

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* EM GALINHAS (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*)

Eduardo do Nascimento MÓS*
Elisabeth GONZALES**
Osmane HIPÓLITO***

RFMV-A/17

INTRODUÇÃO

Mós, E. N. et al. — *Isolamento e identificação de leveduras do gênero Candida em galinhas (Gallus gallus domesticus)*. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 10: 167-72, 1973.

RESUMO — *Relatou-se o isolamento de 54 amostras de leveduras do gênero Candida do trato digestivo de 174 aves (Gallus gallus domesticus) sendo 54 adultas e 120 pintos. O isolamento, conseguido apenas dos materiais provenientes das aves adultas, foi feito através sementeadura no Meio Pagano-Levine e a tipificação das amostras obedeceu às indicações adotadas por LODDER e BUCKLEY & UDEN.*

a. *pesquisa da atividade fermentativa sobre a glicose, maltose, lactose, galactose e sacarose;*

b. *pesquisa da formação do tubo germinativo em soro bovino; e*

c. *formação de clamidósporos no meio de "Corn Meal com Tween 80", através cultura em lâmina.*

De acordo com essas provas, 41 (75,9%) das 54 amostras isoladas comportaram-se como Candida albicans.

UNITERMOS — *Leveduras*; Trato digestivo*; Galinhas*; Candidiase aviária*; Candida.*

A candidiase aviária é geralmente uma micose do trato digestivo que, segundo alguns autores: HOFSTAD et al.³ (1972), REIS⁶ (1961), não apresenta nenhuma significância, na maioria das vezes, para ser considerada seriamente. A forma clínica mais comum dessa levedurose é o conhecido "sapinho". A mucosa atacada apresenta pseudo-membranas branco-acinzentadas ou amareladas, aderentes ou não, de tamanho variável. A infecção foi assinalada em perus, galinhas, pombos, gansos e papagaios, REIS & NÓBREGA⁷ (1957).

Conforme cita LACAZ¹ (1967), diversos são os fatores predisponentes que favorecem a implantação secundária de leveduras, entre os quais as hipo-avitaminoses A e B, fatores estes que poderiam ser de importância no estudo da moléstia em aves, uma vez que, não raro, o aparecimento da infecção decorre em consequência do estado de debilidade geral da ave; REIS, J.⁶ (1961).

Baseados no fato de que estas leveduras são oportunistas, tentamos estabelecer a presença das mesmas, mais particularmente da *Candida albicans*, no trato digestivo de aves normais. Nossa preocupação visou a identificação dessa levedura, já que a mesma é responsabilizada pela maioria dos

* Professor Assistente Doutor. Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

** Estudante da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

*** Professor Titular.

Departamento de Patologia e Clínica Médicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

casos de levedurosos do gênero, seja no homem, seja nos animais e, entre esses, mais particularmente nas aves.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Aves

Utilizamos um total de 174 aves recebidas no laboratório de diagnóstico da disciplina de Ornitopatologia, Departamento de Patologia e Clínica Médicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

As 174 aves do experimento estavam compreendidas em três lotes distribuídos da seguinte maneira:

1.1.1. Aves adultas: 54

1.1.2. Pintos de um dia após ingestão de ração: 30

1.1.3. Pintos de um dia sem nunca terem ingerido ração: 90.

1.2. Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

1.2.1. Meio de Pagano-Levine — Meio já preparado pela BBL em tubos de: 15 x 125 mm.

1.2.2. Agar Sabouraud dextrose (Difco).

1.2.3. Meio para o teste de fermentação.

Água de peptona em volume de 10 ml, em tubos de 10 x 100 mm contendo tubos de Durhan, pH 7,2, adicionada de 0,5 ml de solução a 20% dos seguintes açúcares: Glicose, Maltose, Lactose, Galactose e Sacarose.

1.2.4. Soro bovino: Indicado para verificar a formação de tubos germinativos. Tubos de 10 x 75 mm contendo de 0,2 a 0,3 ml de soro bovino.

1.2.5. Uréia. Uréia Agar-Base (Difco) em tubos de 10 x 100 mm, inclinado.

2. Métodos

Vários métodos têm sido descritos para o isolamento e classificação de leveduras. Para o isolamento adotamos o meio de Pagano-Levine e, para a classificação, os métodos recomendados por LODDER⁵.

2.1. Isolamento

O isolamento das amostras foi feito conforme as recomendações que seguem o meio de Pagano-Levine: abertura do aparelho digestivo e exame do esôfago, ingluvío, proventrículo e intestino a fim de verificar a existência de possíveis lesões micóticas. Uma vez não tendo ocorrido nenhum caso com lesões, recorreremos sempre ao isolamento das leveduras a partir do ingluvío, através lavagem com posterior raspagem vigorosa da mucosa, como também tentativa de isolamento a partir do lavado com conteúdo do ingluvío. Em seguida o material era semeado sobre a superfície do meio em tubo, com zaragatoa ou com alça de platina, no caso de se utilizar o lavado. A incubação era de 2 a 3 dias em temperatura ambiente, após a qual, o crescimento era comparado conforme o esquema abaixo adotado para o meio de Pagano-Levine:

- a) crescimento branco-cremoso ou vermelho (cravo) desbotado *C. albicans*
- b) crescimento de coloração vermelho intenso *C. tropicalis*

Através esfregaços corados pelo método de Gram confirmava-se a morfologia e re-
picava-se o material em Agar Sabouraud Dextrose.

2.2. Tubo germinativo

A fim de verificar formação de tubo germinativo para *C. albicans* a colônia era transferida com o auxílio de pipetas Pasteur e semeada em tubo que contivesse o meio de soro bovino. As pipetas foram mantidas imersas no soro por 2-3 horas a 37°C e usadas para transferir uma gota da sus-

pensão para uma lâmina. Os campos microscópicos foram examinados com pequeno aumento, para verificação de agrupamentos de células. Entre estes agrupamentos encontram-se as células com tubos germinativos.

2.3. Produção de pseudomicélio e clamidósporos

O meio de "Corn Meal Agar" (Difco) com "Tween 80" (C. Erba) a 1% é adequado para a produção de pseudomicélio e clamidósporos. A técnica adotada foi a de cultivo em lâmina, colocando-se sobre lâminas estéreis em placas de Petri, aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura fundido; após solidificação do meio era feita a semeadura em talhes ou cortes paralelos, distantes alguns milímetros e sobre estes era colocada uma lamínula estéril. Depois de 2 a 10 dias de incubação, a 25°C as culturas foram examinadas com pequeno aumento, através placa não aberta e com aumento maior, através da lamínula. A maioria das "candidas" comuns produzem pseudo-hifas. A formação de clamidósporos ocorre simultaneamente e é característica da *C. albicans* e de *C. stellatoidea*.

2.4. Provas de fermentação

Os meios semeados eram contidos em tubos vedados com tampas e mantidos durante 10 dias à temperatura de 25°C. As provas positivas eram indicadas pela presença de gás. Foram usados os seguintes carboidratos: galactose, glicose, lactose, maltose e sacarose.

2.5. Prova da urease

Essa prova é usada com o objetivo de diferenciar espécies do gênero *Candida*, de espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporum*. O material é semeado em tubos inclinados os quais são observados até 5 dias.

R E S U L T A D O S

Foram isoladas 54 amostras de leveduras de 54 aves adultas. Submetidas à prova da urease, nenhuma apresentou resultado positivo.

Pelo exame da Tabela I, verifica-se que das 54 amostras isoladas, 41 apresentaram comportamento idêntico ao de *C. albicans*, quando submetidas às provas de fermentação de carboidratos, formação de tubo germinativo, pseudo-micélio e clamidósporo.

D I S C U S S Ã O

É interessante ressaltar que conseguimos isolar leveduras de 100% das aves adultas e de nenhum dos pintos examinados. Esse fato talvez nos permitiria suspeitar que estas leveduras saprófitas somente contaminariam os pintos após os primeiros dias de vida e não na incubadora ou no organismo das aves das quais os pintos se originaram.

A prova de urease possibilita o diagnóstico rápido de laboratório, uma vez que todas as espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* assim como certas espécies dos gêneros *Candida* e *Trichosporum* são urease-positivas.

Segundo BUCKLEY & VAN UDEN² (1963) pode-se obter uma identificação rápida de *C. albicans* por inoculação em soro bovino e incubação a 37°C. Em poucas horas forma-se um curto tubo germinativo. Recomenda-se, também, como prova laboratorial de diagnóstico, a pesquisa de formação de micélio e clamidósporo em culturas no "Meio de Corn Meal" ou "Agar Infuso de Arroz" adicionados de "Tween 80".

Conforme AHEARN¹ (1970), o método de pesquisa do tubo germinativo possibilita a identificação de 95% de espécimes humanos com exames clínicos positivos para *C. albicans*. A *C. stellatoidea*, se bem que raramente, também produz tubo germinativo e, por isso mesmo, é considerada com uma variante alfa-glucosidase negativa de *C. albicans*.

TABELA I

Resultados das provas bioquímicas e culturais realizadas em 54 amostras do gênero *Candida* isoladas de aves.

N.º da amostra	Gal.	Glic.	Lact.	Malt.	Sac.	T. g.	P. m.	Clam.
01	+	+	-	+	-	+	+	+
02	+	+	-	+	-	+	+	+
03	+	+	-	+	-	+	+	+
04	+	+	-	+	-	-	+	-
05	+	+	-	-	+	-	+	-
06	+	+	-	+	-	+	+	+
07	+	+	-	+	-	+	+	+
08	+	+	-	+	-	+	+	+
09	+	+	-	+	-	+	+	+
10	+	+	-	+	-	+	+	-
11	+	+	-	-	-	-	-	+
12	+	+	-	+	-	-	+	+
13	-	+	-	+	-	-	+	-
14	-	+	-	-	+	+	+	+
15	+	+	-	+	-	+	+	+
16	+	+	-	+	-	+	+	+
17	+	+	-	+	-	+	+	+
18	+	+	-	+	-	+	+	+
19	+	+	-	+	-	+	+	+
20	+	+	-	+	-	+	+	+
21	+	+	-	+	-	+	+	+
22	+	+	-	+	-	+	+	+
23	+	+	-	+	-	+	+	+
24	+	+	-	+	-	+	+	+
25	+	+	-	+	-	+	+	+
26	+	+	-	+	-	+	+	+
27	+	+	-	+	-	+	+	+
28	+	+	-	+	-	+	+	+
29	-	+	-	+	-	+	+	+
30	+	+	-	+	-	+	+	-
31	-	+	-	+	-	-	+	-
32	-	+	-	+	-	-	+	+
33	-	+	-	+	+	+	+	+
34	+	+	-	+	-	+	+	+
35	+	+	-	+	-	+	+	+
36	+	+	-	+	-	+	+	-
37	+	+	-	+	-	+	+	+
38	+	+	-	+	-	+	+	+
39	+	+	-	+	-	+	+	+
40	+	+	-	+	-	+	+	+
41	+	+	-	+	-	+	+	+
42	+	+	-	+	-	+	+	+
43	+	+	-	+	-	+	+	+
44	+	+	-	+	-	+	+	+
45	-	+	-	-	-	-	-	-
46	+	+	-	+	-	+	+	+
47	+	+	-	+	-	+	+	+
48	-	+	-	-	-	-	-	-
49	-	+	-	-	-	-	-	-
50	+	+	-	+	-	+	+	+
51	+	+	-	+	-	+	+	+
52	+	+	-	+	-	+	+	+
53	+	+	-	+	-	+	+	+
64	+	+	-	+	-	+	+	+

Legendas

Gal.	=	Galactose	Sac.	=	Sacarose
Glic.	=	Glicose	T.G.	=	Tubo Germinativo
Lac.	=	Lactose	P.M.	=	Pseudomicélio
Malt.	=	Maltose	Clam.	=	Clamidósporo

Muito embora as provas de assimilação sejam de maior valor, a fermentação rápida e forte dos açúcares é muito importante no diagnóstico de leveduras do gênero *Candida*.

De acordo com os resultados obtidos nos exames já mencionados anteriormente, 41 (75,9%) das 54 amostras isoladas podem ser classificadas como *Candida albicans*.

A G R A D E C I M E N T O S

Esse trabalho foi realizado com ajuda parcial do Fundo "Squibb" de Incentivo à Ciência.

rr.e5

RFMV-A 17

Mós, E. N. et al. — *Isolation and identification of yeasts of the genus Candida from chickens (Gallus gallus domesticus)*. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 10:167-72, 1973.

SUMMARY — *The isolation of 54 strains of yeasts of the genus Candida from the digestive tract of 174 chickens, 54 adults and 120 chicks was reported. The isolation, obtained only from adult birds, was made through the inoculation of the material in the typing of the strains followed the indications made after LODDER and BUCKLEY & UDEN.*

a) *fermentative activity in glucose, maltose, lactose, galactose and saccharose;*

b) *formation of germ tube in bovine serum medium;*

c) *production of chlamidospore in "Corn Meal with Tween RJ" in slide culture.*

According to the results of these tests, 41 (75,9 per cent) of the 54 isolated strains were identified as *Candida albicans*.

UNITERMS — *Yeasts*; Digestive tract*; Chickens*; Avian candidiasis*; Candida.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHEARN, D. G. — *Sistematics of yeasts of medical interest*. International symposium on mycosis. Washington, Pan American Health Organization, 1970. p. 64-70.
2. BUCKLEY, H. R. & VAN UDEN, N. — *The identification of C. albicans within two hours the use of an egg white slide preparation*. *Sabouraudia*, 4:5205-208, 1963.
3. HOFSTAD, S. M. et al. — *Diseases of poultry*. 6th ed. Iowa, Ames Iowa State University Press, 1972. p. 459.
4. LACAZ, C. S. — *Compêndio de micologia médica*. São Paulo, Editora da USP, 1967. p. 92-116.
5. LODDER, J. — *The yeasts. A taxonomic study*. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1971. p. 917-19.
6. REIS, J. — *Doenças das aves*. São Paulo, Melhoramentos, 1961.
7. REIS, J. & NOBREGA, P. — *Tratado de doenças das aves*. 2.ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 1957. v. 2, p. 379.

Recebido para publicação em 29-6-73

Aprovado para publicação em 6-7-73