS, M. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2462-2465, set. 1995.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A.M.; HUNDEIKER, M. *et al.* Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 5, p. 381-394, 29 abr. 2013.

VISHNIAC, H.S. A Multivariate Analysis of Soil Yeasts Isolated from a Latitudinal Gradient. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 1, p. 90-103, 18 maio 2006.

WALLRAFF, H. G.; The Magnetic Map of Homing Pigeons: an evergreen phantom. **Journal Of Theoretical Biology**, v. 197, n. 2, p. 265-269, mar. 1999.

WILLINGER, B.; HILLOWOTH, C.; SELITSCH, B. *et al.* Performance of *Candida* ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of *Candida* Species, in Comparison to CHROMagar *Candida*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3793-3795, out. 2001.

7. ARTIGO

Candida africana in bird droppings in the Brazilian Legal Amazon

Abstract

For the first time, we have detected and identified a *Candida africana* isolate in the city of Sinop, located in the Brazilian Legal Amazon region. Identification was based on classic methods and sequencing of the ITS1 and ITS4 region. In addition, we used colorimetric methods to quantify biofilm formation by this microorganism, and we profiled its susceptibility to various antifungal drugs by the microdilution method. The *C. africana* isolate produced germ tubes; blastospores and pseudohyphae were detected on corn meal agar. Partial sequencing of the ITS1 and ITS4 region that the isolate and the reference sequence of *C. africana* (CBS8781) shared 100% identity. Biofilm formation by the *C. africana* isolate was significantly greater compared to *C. albicans*. As for minimum inhibitory concentration (MIC) of antifungal drugs against the isolate, we found values ≥ 0.063 $\mu\text{g/mL}$ for itraconazole and miconazole, ≥ 0.125 $\mu\text{g/mL}$ for tioconazole, ketoconazole, and clotrimazole, ≥ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ for amphotericin B and terbinafine, and ≥ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ for fluconazole. In conclusion, we verified *C. africana* circulation in the city of Sinop, state of Mato Grosso, in the Brazilian Legal Amazon region albeit only in an environmental sample.

Keywords: *Candida africana*, birds, urban environments, biofilm, antifungal susceptibility, molecular phylogenetics.

Introduction

Candida africana, an opportunistic yeast pathogen that causes various human infections including vulvovaginal candidiasis, oral thrush, and blood stream infections (Gharehbolagh et al. 2020), was first isolated from patients in Africa and Germany (Tietz et al. 2001).

Birds, including pigeons (*Columba livia*), have long been considered a major source of potentially pathogenic yeasts—birds carry the yeasts in their beaks, feet, and feathers, spreading them to the environment and humans mainly through aerosol present in dry droppings (Medina et al. 2017). In Brazil, the domestic pigeon population has increased dramatically and become an environmental problem that can potentially impact public health (Costa et al. 2010). Moreover, several yeast species such as *Candida albicans*, *Nakaseomyces glabrata*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Diutina catenulata*, *Diutina rugosa*, and *Clavispora lusitaniae*

have been detected on the excreta of captive birds (Glushakova et al. 2021; Medina et al. 2017; Pinto et al. 2019), and some of them have acquired multidrug resistance (Pinto et al. 2019; Rhimi et al. 2021; Talazadeha et al. 2022). *C. africana* isolates have been reported to display resistance to flucytosine, voriconazole, and terbinafine (Gharehbolagh et al. 2020). Factors such as adhesion and biofilm formation contribute to the emergence of reservoirs for pathogenic agents, facilitating infection (Cavalheiro and Teixeira 2018).

Candidosis, a zoonotic disease, is caused by pathogens originating from different sources and which may be transferred to other host species (Mugale et al. 2015). Although domestic and wild birds probably act as carriers of human pathogenic fungi, there are no data about the isolation of *C. africana* in bird excreta in Brazil. In this study, we report detection of *C. africana* in bird excreta in the municipality of Sinop, state of Mato Grosso, Brazil; we also assess biofilm formation by this microorganism and profile its antifungal susceptibility.

MATERIAL AND METHODS

Study area

Sinop, state of Mato Grosso, Brazil, is a city located in the Brazilian Legal Amazon region and was founded in 1974. It has approximately 196,067 inhabitants in an area of 3,942,229 km². The climate is warm, and the average annual temperature is 28 °C. The rain regime is equatorial, characterized by a dry period in winter and a rainy period in summer, mainly between January and March. Dry fecal samples were collected from birds outside the building of a basic health unit in the Vitoria Regia neighborhood (latitude: -11.83990, longitude: -55.52541) in Sinop in May 2022 and were kept in individual sterile containers for laboratory processing.

Sample collection, processing, and phenotypic identification

The dry fecal samples were individually macerated in sterile 0.85% sodium chloride solution and vigorously homogenized for 10 min. After 30 min, 100 µL of each supernatant was spread over the surface of modified Sabouraud Dextrose agar (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) plus chloramphenicol (40 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, USA) and incubated in B.O.D. chamber (Solab, SL200/300) at 25 °C for 7–20 days. The samples were observed daily. *Candida* spp. isolates were identified by standard methods, which included identification based on the germ tube test, chlamydoconidia production on cornmeal agar (HiMedia Laboratories), CHROMagar *Candida* screening test (CHROMagar *Candida*,

HiMedia Laboratories), and carbon assimilation test (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, USA) (Kurtzman and Fell 1998).

Determination of Biofilm Formation

Biofilm formation assays were performed according to Melo et al. (2011). First, 100- μ L aliquots of a standardized cell suspension (10^7 cells/mL) were transferred to flat-bottom 96-well microtiter plates and incubated in a shaker (Tecnal/TE-053) at 75 rpm and 37 °C for 1.5 h. As controls, six wells of each microtiter plate were handled in an identical fashion, except that no *C. africana* cell suspensions were added. Following the adhesion phase, the cell suspensions were aspirated, and each well was washed twice with 150 μ L of phosphate-buffered saline (PBS), to remove loosely adhered cells. A total of 100 μ L of Yeast Nitrogen Base medium (Difco TM) containing 50 mM glucose (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) was added to each of the washed wells, which were then incubated in a shaker at 75 rpm and 37 °C. Biofilms were allowed to develop for 24, 48, 72, or 96 h and quantified by the crystal violet (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and colorimetric MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, USA) assays (Hawser and Douglas 1994; Glushakova et al. 2021). All the data were obtained from three experiments, performed in sextuplicate. *C. albicans* (ATCC 90028) was used as quality control strain.

Antifungal susceptibility testing

The *in vitro* susceptibility of *C. africana* to 0.008–64 μ g/mL amphotericin B, itraconazole, tioconazole, terbinafine, miconazole, fluconazole, clotrimazole, or ketoconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, USA) was profiled according to CLSI M27-A3 and M27-S4 and the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. The yeast inoculum suspensions were prepared at concentrations ranging from 0.5 to 2.5×10^3 CFU/mL. To estimate the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antifungals, the microtiter plates were incubated at 35 °C and observed at 48 h. After incubation, MIC endpoints were visually determined by comparing the turbidity of the yeast suspensions with the turbidity of the drug-free growth control well. Next, the yeast suspensions were stained by adding 30 μ L of a freshly prepared 0.01 g/100 mL resazurin (Sigma–Aldrich) solution and re-incubated at 37 °C for 24 h (Garaicoa et al. 2018). MIC90 was interpreted as the lowest drug concentration that was visually able to inhibit fungal growth (i.e., to induce 90% fungal inhibition in the case of amphotericin B) compared to the drug-free control growth. *C. albicans* (ATCC 90028) was used as quality control strain.

DNA sequencing

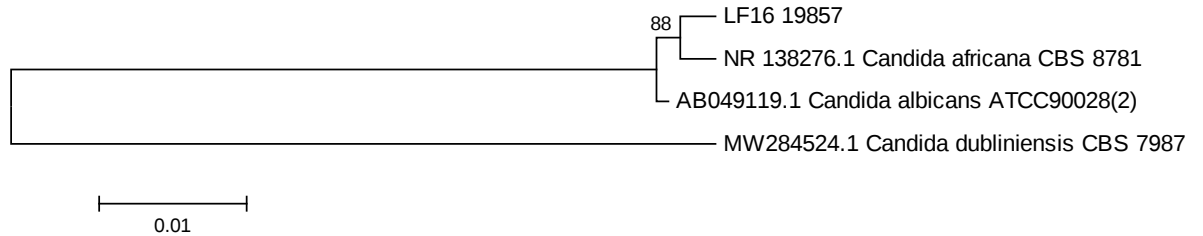
The universal primers ITS1 (5′ -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) and ITS4 (5′ -TCCTCC GCTTATTGATATGC-3′) were used to amplify the ITS1- 5.8S-ITS2 region, according to Pinto et al. (2022). DNA was extracted by using the Gentra® Puregene® Yeast and G+ Bacteria kit (Qiagen®, Maryland, USA) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, a final volume of 50 µL containing 100 ng of DNA and each primer (Invitrogen™ Brazil) at 10 pmol/µL was employed; the annealing temperature was 58 °C. Automated sequencing was conducted by using the sequencing platform at Fundação Oswaldo Cruz - PDTIS/FIOCRUZ, Brazil. The sequences were edited by using the CodonCodeAligner 9.0.2 software and compared by employing the basic local alignment search tool, with sequences available from NCBI/GenBank. Phylogenetic analysis was performed by using the MEGA X software.

Results and Discussion

Partial sequencing of the ITS1 and ITS4 region identified the microorganism at the species level. The isolate shared 100% identity with the reference sequence of *C. africana* (CBS8781) KU729068.1 deposited at NCBI/GenBank (Fig. 1). The *C. africana* isolate produced germ tubes upon incubation in horse serum at 37 °C for 2 h, but it failed to produce chlamydospores even after prolonged incubation. Phenotypic analyses showed that the isolate assimilated dextrose, galactose, xylose, maltose, sucrose, fructose, and inulin, but not trehalose, lactose, L-arabinose, rhamnose, raffinose, inositol, or dulcitol. In CHROMagar Candida medium, the isolate presented slightly green colonies. When the isolate was cultured on corn meal agar, blastospores and pseudohyphae were detected. To the best of our knowledge, this is the first report of an autochthonous Brazilian *C. africana* isolate, identified by polyphasic taxonomy. Phenotypically, the *C. africana* isolate showed characteristics that corroborate with previous reports by Tietz et al. (2001) and the *C. africana* reference strain ATCC MYA 2669 (Klesiewicz et al. 2023; Yazdanpanah and Khaithir 2014).

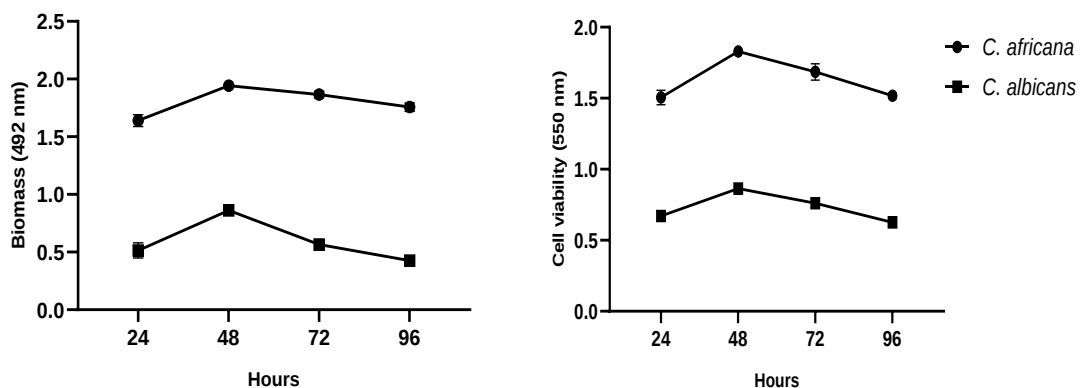
Fig 1. Phylogenetic relationship between the *C. africana* isolate and *Candida* species reference strains inferred from *ITS* sequences by the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The optimal tree is shown. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein 1985). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The evolutionary distances were computed by using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al. 2004) and are in the units of the number of base

substitutions per site. This analysis involved four nucleotide sequences. The final dataset contained 420 positions. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Tamura et al. 2007).



Biofilm assessment from 24 h to 96 h showed that biofilm formation after incubation for 48 h was significantly greater in *C. africana* compared to *C. albicans*, demonstrating that *C. africana* is a strong biofilm former (Fig. 2). Biofilm formation is a major factor underlying *Candida* virulence (Kosmala et al. 2023). Romeo et al. (2011) demonstrated that *C. africana* cannot form biofilms on polyvinyl chloride strips. We performed biofilm formation tests on polystyrene plates and observed significantly increased biofilm formation along time for the *C. africana* isolate compared to *C. albicans*. *C. africana* isolates have been shown to form biofilms in certain conditions, and biofilm formation has been described to vary substantially within the *C. africana* population (Kosmala et al. 2023).

Fig 2. Assessment of *C. africana* and *C. albicans* biofilm formation in Yeast Nitrogen Base medium containing 50 mM glucose after incubation for 24, 48, 72, and 96 h. Biofilm was quantified by the crystal violet and MTT assays.



On the basis of MIC conducted according to CLSI M27-A3 and M27-S4 and the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing protocol, the *C. africana* isolate was susceptible to amphotericin B, itraconazole, tioconazole, terbinafine, miconazole,

fluconazole, clotrimazole, and ketoconazole (MIC $\geq$ 0.063 μ g/mL for itraconazole and miconazole; MIC $\geq$ 0.125 μ g/mL for tioconazole, ketoconazole, and clotrimazole; MIC $\geq$ 1.0 μ g/mL for amphotericin B and terbinafine; and MIC $\geq$ 2.0 μ g/mL for fluconazole). Our results showed that the *C. africana* isolate is susceptible to amphotericin B, itraconazole, tioconazole, terbinafine, miconazole, fluconazole, clotrimazole, and ketoconazole. Because no clinical breakpoints or epidemiological cut-off values (ECVs) have been specified for antifungal drugs against *C. africana*, interpreting whether the isolate is susceptible/resistant or wild-type/non-wild-type on the basis of MIC is potentially controversial. In the literature, *C. africana* isolates have been classified as resistant to itraconazole, 5-flucytosine, terbinafine, fluconazole, and clotrimazole (Farahyar et al. 2020; Gharehbolagh et al. 2020).

In further studies, MIC data must be generated for a sufficient number of *C. africana* isolates, so that robust species-specific ECVs and clinical breakpoints can be established for this species (Borman et al. 2013).

Conclusion

After the identification studies, we confirmed *C. africana* circulation in the city of Sinop, state of Mato Grosso, in the Brazilian Legal Amazon region albeit only in an environmental sample.

References

1. Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM (2013) Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 51: 967–972. doi: 10.1128/JCM.02816-12
2. Cavaleiro M, Teixeira MC (2018) *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies: threats, challenges, and promising strategies. **Front Med** 5:1-15. doi: 10.3389/fmed.2018.00028
3. Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ, Rocha MF (2010) Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathology* 169:207–213. doi: 10.1007/s11046-009-9245-1
4. Farahyar S, Izadi S, Razmjou E, Falahati M, Roudbary M, Ashrafi-Khozani M, Ansari S, Fattahi A, Ghahri-Mobaser Z, Rahimi M (2020) Low prevalence of antifungal resistant

Candida africana, in the *C. albicans* complex causing vulvovaginal candidiasis. Heliyon 6:e03619. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03619

5. Felsenstein J 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

6. Garaicoa JL, Fischer CL, Bates AM, Holloway J, Avila-Ortiz G, Guthmiller JM, Johnson GK, Stanford C, Brogden KA (2018) Promise of combining antifungal agents in denture adhesives to fight *Candida* species infections. J Prosthodont 27: 755–762. doi: 10.1111/jopr.12565

7. Gharehbolagh SA, Fallah B, Izadi A, Ardestani ZS, Malekifar P, Borman AM, Mahmoudi S (2020) Distribution, antifungal susceptibility pattern and intra-*Candida albicans* species complex prevalence of *Candida africana*: A systematic review and meta-analysis. PLoS One 15: e0237046. doi: 10.1371/journal.pone.0237046

8. Glushakova AM, Rodionova EM, Kachalkin AV (2021) Yeasts in feces of pigeons (*Columba livia*) in the City of Moscow. Cur Microb 78:238–243. doi: 10.1007/s00284-020-02251-5

9. Hawser SP, Douglas LJ (1994) Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun 62: 915–921. doi: 10.1128/iai.62.3.915-921.1994

10. Klesiewicz K, Mrowiec P, Kania K, Skiba-Kurek I, Białecka J, Namys M, Małek M (2023) Prevalence of closely related *Candida albicans* species among patients with vulvovaginal candidiasis in Southern Poland based on the hwp1 gene amplification. Pol J Microbiol 72: 69–77. doi: 10.33073/pjm-2023-011

11. Kosmala D, Sertour N, Martins RF, Spaggiari L, Ardizzoni A, LeibundGut-Landmann S, Pericolini E, Bougnoux ME, d'Enfert C, Legrand M (2023) The pathogenic and colonization potential of *Candida africana*. Microbes Infect 20:105230. doi: 10.1016/j.micinf.2023

12. Kurtzman CP, Fell JW (1998) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 3-5.

13. Medina IR, Fuentes LR, Arteaga MB, Valcárcel FR, Arbelo FA, del Castillo DP, Suárez SD, Quintana OF, Gutiérrez BV, Sergeant FS, Acosta-Hernández B (2017) Pigeons and their droppings as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. Rev Iberoam Micol 34:211–214. doi: /10.1016/j.riam.2017.03.001

14. Melo AS, Bizerra FC, Freymuller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL (2011) Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp.

isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 49:253–262. doi: 10.3109/13693786.2010.530032

15. Mugale M, Bhat AA, Gavhane DS, Bhat SA (2015). Outbreaks of thrush in pigeons in Punjab State of India. *Comp Clin Path* 24:635–638. doi: 10.1007/s00580-014-1958-y

16. Pinto LM, Bezerra Neto FA, Medeiros MAP, Alves DLZ, Chaves GM (2019) *Candida* species isolated from pigeon (*Columbia livia*) droppings may express virulence factors and resistance to azoles *Vet Microb* 235:43–52. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.05.022

17. Pinto TN, Kohn A, da Costa GL, Oliveira LMA, Pinto TCA, Oliveira MME (2022) *Candida guilliermondii* as an agent of postpartum subacute mastitis in Rio de Janeiro, Brazil: Case report. *Front Microbiol* 13:964685. doi: 10.3389/fmicb.2022.964685

18. Rhimi W, Aneke CI, Annoscia G, Camarda A, Mosca A, Cantacessi C, Otranto D, Cafarchia C (2021) Virulence and in vitro antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida catenulata* from laying hens. *Int Microbiol* 24: 57–63. doi: 10.1007/s10123-020-00141-1

19. Romeo O, De Leo F, Criseo G (2011) Adherence ability of *Candida africana*: a comparative study with *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 54:e57–e61. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01833.x

20. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

21. Talazadeha F, Ghorbanpoorb M, Shahriyari A (2022) Candidiasis in birds (*Galliformes*, *Anseriformes*, *Psittaciformes*, *Passeriformes*, and *Columbiformes*): a focus on antifungal susceptibility pattern of *Candida albicans* and Non-*albicans* isolates in avian clinical specimens. *Top Companion Anim Med* 46:100598. doi: 10.1016/j.tcam.2021.100598

22. Tamura K, Dudley J, Nei M (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. doi: 10.1093/molbev/msm092

23. Tamura K, Nei M, Kumar S 2004 Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11030–5. doi: 10.1073/pnas.0404206101

24. Tietz H J, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V (2001) *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? *Mycoses* 44:437–445. doi: 10.1046/j.1439-0507.2001.00707.x

25. Yazdanpanah A, Khaithir TMN (2014) Issues in identifying germ tube positive yeasts by conventional methods. J Clin Lab Anal 28:1-9. doi: 10.1002/jcla.21635

ANEXO 1

Tabela 1 – Espécies de leveduras identificadas por métodos presuntivos em meio CHROMagar® *Candida* e sequenciamento.

AMOSTRA (n)	LOCAL	ID	IDENTIFICAÇÃO	
			<i>Chromoagar Candida</i>	Sequenciamento
2	Praça 1	1	Azul	<i>C. tropicalis</i>
		2	Azul	-
		3	Azul	-
		4	Azul	-
		5	Azul	-
		6	Rosa	<i>C. lusitaniae</i>
2	Ginásio	7	Azul	<i>C. tropicalis</i>
		8	Azul	-
		9	Azul	-
		10	Azul	-
1	Praça 2	11	Rosa	-
		12	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
		13	Rosa	-
		14	Rosa	<i>N. glabrata</i>
		15	Azul	-
2	Praça 3	16	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
		17	Azul	-
		18	Rosa	<i>P. kudriavzevii</i>
		19	Rosa	<i>A. loubieri</i>
		20	Azul	<i>C. tropicalis</i>
6	Supermercado	21	Azul	-
		22	Azul	-
		23	Azul	-
		24	Rosa	-
		25	Azul	-
		26	Azul	-
		27	Azul	-

		28	Azul	<i>C.tropicalis</i>
		29	Laranja	-
		30	Azul	-
		31	Azul	-
		32	Azul	-
		33	Laranja	<i>Rhodotorula spp.</i>
		34	Azul	<i>T. asahii</i>
		35	Azul	<i>T. asahii</i>
		36	Azul	-
		37	Azul	-
		38	Azul	-
		39	Azul	-
		40	Azul	-
		41	Azul	-
		42	Azul	-
		43	Azul	<i>D. rugosa</i>
		44	Azul	<i>D. rugosa</i>
6	UBS 1	45	Azul	<i>C. africana</i>
		46	Azul	-
		47	Azul	-
		48	Azul	-
		49	Azul	-
		50	Azul	-
		51	Azul	-
		52	Azul	-
		53	Azul	-
		54	Azul	-
		55	Azul	-
		56	Azul	-
		57	Rosa	-
		58	Azul	-
		59	Rosa	<i>N. glabrata</i>

		60	Azul	<i>T. asahii</i>
		61	Azul	-
		62	Azul	-
		63	Rosa	-
1	UBS 2	64	Branco	-
		65	Branco	-
		66	Laranja	<i>Rhodotorula spp.</i>
		67	Azul	-
2	Praça 4	68	Rosa	-
		69	Laranja	-
		70	Rosa	-
		71	Laranja	-
		72	Laranja	-
		73	Azul	-
		74	Azul	-
4	UBS 3	75	Azul	-
		76	Azul	-
		77	Azul	-
		78	Azul	-
		79	Azul	-
		80	Azul	-
		81	Azul	-
		82	Azul	-
		83	Laranja	-
		84	Rosa	-
		85	Rosa	-
		86	Azul	-