

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Pesquisa de fungos com potencial patogênico em
ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação
da desinfecção hospitalar**

Antonella Souza Mattei

ANTONELLA SOUZA MATTEI

Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M435p Mattei, Antonella Souza

Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar / Antonella Souza Mattei ; orientador Mário Carlos Araújo Meireles. - Pelotas, 2010.-83f. ; il..-
Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária.
Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. Antissépticos 2.Desinfetantes 3.Leveduras 4.Aspergillus spp.
5.Ambiente hospitalar 6.Instrumentos de tosa I Meireles, Mário Carlos Araújo
(orientador) II .Título.

CDD 636.08

Banca Examinadora:

- Prof^ª. Dr^a Melissa Orzechowski Xavier - FURG
- Prof^ª. Dr^a Marlete Brum Cleff - UFPel
- Prof^ª. Dr^a Márcia de Oliveira Nobre - UFPel
- Prof^ª. Dr^a Patrícia da Silva Nascente - UFPel (Suplente)
- Prof. Dr Mário Carlos Araújo Meireles - UFPel (Orientador)

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, conquistas, por ter uma família unida e querida e amigos inigualáveis.

Aos meus pais Alice e José, por tantos anos de dedicação, amor, paciência, companheirismo, amizade e cuidados que os devo agradecer para sempre. As minhas irmãs, Caroline e Liara, que sempre estiveram ao lado me dando força. Ao meu lindo cachorro Floppy, que me deu muito carinho nas horas que não cabiam palavras. Muito obrigada, amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Mário Carlos Araújo Meireles pelo conhecimento, apoio e amizade dispensados a mim.

A incansável Profa. Isabel pela amizade, carinho, apoio e horas dedicadas no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Luiz Filipe Schuch pelo carinho e ensinamentos na área de estatística.

Ao Prof. Luiz Paiva Carapeto e ao Hospital Veterinário da UFPel pela oportunidade de desenvolver esta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Micologia pela paciência, ensinamentos, amizade e companheirismo dispensados a todos esses anos que compartilhamos juntos.

As amigas Ana Paula Albano, Rosema Santin, Roberta Sampaio, Francine Dias e Juliana Plá pela ajuda, amizade e carinho nas horas mais inoportunas que poderiam haver.

As clínicas veterinárias e pet shops da cidade de Pelotas pela oportunidade de realizar esse estudo.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita da Santa Casa – Complexo Hospitalar de Porto Alegre, em especial a Profa. Melissa Xavier e o Prof. Luiz Carlos Severo pelo auxílio na identificação das leveduras.

A CAPES pela bolsa de estudos e, aos demais órgãos financiadores, CNPq e FAPERGS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, a todos professores, alunos e servidores da Faculdade de Veterinária.

Resumo

MATTEI, Antonella Souza. **Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar.** 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente estudo teve como objetivo isolar fungos filamentosos e leveduriformes de clínicas e consultórios veterinários, pet shops e hospital veterinário da cidade de Pelotas/RS, bem como avaliar a eficácia *in vitro* dos desinfetantes/antissépticos utilizados na limpeza dos locais estudados. Foram realizadas coletas de superfície do hospital veterinário antes e após a desinfecção da sala do consultório, sala cirúrgica, internação e UTI, através de placas de contato contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, incubadas a 32°C por cinco dias, para obtenção de unidades formadoras de colônias (UFC). Posteriormente, foi realizado o teste de suscetibilidade *in vitro* dos isolados fúngicos frente ao hipoclorito de sódio, cloreto de benzalcônio, clorexidina-cetrimida e derivado cloro-fenol. Em pet shops, consultórios e clínicas veterinárias também foram coletadas amostras de rascadeiras e lâminas da máquina de tosa através de *swabs* estéreis e impressão em placas contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e azeite de oliva e ágar Mycosel®, incubadas a 25° e 32°C, por até 15 dias. No ambiente hospitalar, a contagem das UFC/cm² filamentosas e leveduriformes foi maior na sala de internação antes da desinfecção, enquanto que, a sala cirúrgica foi a menos contaminada. A análise das superfícies demonstrou que a baia era a mais contaminada antes da desinfecção, enquanto que a calha apresentava menor contaminação. O crescimento de fungos filamentosos ocorreu em 88,9%(192/216) das amostras antes da desinfecção, identificado *Aspergillus* spp em 29,2%(56/192). Já o crescimento de fungos

leveduriformes ocorreu em 11,1%(24/216) das amostras, com os gêneros *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*. Após a desinfecção houve crescimento de fungos filamentosos em 73,3%(143/195) das amostras, sendo identificado o gênero *Aspergillus* em 28,7%(41/143). O crescimento de fungos leveduriformes ocorreu em 26,2%(51/195) das amostras, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* e 0,5% foi o percentual de isolamento de fungo dimórfico, *Sporothrix schenckii*. Das 150 amostras obtidas dos instrumentos de tosa, o crescimento fúngico ocorreu em 58 amostras, sendo 58,6% (34/58) referentes à lâmina da máquina de tosa e 41,4% (24/58) a rascadeira. Foram identificados os gêneros *Candida* (34,7%), *Malassezia* (47,5%), *Trichosporon* (2,5%) e *Rhodotorula* (15,3%), porém não foram isolados dermatófitos. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos isolados de *Aspergillus* spp frente aos quatro desinfetantes/antissépticos variaram de $\leq 1,25$ a $> 160 \mu\text{l/mL}$ e $\leq 1,25$ a $80 \mu\text{l/mL}$, respectivamente. Enquanto que, tanto a CIM e CFM dos isolados dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* frente aos quatro desinfetantes/antissépticos, variaram de $\leq 1,25$ a $40 \mu\text{l/mL}$. Os resultados obtidos permitem concluir que, no ambiente hospitalar veterinário estão presentes fungos filamentosos e leveduriformes e após a desinfecção houve redução da contaminação fúngica, porém não apresentando diferença estatística significativa; considerando os instrumentos de tosa, a lâmina da máquina de tosa foi a mais contaminada, com predominância do gênero *Malassezia*; a clorexidina-cetrimida, cloreto de benzalcônio e derivado de cloro-fenol foram eficazes na concentração de uso indicada pelo fabricante, enquanto que o hipoclorito de sódio na concentração de uso não inibiu o crescimento fúngico de 56,1% dos isolados testados.

Palavras-Chaves: Leveduras. *Aspergillus* spp. Ambiente hospitalar. Instrumentos de tosa. Desinfetantes. Antissépticos.

Abstract

MATTEI, Antonella Souza. **Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar.** 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aim of this study was isolate filamentous fungi and yeast from veterinary clinics, pet shop and veterinary hospital in Pelotas city/RS and do in vitro test of disinfectants/antiseptics used for clean these places. Surfaces samples were collected from the veterinary hospital before and after the disinfection of the doctor's room, surgery room, internation room and UTI. Samples were collect using contact plates containing agar Sabouraud dextrose added of chloramphenicol, which were incubate at 32°C during five days. After that, the in vitro susceptibility test against sodium hipoclorite, benzalkonium chloride, chlorhexidine-cetrimide and chlorine-phenol derivate was done. Samples from the pet shop, veterinary room and clinics were collected with brush and blade of shearing machine with swabs and cultured in plates containing Sabouraud dextrose agar added of chloramphenicol and olive-oil and Mycosel[®] agar, incubated at 25° and 32°C, for 15 days. In the hospital environment, the filamentous and yeast colonies (CFU/ cm²) was higher in the internation room, showing fungal contamination before disinfection, while the surgical room was the less contaminated. The surfaces studied showed that the stall was the most contaminated before the disinfection, while the trough had a lower contamination. Filamentous fungi grew in 88.9% (192/216) of samples before disinfection, within *Aspergillus* spp identified in 29.2% (56/192). While, yeasts were recovered in 11.1% (24/216) of samples; corresponding to *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* and *Cryptococcus* genus. After a disinfection, filamentous fungi growth occurred in

73.3%(143/195) of samples, within *Aspergillus* genus corresponded to 28.7%(41/143). The yeast fungi growth was found in 26.2%(51/195) of samples, and belong to *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* and *Cryptococcus* genus and 0.5% of dimorphic fungi, *Sporothrix schenckii*. Of these 150 samples through shearing instruments, the fungi growth was observed in 58 samples, within 58.6% (34/58) at blade of shearing machine and 41.4% (24/58) from brush. There, *Candida* (34.7%), *Malassezia* (47.5%), *Trichosporon* (2.5%) e *Rhodotorula* (15.3%) were the genus identified, noone dermatophytes was obtain. The range of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) of disinfectants/antiseptics against *Aspergillus* spp isolates were ≤ 1.25 to > 160 $\mu\text{l/mL}$ and ≤ 1.25 to 80 $\mu\text{l/mL}$, respectively. Whereas, range of MIC and MFC of disinfectants/antiseptics against *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Rhodotorula* genus isolates were ≤ 1.25 to 40 $\mu\text{l/mL}$. In the veterinary hospital environment filamentous fungi and yeast are present. After disinfection a decrease in the fungal contamination occurs, but without statistically significant. About shearing instruments, the blade of shearing machine was the most contaminated part, with a predominance of *Malassezia* genus. The benzalkonium chloride, chlorhexidine-cetrimide and chlorine-phenol derivated were effective in the use concentration recommended by the manufacturer, while the sodium hypochlorite use concentration did not inhibit fungal growth of 56.1% of isolates tested.

Key-words: Yeasts, *Aspergillus* spp. Hospital environment. Shearing instruments. Disinfectants. Antiseptics.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Coleta de amostras de superfície da mesa do consultório com placa de contato contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol.....	38
Figura 2 -	Método de coleta de amostras dos equipamentos de tosa, lâmina da máquina de tosa (A) e rascadeira (B).....	39
Figura 3 -	Preenchimento da galeria com o inóculo fúngico para identificação de leveduras (A) e disposição das galerias (ID32C) na estufa a 30°C (B).....	41
Figura 4 -	Aspecto macro e microscópico dos isolados de <i>A. niger</i> (A), <i>A. flavus</i> (B) e <i>A. fumigatus</i> (C) identificados nas amostras provenientes das superfícies hospitalares.....	47
Figura 5 -	Aspectos macromorfológicos das colônias de <i>Candida guilliermondii</i> (A), <i>Candida lipolytica</i> (B), <i>Cryptococcus uniguttulatus</i> (C), <i>Cryptococcus laurentii</i> (D), <i>Trichosporon asahii</i> (E) e <i>Trichosporon mucoides</i> (F) em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 35°C, isolados da superfície hospitalar veterinária.....	48
Figura 6 -	Diferenças macromorfológicas das colônias de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A) e <i>Rhodotorula</i> spp (B) em ágar Sabouraud acrescido de cloranfeniol a 35°C.....	49

Figura 7 -	Aspectos macro (A) e micromorfológicos (B) da forma filamentosa do fungo <i>Sporothrix schenckii</i> isolado da superfície do armário do hospital veterinário.....	49
Figura 8 -	Colônias leveduriformes em meio CHROMágar <i>Candida</i> ®, com coloração roxa identificados como <i>Candida kruzei</i> e coloração azul como <i>C. tropicalis</i>	50
Figura 9 -	Frequência de espécies de <i>Aspergillus</i> nos diferentes ambientes hospitalares antes da desinfecção.....	52
Figura 10 -	Frequência de leveduras isoladas nos diferentes ambientes hospitalares antes da desinfecção.....	53
Figura 11 -	Frequência de espécies de <i>Aspergillus</i> nos diferentes ambientes hospitalares estudados depois da desinfecção.....	54
Figura 12 -	Frequência de leveduras isoladas nos diferentes ambientes hospitalares depois da desinfecção.....	55
Figura 13 -	Frequência de isolamento de leveduras dos gêneros <i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Rhodotorula</i> e <i>Trichosporon</i> em instrumentos de tosa..	57
Figura 14 -	Antifungigrama através da técnica de microdiluição em caldo de <i>Aspergillus fumigatus</i> frente a clorexidina-cetrimida (A); <i>Aspergillus niger</i> frente a derivado de cloro-fenol (B), <i>Aspergillus flavus</i> frente ao cloreto de benzalcônio (C) e <i>Aspergillus flavus</i> frente ao hipoclorito de sódio (D). +: controle de crescimento, -: controle de esterilidade. Poços da esquerda para direita correspondem a maior para a menor diluição do desinfetante, (seta – concentração de uso).....	59
Figura 15 -	Antifungigrama através da técnica de microdiluição em caldo com hipoclorito de sódio frente a <i>Trichosporon asahii</i> (A), <i>Candida glabrata</i> (B), <i>C. parapsilosis</i> (C), <i>C. famata</i> (D), demonstrando poço com crescimento (seta amarela) e sem crescimento (seta branca).....	62

Figura 16 - Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do hipoclorito de sódio frente aos isolados de <i>Rhodotorula</i> spp. (A) e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (B).....	62
Figura 17 - Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) da clorexidina-cetrimida frente aos isolados de <i>Candida famata</i> (A) e <i>Candida guilliermondii</i> (B) e, cloreto de benzalcônio frente aos isolados de <i>Candida guilliermondii</i> (C) e <i>Trichosporon mucoides</i> (D).....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Superfícies e objetos avaliados quanto à contaminação fúngica nos distintos locais de estudo.....	37
Tabela 2 -	Média das UFC/cm ² dos locais coletados em relação à contaminação fúngica antes e depois da desinfecção.....	45
Tabela 3 -	Comparação das médias da contaminação fúngica das superfícies antes e depois da desinfecção.....	46
Tabela 4 -	Identificação das leveduras isoladas das superfícies hospitalares e dos instrumentos de tosa através de dois métodos distintos.....	51
Tabela 5 -	Amostras positivas para <i>Aspergillus</i> spp. nos diferentes ambientes de estudo antes da desinfecção.....	52
Tabela 6 -	Número de amostras positivas para fungos, de acordo com o local e instrumentos de tosa.....	56
Tabela 7 -	Isolados leveduriformes, de acordo com o local de estudo.....	57
Tabela 8 -	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de isolados de <i>Aspergillus</i> spp. frente a clorexidina-cetrimida (CC), hipoclorito de sódio (HIP), derivado de cloro-fenol (CLO) e cloreto de benzalcônio (CB).....	58

Tabela 9 -	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de cada desinfetante testado frente a <i>Aspergillus</i> spp. isolados de ambiente veterinário.....	60
Tabela 10 -	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de isolados de leveduras frente a clorexidina- cetrimida (CC), hipoclorito de sódio (HIP), derivado de cloro fenol (CLO) e cloreto de benzalcônio (CB).....	61
Tabela 11 -	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de cada desinfetante testado frente as leveduras isoladas de ambiente veterinário	63

Lista de abreviaturas e siglas

AD – Antes da desinfecção

BHI – Caldo de Infusão cérebro-coração

CB – Cloreto de benzalcônio

CC – Clorexidina-cetrimida

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CI – Concentração de uso indicada pelo fabricante do desinfetante

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLO – Derivado de cloro fenol

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

FacVet – Faculdade de Veterinária

FDA – Food and Drug Administration

FeLV – Vírus da leucemia felina

FIV – Vírus da imunodeficiência felina

HEPA – Filtros de proteção contra partículas do ar

HIP – Hipoclorito de sódio

HIV - Human Immunodeficiency Virus

HUCV – Hospital Universitário de Clínicas Veterinária

MOPS – Ácido 3 – N – morfolino propanosulfônico

NaCl – Cloreto de sódio

PD – Após a desinfecção

PDA – Potato Dextrose Agar

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RS – Rio Grande do Sul

Sb+cl – Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol

SCI – Sala cirúrgica

SCO – Sala do consultório

SIN – Sala de internação

UFC – Unidade formadora de colônias

UFPeI – Universidade Federal de Pelotas

UTI – Unidade de tratamento intensiva

Sumário

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	6
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas.....	13
Lista de abreviaturas e siglas.....	15
Sumário.....	17
1 Introdução.....	19
2 Revisão bibliográfica.....	22
2.1 Contaminação fúngica ambiental.....	22
2.2 Desinfetantes e Antissépticos.....	23
2.3 Características gerais dos fungos com potencial patogênico.....	24
3 Objetivos.....	35
4 Materiais e Métodos.....	36
4.1 Locais de estudo.....	36
4.2 Coleta de amostras e isolamento fúngico.....	36
4.2.1 Processamento das amostras e identificação fúngica.....	37
4.3 Identificação dos isolados fúngicos.....	39
4.3.1 Fungos filamentosos.....	39
4.3.2 Fungos leveduriformes.....	40

4.4 Teste de suscetibilidade de fungos filamentosos e leveduriformes frente a desinfetantes e antissépticos.....	41
4.4.1 Isolados e inóculos fúngicos.....	41
4.4.2 Preparação das diluições dos desinfetantes e antissépticos.....	42
4.4.3 Preenchimento das microplacas com os inóculos fúngicos e diluições dos agentes químicos.....	43
4.4.4 Incubação das microplacas.....	43
4.4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima.....	43
4.5 Análise Estatística.....	43
5 Resultados	45
5.1 Fungos em superfícies hospitalar.....	45
5.2 Caracterização dos isolados fúngicos.....	46
5.3 Isolamento fúngico em superfície hospitalar.....	51
5.3.1 Isolamento fúngico antes da desinfecção.....	51
5.3.2 Isolamento fúngico após a desinfecção.....	53
5.4 Isolamento fúngico em instrumentos de tosa.....	56
5.5 Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	58
5.5.1 Isolados fúngicos filamentosos.....	58
5.5.2 Isolados fúngicos leveduriformes.....	60
6 Discussão	64
7 Conclusões	71
Referências	72

1 Introdução

Os ambientes hospitalares são importantes fontes de infecções para uma grande variedade de microrganismos que podem ser responsáveis por doenças infecciosas superficiais a sistêmicas. Dessa forma, alguns fatores como, estado de comprometimento do hospedeiro, cadeia de transmissão no hospital e presença de microrganismos no ambiente são determinantes para a instalação e desenvolvimento de enfermidades (PANAGOPOULOU et al., 2002). Neste contexto, os fungos filamentosos e leveduriformes pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* e *Rhodotorula* são apontados como alguns importantes agentes causadores de micoses oportunistas. Estes microrganismos apresentam maior probabilidade de causar infecções hospitalares por serem ubíquos, podendo manter-se no ambiente e em superfícies por períodos prolongados (PFALLER; DIEKEMA, 2007; VONBERG; GASTMEIER, 2006; MORRIS et al., 2000). A concentração de fungos no ambiente depende de diversos fatores, incluindo, número de pacientes, circulação de pessoas, intensidade das trocas de ar e ainda da limpeza e desinfecção ambiental (FALVEY; STREIFEL, 2007).

A preocupação com as infecções oportunistas estende-se além do ambiente hospitalar, sendo importante também em locais onde há um trânsito intenso de animais, como em exposições, pet shops, feiras e canis. Nestas situações ocorre à predisposição para o estresse que facilita a instalação de fungos oportunistas, em especial os dermatófitos (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A população de animais de companhia, nos últimos anos, tem aumentado significativamente, estando estes cada vez mais inseridos no cotidiano. Seguindo esta tendência mundial, na região de Pelotas/RS/Brasil, estima-se que a população de cães seja aproximadamente de 60 mil, havendo um cão para cada 5,6 habitantes (LAUTENSCHLÄGER, 2008). Desse modo, os cuidados com animais de estimação dispensados pelos proprietários cresceram auxiliados pelo surgimento de pet shops, consultórios e clínicas veterinárias, sendo de grande importância que se estabeleça um sistema de higienização nestes locais.

Nos últimos anos, as infecções fúngicas adquiriram grande importância mundial devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, os quais são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções oportunistas cutâneas, oculares, pulmonares ou sistêmicas. Além disso, algumas cepas do ambiente hospitalar tornaram-se resistentes a drogas antimicrobianas dificultando dessa forma, o tratamento e controle das infecções (FLEMMING et al., 2002; ALMEIDA et al., 1988).

Cada vez torna-se mais atual a idéia de que a profilaxia é o maior aliado, fazendo-se necessário um grande esforço para manter a infecção sob controle dentro dos padrões preconizados pelo setor de controle de infecção hospitalar (SHERLOCK et al., 2009; ANDERSEN et al., 2009). Os princípios básicos de limpeza, desinfecção, esterilização e biossegurança são equivalentes em hospitais veterinários, porém devido a algumas particularidades, estes processos não são devidamente padronizados e avaliados, embora existam riscos de contaminação cruzada e infecções hospitalares (SANTOS et al., 2007).

Apesar dos grandes avanços em todas as áreas da saúde, o controle das infecções hospitalares continua sendo um grande desafio, uma vez que a infecção hospitalar é toda a infecção adquirida após a admissão do paciente, e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a própria internação ou ainda com procedimentos hospitalares (SHERLOCK et al., 2009; OWENS; STOESSEL, 2008).

Vários estudos têm sido realizados na área de medicina humana com intuito de pesquisar a presença e classificar os agentes no ambiente de hospitais e clínicas (XAVIER, 2003; AQUINO et al., 2005; BARBERINO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; MEDRANO et al., 2006;) no entanto, na medicina veterinária são raros. Estudos prévios avaliando a contaminação ambiental de clínicas, centros de

recuperação e hospital veterinário, demonstraram a presença de inúmeras espécies de bactérias e fungos, algumas com grande potencial patogênico para os animais, especialmente os portadores de imunodeficiências e aqueles submetidos a procedimentos invasivos ou períodos prolongados de internação (MATTEI et al., 2006; SANTOS et al., 2007; XAVIER et al., 2008).

Desse modo, o estudo das micoses em animais adquiriu grande importância, devido ao fato de que muitas espécies de fungos leveduriformes e filamentosos, que anteriormente eram considerados não-patogênicos, têm atuado como agentes oportunistas, causando enfermidades nestes hospedeiros (SPANAMBERG et al., 2009).

Assim, este trabalho busca contribuir com informações referentes a esta literatura escassa na área, com intuito de levantar dados que possam vir auxiliar na profilaxia e prevenção de doenças fúngicas oportunistas em animais.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Contaminação fúngica ambiental

A contaminação do ambiente hospitalar por bactérias, vírus e fungos ocorre através do ar, água e objetos que ocasionalmente são contaminados através de urina, pus e outros fluídos de pacientes internados. Assim, a presença de superfícies contaminadas constitui uma importante fonte de infecção e transmissão de patógenos para pacientes internados e imunocomprometidos. O fator mais relevante para a prevenção da infecção hospitalar é a higiene das mãos, porém estas mantendo contato com superfícies contaminadas podem readquirir patógenos e disseminá-los aos pacientes. Dessa maneira, o monitoramento de ambientes tem sido prioridade na qualidade dos hospitais (SHERLOCK et al., 2009). A remoção destes fluídos é o principal objetivo para o controle da infecção hospitalar (AYLIFFE et al., 1966).

As infecções fúngicas são comuns e possuem grande importância em pacientes imunocomprometidos, por serem difíceis de tratar e muitas vezes, anteciparem a sua morte, como por exemplo, em pacientes com transplante de medula óssea, uma infecção invasiva por leveduras ou aspergilose pulmonar é responsável por pelo menos metade das mortes precoces (MORRIS et al., 2000). Um estudo realizado sobre a epidemiologia da septicemia descreveu um aumento de 207% dos casos por fungos entre 1979 a 2000, sendo relacionados aos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Dentro os fatores de patogenicidade, está a capacidade de algumas espécies de leveduras formar biofilme, potencializando seus fatores de virulência, adquirindo

assim maior proteção contra as defesas do hospedeiro e ambiente (ZANATTA; RÖSING, 2007).

As rotinas de boa higiene, baseadas na limpeza de superfícies são recomendadas para controlar a propagação de patógenos em ambientes hospitalares. A limpeza remove mecanicamente sujidades que predisõem o crescimento de microorganismos e elimina a flora residente (ANDERSEN et. al, 2009). Os princípios básicos de limpeza, desinfecção, esterilização e biossegurança são equivalentes em hospitais veterinários, porém devido algumas particularidades, estes processos não são devidamente padronizados e avaliados, embora existam riscos de contaminação cruzada e infecções hospitalares (SANTOS et. al, 2007).

2.2 Desinfetantes e Antissépticos

No mercado existem diferentes princípios ativos de desinfetantes, sendo necessário o conhecimento do espectro de atividade desejada, toxicidade, poder residual, custo e natureza do material a ser tratado. Não existe um produto que apresente todas as características citadas, possuindo vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (MCDONNELL; RUSSEL, 1997).

A clorexidina foi sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele (ZANATTA; RÖSING, 2007). É classificada como uma biguandina, provavelmente o biocida mais usado em produtos antissépticos, em particular em produtos orais e para lavagem das mãos. Possui largo espectro de ação, substancialmente para a pele, principalmente pela baixa irritabilidade. Sua atividade é pH dependente, sendo reduzida na presença da matéria orgânica. Sua ação sobre os fungos ocorre pelo rompimento da parede celular, resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático, havendo a morte celular (MCDONNELL; RUSSEL, 1997).

Enquanto que, o cloreto de benzalcônio é classificado como um composto de amônia quaternária, também sendo conhecido como um detergente catiônico. Usualmente utilizado na antisepsia de mucosas e pele íntegras, além de superfícies (MCDONNELL; RUSSEL, 1997). Entretanto, Weber et al. (2007) descreveu nos Estados Unidos que Food and Drug Administration (FDA) não classifica este produto como seguro e eficaz para a utilização como antisséptico. Sua ação ocorre na membrana citoplasmática da célula fúngica, havendo desorganização estrutural

resultando em efeitos prejudiciais. Possui ainda ação esporostática, inibindo o crescimento dos esporos, mas não atua no processo de germinação (MCDONNELL; RUSSEL, 1997).

O hipoclorito de sódio é um dos sanitizantes empregados com mais sucesso nas indústrias de alimentos, sendo compostos eficientes e de baixo custo (BERBARI; PASCHOALINO; SILVEIRA, 2001). Este produto provoca alteração no metabolismo da biossíntese celular (GUIDA, 2006). Possui alta toxicidade, odor forte e pode ocorrer descoloração dos itens operatórios (JEANSONNE; WHITE, 1994). Em odontologia, tem sido eleito como solução irrigadora para uso endodôntico pela maioria dos profissionais pela sua ação oxidante com inibição enzimática irreversível nas bactérias (ESTRELA, et. al, 2002), porém na literatura consultada não foi encontrada sua ação sobre os fungos.

Agentes antimicrobianos do tipo fenólico têm sido utilizados como antisséptico e desinfetante, dependendo da propriedade de cada produto. A ação sobre os fungos ocorre através do rompimento da membrana plasmática, ocorrendo extravasamento celular (MCDONNELL; RUSSEL, 1997). Possui indicação para a desinfecção e limpeza de paredes, pisos, superfícies fixas em locais de grande risco, como em ambientes hospitalares, porém tem efeito reduzido na presença de matéria orgânica (ANDRADE; ANGERAMI; PADOVANI, 2000).

2.3 Características gerais dos fungos com potencial patogênico

Os fungos são seres ubíquos encontrados em vegetais, em animais, no homem, em detritos e no solo, participando ativamente do ciclo dos elementos da natureza, sendo responsáveis pela decomposição de vegetais mortos e reciclagem de elementos vitais (MEIRELES; NASCENTE, 2009).

O Reino *Fungi* engloba três divisões denominadas *Myxomicota*, *Mycophycophyta* e *Eumycota*, sendo este último composto por fungos de importância médica. A divisão *Eumycota* apresenta cinco subdivisões baseadas nas estruturas de reprodução, frutificação e ornamentação sendo *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* e *Deuteromycotina* (LACAZ et al., 2002).

Os fungos são eucarióticos, heterotróficos, uni ou multicelulares e de reprodução sexuada e/ou assexuada. Os fungos unicelulares, também denominados leveduras, são caracterizados por possuírem células únicas de formato oval a

arredondado, dividindo-se através de brotamento simples, brotamento-fissão ou divisão binária, podendo apresentar cápsula composta por mucopolissacarídeo e pseudo-hifas. Durante a fase vegetativa, alguns gêneros podem apresentar a forma filamentosa verdadeira (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os fungos multicelulares, também denominados filamentosos, são caracterizados por apresentarem estruturas tubulares chamadas hifas, as quais podem ser hialinas ou demáceas, ramificadas, septadas e/ou cenocíticas. Possuem uma porção vegetativa e uma de frutificação, sendo responsável pela reprodução. Quando não possuem o aparelho de frutificação, derivado de um processo sexuado (perfeito ou teleomorfo) ou assexuado (imperfeito ou anamorfo), caracteriza-se por micélio estéril. A diferenciação das espécies ocorre através de estruturas vegetativas, de frutificação e de ornamentação (LACAZ et al., 2002).

Além dessas duas classes, leveduras e filamentosos, existem os fungos dimórficos que apresentam as duas formas, dependendo principalmente, da temperatura, nutriente e concentração de oxigênio (SIDRIM; ROCHA, 2004).

O gênero *Aspergillus* pertence à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae*, possuindo mais de 300 espécies, das quais cerca de 20 são patogênicas, destacando *A.fumigatus*, *A.flavus* e *A.niger* (SIDRIM; ROCHA, 2004). Os fungos deste gênero apresentam colônias filamentosas de coloração, textura e topografia variadas, sendo o *A. fumigatus* caracterizado por uma colônia de textura algodonosa e coloração branca, passando à cinza-esverdeada e de textura pulverulenta, com reverso branco ou acastanhado e sem pigmento difusível. Enquanto que o *A. niger* possui textura algodonosa, de coloração branca ou amarela, que rapidamente torna-se preta com textura arenosa. O *A. flavus* apresenta uma textura arenosa de grãos grandes e coloração amarelo-esverdeada, com reverso branco ou cinza, podendo tomar o tom castanho-escuro na presença de esclerócitos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Micromorfologicamente, todas as espécies de *Aspergillus* apresentam hifas hialinas septadas de aproximadamente 4µm de espessura. A estrutura de frutificação, típica do gênero, é caracterizada por um conidióforo com uma célula pé e uma dilatação no ápice chamada de vesícula, onde se inserem as métulas em espécies bisseriadas, ou as fiálides em espécies unisseriadas, as quais dão origem aos conídios (SIDRIM; ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002). Este gênero dá origem a grande quantidade de conídios pequenos, lisos ou rugosos e capazes de serem

veiculados muito facilmente pelo ar e contaminando os ambientes. Em humanos são causadores de manifestações respiratórias, cutâneas e alérgicas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Aspergilose invasiva é uma das causas da elevada taxa de mortalidade de pacientes internados, sendo que as espécies comumente envolvidas são *Aspergillus fumigatus*, seguido do *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (LATGÉ, 1999; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Como o *Aspergillus* spp. é um fungo ubíquo, milhares de conídios são desprendidos das fiálides diariamente e dispersos no ar, contaminando o ambiente (LATGÉ, 1999).

Pesquisas para determinar a prevalência de *Aspergillus* spp em ambientes hospitalares humanos tem sido desenvolvidas, uma vez que estes são fontes de infecção em potencial deste fungo (MORRIS et al., 2000; XAVIER, 2003; VONBERG; GASTMEIER, 2006; FALVEY; STREIFEL, 2007), entretanto em ambientes veterinários ainda são escassos (MATTEI et al., 2006; XAVIER et al., 2008).

Em cães, a aspergilose pode manifestar-se nas formas sinonasal, disseminada e pulmonar, sendo a forma sinonasal relativamente comum em cães adultos jovens, especialmente, dolicocefálicos. A doença cursa com secreção nasal serosa unilateral podendo tornar-se purulenta e bilateral, além de ocorrer despigmentação das narinas (FERREIRA, 2008).

Os dermatófitos são fungos queratinofílicos que acometem a pele, pelos e anexos, sendo taxonomicamente relacionados e pertencentes a subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales*, família *Moniliaceae*, gêneros *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* (SIDRIM; ROCHA, 2004). Estes fungos são os agentes causadores da dermatofitose, a qual é considerada a dermatopatia fúngica de maior ocorrência na clínica de pequenos animais. Apenas os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* são importantes patógenos de pequenos animais, principalmente as espécies *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* (LACAZ et al., 2002).

M. canis é caracterizado como zoofílico, no qual o felino é considerado o reservatório assintomático transmitindo o fungo aos humanos pelo contato direto ou indireto (NOBRE, MEIRELES; CORDEIRO, 2000). As colônias apresentam uma textura algodonosa, com discreto relevo umbilicado e radiado, de tonalidade branca. O reverso apresenta coloração amarelo-limão, que pode difundir-se pelo meio e com

o tempo torna-se castanho. O pleomorfismo muitas vezes é evidenciado, apresentando-se como colônias algodonosas altas. A microscopia das colônias demonstra grande número de macroconídios fusiformes, de parede grossa e com septos, que variam de seis a quinze células. Os microconídios, quando presentes, são sésseis e sem valor de diagnóstico. Podem ainda ser observados clamidoconídios, órgãos nodulares e hifas pectinadas (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). A espécie felina pode comportar-se como portadora assintomática desta espécie fúngica zoofílica, apresentando índices de transmissão de 8 até 88% dos casos zoonóticos. Isso ocorre devido à presença de um emulsificado lipídico na superfície da pele que inibe a patogenicidade determinada pelos dermatófitos (NOBRE; MEIRELES; CORDEIRO, 2000; RAMALHO et al., 2007).

M. gypseum é uma espécie geofílica, no qual a infecção de humanos e animais ocorre através do contato com solo. As colônias filamentosas são caracterizadas macromorfológicamente por uma superfície plana, de bordas irregulares e extremamente granular, conferindo aspecto de areia de praia, com pigmentação do verso amarelo-acastanhado e reverso pode variar de laranja a marrom, porém este não se difunde pelo meio. Nesta espécie, há uma forte tendência ao pleomorfismo das colônias, caracterizadas por superfície algodonosa e branca, constituída apenas de hifas estéreis. Microscopicamente apresenta uma grande quantidade de macroconídios simétricos com três a sete septos com parede fina, extremidade arredondada e superfície rugosa. Algumas cepas podem ainda apresentar numerosos microconídios piriformes (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A espécie *Trichophyton mentagrophytes* possui cinco variedades, sendo *interdigitale*, *nodulare*, *mentagrophytes*, *quinckeanum* e *erinacei*. As variedades *interdigitale* e *nodulare* são antropofílicas e as outras são zoofílicas (LACAZ et al., 2002). As colônias são planas, de coloração branca a creme e superfície pulverulenta a granular. Algumas colônias apresentam dobras ou tufo centrais e áreas penugentas, devido ao pleomorfismo. O reverso possui coloração marrom-amarelado, variando até marrom-avermelhado. No exame direto das colônias observa-se uma abundância de estruturas de frutificação como, grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, conferindo formato de cacho. Os macroconídios, quando presentes, mostram aspecto de charuto de um a seis septos transversais ligados a hifas hialinas e septadas. Além de apresentarem estruturas de

ornamentação como, hifas em espiral, órgãos nodulares, hifas em raquete e clamidoconídios intercalares (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A dermatofitose é a micose de pele mais freqüentes nos animais de estimação. O grande poder de contágio entre os animais, alto custo do tratamento, dificuldade de medidas de controle e os efeitos em saúde pública desta micose, pode explicar a sua grande importância (CHERMETTE, FERREIRO; GUILLOT, 2008).

A transmissão desta micose pode ocorrer através do contato direto com as lesões, entre e intra-espécies ou pelo contato indireto, através de instrumentos compartilhados e ambientes contaminados (ATES et al., 2008).

A susceptibilidade a dermatofitose depende do estado geral de saúde do animal. Doenças concomitantes como, hiperadrenocorticismismo ou terapia prolongada com medicamentos podem favorecer o desenvolvimento desta enfermidade. Em felinos pode estar relacionada a doenças imunossupressoras, como a leucemia felina (FeLV) e imunodeficiência viral felina (FIV) (CHERMETTE, FERREIRO; GUILLOT, 2008).

As leveduras do gênero *Candida* pertencem à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, ordem *Moniliales* e família *Cryptococcaceae* (SIDRIM; ROCHA, 2004). Existem mais de 190 espécies das quais cerca de 20 apresentam potencial patogênico. As principais espécies são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. curvata*, *C. lambica*, *C. famata*, *C. rugosa* e *C. humicola* (RIPPON, 1988; KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004); porém a espécie envolvida na maioria dos casos de candidose em mamíferos é *C. albicans*, entretanto espécies não-albicans, tem apresentado crescente importância nos quadros clínicos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SIDRIM; ROCHA, 2004).

No cultivo a 35°C em ágar Sabouraud dextrose, tem crescimento rápido, entre 24-48 horas, apresentando colônias brilhantes ou opacas, textura cremosa, com bordas regulares ou irregulares, de coloração branca a creme e odor de levedo. Na microscopia caracterizam-se por blastoconídios esféricos ou levemente ovais, paredes finas e ausência de cápsula, sendo que algumas espécies apresentam clamidoconídios terminais ou intercalares (LACAZ et al. 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A candidose é considerada a mais freqüente das micoses invasivas, representando 80% das infecções fúngicas hospitalares em humanos. *Candida* spp. é considerada atualmente o quarto agente de infecções de corrente sanguínea (representando de 8 a 10% dos casos), devido a um aumento de 500% em sua incidência a partir da década de 80. Numerosos estudos nos últimos 10 anos têm documentado as características de candidemia no Brasil (GOLDANI; MARIO, 2003; ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al. 2005; PASQUALOTTO, ANTUNES; SEVERO, 2006; BARBERINO et al., 2006; COLOMBO et al., 2006; MEDRANO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; PASQUALOTTO et al., 2007; PASSOS et al., 2007). Nos Estados Unidos, as candidemias ocupam o quarto lugar entre as infecções do tecido sanguíneo, atingindo 57% de mortalidade e aumentando o tempo de hospitalização (BOFF et al., 2008).

Estudo realizado em mãos de profissionais de saúde de UTI, este gênero foi isolado, podendo ser uma fonte de infecção para pacientes internados neste local (NASCENTE et al., 2007).

A infecção por *Candida* spp. pode ser facilitada por vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos, sendo os mais comuns a imunossupressão por várias causas, neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica (MALUCHE; SANTOS, 2008).

Em animais, a candidose pode apresentar-se de forma subaguda, aguda ou crônica, agrupadas em três formas clínicas, muco-cutânea, sistêmica e alérgica, sendo esta última rara em pequenos animais (MEIRELES; NASCENTE, 2009). Já foram descritos casos de candidose cutânea em cães, gatos e macaco-prego (FERREIRO et al., 2002; MUELLER; BETTENAY; SHIPSTONE, 2002; CLEFF et al., 2007; CLEFF et al., 2008).

O gênero *Cryptococcus* encontra-se na mesma posição sistemática do gênero *Candida*. A espécie *Cryptococcus neoformans* possui a variedade *neoformans*, sorotipo A e D e variedade *gatti*, sorotipo B e C. Atualmente, estão ocorrendo mudanças quanto à classificação, sendo que o sorotipo A passa a ser denominado variedade *grubii*, o sorotipo D continua pertencendo a variedade *neoformans* e a variedade *gatti* passa a ser espécie. Existem outras espécies como *C. albidus*, *C. uniguttulatus*, *C. laurentii*, *C. flavus*, *C. terreus* entre outros (LACAZ et al., 2002; MEIRELES; NASCENTE, 2009).

As colônias em meio Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol a 35°C possuem aspecto mucóide e de coloração creme. No ágar Niger, as colônias possuem coloração acinzentadas a marrom, devido a produção de melanina. O exame direto das colônias através da coloração de gram revela células leveduriformes esféricas sem cápsula evidente com brotamento uni ou multipolar. Através da tinta da China, a cápsula é evidenciada facilmente (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Infecções causadas pelo gênero *Cryptococcus*, geralmente ocorrem pela espécie *C. neoformans*, entretanto outras espécies são consideradas patogênicas tanto em humanos como em animais, *C. gatti*, *C. laurentii*, *C. albidus* e *C. uniguttulatus* (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000; LABRECQUE; SYLVESTRE; MESSIER, 2005; PEDROSO; FERREIRA; CÂNDIDO, 2006). *Cryptococcus neoformans* é um patógeno oportunista que muitas vezes está relacionado com pacientes imunodeprimidos (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000), sendo a segunda infecção mais frequente nestes pacientes (SILVA et al., 2008). Em animais, casos foram descritos em diversas espécies, sendo que as aves são consideradas como disseminadores deste fungo nas fezes (GROGAN; HART, 1997).

A criptococose em humanos é adquirida através da inalação, podendo ocorrer migração para o sistema nervoso central, sendo a principal manifestação clínica a meningoencefalite, porém qualquer órgão do corpo pode ser acometido (RAMOS-BARBOSA; GUAZZELLI; SEVERO, 2004). Enquanto que, em animais as manifestações clínicas ocorrem no sistema respiratório superior, sistema nervoso central, cutâneo e ocular (MEIRELES; NASCENTE, 2009).

O gênero *Trichosporon* está classificado à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales* e família *Moniliaceae* (SIDRIM; ROCHA, 2004). As colônias em ágar Sabouraud a 35°C possuem coloração creme que com o tempo tornam-se amarelo-acinzentada, com aspecto rugoso. Microscopicamente caracteriza-se por hifas hialinas com artroconídios e blastoconídios (LACAZ et al., 2002).

Trichosporon spp. é importante patógeno causador de micoses emergentes em pacientes humanos neutropênicos, particularmente quando estão em tratamento com quimioterápicos citotóxicos e imunossupressivos. As espécies comumente relacionadas a quadros clínicos de endocardites e ceratites são *T. asahii* e *T.*

mucoïdes (LACAZ et al., 2002; KENDIRLI et al., 2005; LACASSE; CLEVELAND, 2008).

A principal micose superficial relacionada com este gênero é caracterizada pela presença de nódulos claros e pouco aderentes ao pêlo, conhecida como piedra branca (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA; 2004; GOMPERTZ et al., 2005).

As infecções invasivas por *Trichosporon* spp. são geralmente precedidas da colonização do trato respiratório ou gastrointestinal, sendo comum nestes pacientes a presença de cateter venoso em posição central (WALSH et al., 1990; WALSH et al., 1992; LUSSIER et al., 2000; WALSH et al., 2004). Este gênero tem sido relatado como a segunda causa mais comum de infecções por leveduras após o gênero *Candida*, em pacientes com doenças hematológicas malignas (KREMERY et al., 1999; FLEMMING; WALSH, ANAÏSSIE, 2002; WALSH et al., 2004).

Por outro lado, na literatura consultada, não foram encontrados relatos de infecção por leveduras do gênero *Trichosporon* em animais, porém já foram isoladas de lavado broncoalveolar de cães hígidos (MELCHERT et al., 2008) e do meato acústico externo de gatos saudáveis (AMARAL et al., 1998).

O gênero *Rhodotorula* pertence à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, ordem *Moniliales* e família *Cryptococcaceae*. As colônias em Sabouraud a 35°C apresentam coloração alaranjada a avermelhada com aspecto mucóide devido a presença de cápsula, enquanto outras são pastosas ou secas e rugosas. Microscopicamente é caracterizado por blastoconídios unicelulares ovóides ou alongados, podendo ser observado em algumas espécies, a formação de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* eram consideradas saprófitas e contaminantes comum de amostras. Entretanto, nos últimos anos tem emergido como patógeno oportunista, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Casos de fungemia, endocardites, peritonites e meningites foram associadas a infecção deste em cateteres contaminados através do ambiente ou pela microbiota humana (GOMEZ-LOPEZ et al., 2005), casos de infecção sistêmica foram descritos em 43 pacientes entre 1960 a 2000 (ZAAS et al., 2003).

Em 2007, um estudo isolou estas leveduras em superfície de manipulação de medicamentos e mãos de profissionais da saúde em UTI, sugerindo que as mãos desses trabalhadores poderiam ser uma fonte de infecção para pacientes internados (NASCENTE et al., 2007).

Em animais não foram relatados na literatura consultada nenhum caso envolvendo esta espécie fúngica.

O gênero *Malassezia* pertence a divisão *Basidiomycotina*, classe *Hymenomycetes*, ordem *Tremellales* e família *Filobasidiaceae* (SIDRIM; ROCHA, 2004), caracterizando-se por células esféricas ou elipsoides, lipofílica, podendo ou não ser lipodependente (YARROW; AHEARN, 1984; BARNETT, PAYNE, YARROW; 2000).

Segundo as características dos ácidos nucleicos, o gênero apresentava três espécies reconhecidas, *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*, entretanto, a partir de 1994 através de estudos fisiológicos, energéticos e bioquímicos principalmente de assimilação de tweens e tipificação molecular do DNA das leveduras, quatro novas espécies foram incluídas, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. sloofiae*. Porém, recentemente, foram incluídas mais seis espécies ao gênero, sendo *M. pachydermatis* ainda a única não-lipodependente. As novas espécies são *M. dermatitis* (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. yamatoensis* (SUGITA et al., 2004), *M. nana* (HIRAI et al., 2004), *M. caprae* e *M. equina*, sendo estas três últimas isoladas de animais (CABAÑES et al., 2007).

Morfologicamente a *M. pachydermatis* se apresenta como células isoladas ou em grupos, de formato oval ou com germinação unipolar de base larga, adquirindo o formato “de garrafa”. Normalmente, as hifas e pseudohifas estão ausentes (MÜLLER; KIRK, SCOTT, 1989; LACAZ et al., 2002). O cultivo da levedura é realizado em meio com ágar Sabouraud ou ágar malte, com temperatura ótima de crescimento de 37°C em cerca de 24 a 48 horas (AKERSTEDT; VOLLSET, 1996). As colônias são opacas de coloração amarelo-creme passando à marrom-alaranjado, de superfície redonda ou em forma de cúpula, e de textura seca, friável e granulosa e, algumas vezes gordurosa (GUILLLOT, CHERMETTE, MAILLARD, 1996).

Malassezia pachydermatis é a espécie mais estudada em animais, sendo considerada parte da microbiota de vários sítios anatômicos em cães e gatos, principalmente do meato acústico externo e tegumento cutâneo, embora também possa ser freqüentemente isolada do reto, sacos anais, vagina e espaço interdigital (NOBRE et al., 1998; BOND; LAMPORT; LLOYDY; 2000; MARTINS et al., 2004; NASCENTE et al., 2004). Nos últimos anos, os estudos também a relacionaram como causadora de dermatite em cães (LARSSON et al., 1988; STEWART, 1990;

PLANT; ROSENKRANTZ; GRIFFIN, 1992; BOND, LLOYD, 1997; NOBRE et al., 1998), leão marinho (NAKAGAKI et. al, 2000) e golfinhos (POLLOCK; ROHRBACH, RAMSAY, 2000).

A espécie *M. pachydermatis* é descrita como um dos principais agentes causadores de otites em cães (NOBRE et al., 2001; HARVEY, RARARI; DELAUCHE, 2004; CAFARCHIA et al., 2004). Assim, esta levedura pode ser carregada pelas mãos dos proprietários representando riscos à saúde de pessoas, principalmente em pacientes internados em UTI, uma vez que este gênero já foi isolado de superfícies e mãos de profissionais da saúde (MORRIS, 2005; NASCENTE et al., 2007).

O *Sporothrix schenckii* pertence à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae*. Por ser um fungo dimórfico, o crescimento a 25°C revela a forma filamentosa, caracterizada por colônias de superfície rugosa e dobrada, acastanhada e enegrecida nas bordas, devido à presença de melanina. Na microscopia observam-se hifas finas, septadas e ramificadas. Os conídios se dispõem em cachos terminais, na extremidade do conidióforo conferindo a forma de margarida. Enquanto que a forma leveduriforme apresenta crescimento a 37°C com colônias úmidas, cremosas e de coloração parda-amarelada. Na microscopia as células leveduriformes possuem gemulação única, variando em forma e tamanho, podendo ser ovais ou arredondadas (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Estudos demonstram diferenças genéticas entre isolados de *S. schenckii* provenientes do ambiente e de humanos sugerindo a possibilidade de mutações ou a existência de outras espécies do gênero *Sporothrix* (MESA-ARANGO et al., 2002). No Peru foram descritos uma biodiversidade genética entre 17 isolados de espécie humana (HOLECHECK et al., 2004). Assim como, recentemente foram descritos três novas espécies de *Sporothrix* denominadas *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. braziliensis* relacionados a diferenças geográficas e fenotípicas do fungo (MARIMON et al., 2007).

O *S. schenckii* é o agente etiológico da esporotricose, uma micose subcutânea que acomete humanos e diversos animais domésticos, sendo encontrado no solo, plantas e vegetais em decomposição (SCHUBACH et al., 2001; SOUZA et al., 2006, MADRID et al., 2007). A transmissão ocorre através da inoculação traumática do fungo na derme ou por soluções de continuidade,

resultando em lesões cutâneas. Dentre os animais, a espécie felina apresenta importante papel na cadeia epidemiológica da doença, transmitindo o fungo para humanos e animais através da mordedura e/ou arranhadura (SCHUBACH et al., 2001). A contaminação humana através da manipulação do solo foi descrita na Venezuela, ocorrendo o isolamento deste fungo a partir do ambiente em uma área endêmica (MENDONZA et al., 2007). Além disso, este agente foi também isolado do solo e caules de milho na Índia (MEHTA et al., 2007) e México (PÉREZ et al., 2007).

3 Objetivos

- Avaliar e quantificar fungos filamentosos e leveduriformes presentes no Hospital Universitário de Clínicas Veterinária (HUCV – UFPeI), identificando o gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*;
- Avaliar a presença de dermatófitos e leveduras em instrumentos de tosa de clínicas e consultórios veterinários, pet shops e Hospital Universitário de Clínicas Veterinária (HUCV – UFPeI);
- Avaliar a eficácia da desinfecção de superfície do HUCV– UFPeI;
- Avaliar a eficácia *in vitro* dos isolados fúngicos frente aos desinfetantes/antissépticos utilizados na limpeza de ambientes veterinários.

4 Materiais e Métodos

4.1 Locais de estudo

Os locais de estudo para as coletas de superfície e instrumentos de tosa foram um hospital veterinário de pequenos animais, duas clínicas veterinárias, três pets shops e dois consultórios veterinários localizados na cidade de Pelotas/RS. As amostras obtidas foram processadas no Laboratório de Doenças Infecciosas, Setor de Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/RS. A identificação dos isolados leveduriformes foi realizada junto ao Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita da Santa Casa-Complexo Hospitalar de Porto Alegre/RS, com auxílio do Dr. Luiz Carlos Severo.

4.2 Coleta de amostras e isolamento fúngico

As amostras de superfícies foram coletadas no hospital veterinário, sendo obtidas da sala do consultório (SCO), sala de internação (SIN), sala cirúrgica (SCI) e da unidade de tratamento intensivo (UTI) antes e após a desinfecção de rotina com cloreto de benzalcônio a 0,5%, sendo que não havia diluição padronizada do desinfetante. Foram utilizadas 124 placas de contato e seis fitas adesivas estéreis por coleta, totalizando 520 amostras em quatro coletas, das quais 260 foram obtidas antes da desinfecção (AD) e 260 pós-desinfecção (PD).

As amostras provenientes dos instrumentos de tosa como lâmina da máquina de tosa e rascadeira foram obtidas de sete locais diferentes, sendo realizadas dez coletas em cada local de estudo (tab. 1). Foram analisadas 150 amostras para a pesquisa de dermatófitos e leveduras, sendo 80 provenientes de lâmina da máquina de tosa e 70 de rascadeira.

Tabela 1- Superfícies e objetos avaliados quanto à contaminação fúngica nos distintos locais de estudo

AMOSTRA	LOCAIS DE ESTUDO	AMBIENTE	SUPERFÍCIES
SUPERFÍCIE	Hospital Veterinário (n=1)	Consultório	Mesa de atendimento, parede, armário e torneira
		Sala cirúrgica	Mesa operatória, mesa de instrumental, calha e parede
		UTI	Armário, baias, torneira e parede
		Internação	Armário, baias, torneira e parede
INTRUMENTOS DE TOSA	Consultórios veterinários (n=2)	Sala de tosa	Lâmina da máquina de tosa e rascadeira
	Clínicas veterinárias (n=2)	Sala de tosa	Lâmina da máquina de tosa e rascadeira
	Pets Shop (n=3)	Sala de tosa	Lâmina da máquina de tosa e rascadeira
	Hospital Veterinário (n=1)	Sala Pré-operatória	Lâmina da máquina tosa

4.2.1 Processamento das amostras e identificação fúngica

Para a coleta das amostras de superfície foram utilizadas placas de contato contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (Sb+Cl)¹, as quais foram pressionadas sobre as superfícies estudadas (Fig. 1), com exceção das amostras de torneiras que foram coletadas através de fitas adesivas estéreis (5x7cm) de 35cm² e posteriormente pressionadas sobre o ágar Sb+Cl. A amostragem foi realizada de acordo com a superfície em questão, no qual foi coletado de 5 a 10% do volume total, tanto antes quanto depois da desinfecção após 10 minutos de ação do desinfetante.

As placas foram incubadas a 32°C durante cinco dias, com observação diária. Após esse período, as colônias foram classificadas em filamentosas e leveduriformes, sendo contado o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/cm².

¹ Neogen Acumedia®, Michigan/EUA

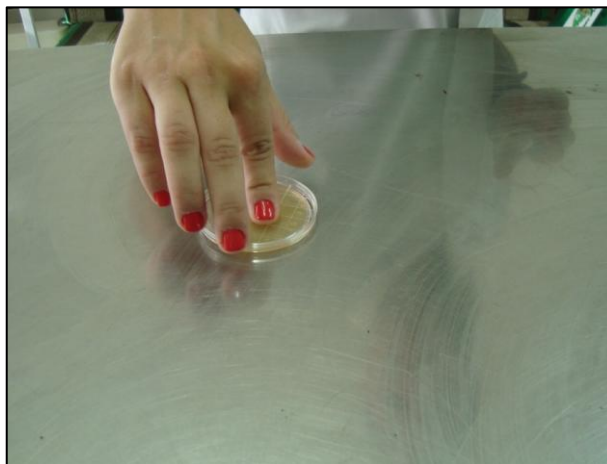


Figura 1 - Coleta de amostra de superfície da mesa do consultório com placa de contato contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol

Para a obtenção das amostras de instrumentos de tosa, as rascadeiras foram pressionadas sobre meios de cultivos, enquanto que as crostas e pêlos presentes nas lâminas das máquinas de tosa foram colhidas com auxílio de *swabs* estéreis e semeados (Fig. 2). As coletas foram realizadas ao final do expediente, com descanso dos instrumentos por 30 minutos, sem prévia utilização de produtos de limpeza. Todas as amostras foram semeadas em duplicata, em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e azeite de oliva e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel®)², sendo incubadas a 25°C por no mínimo 15 dias e a 37°C por cinco dias.

² Mycosel™ Ágar , Nova Jersey/EUA

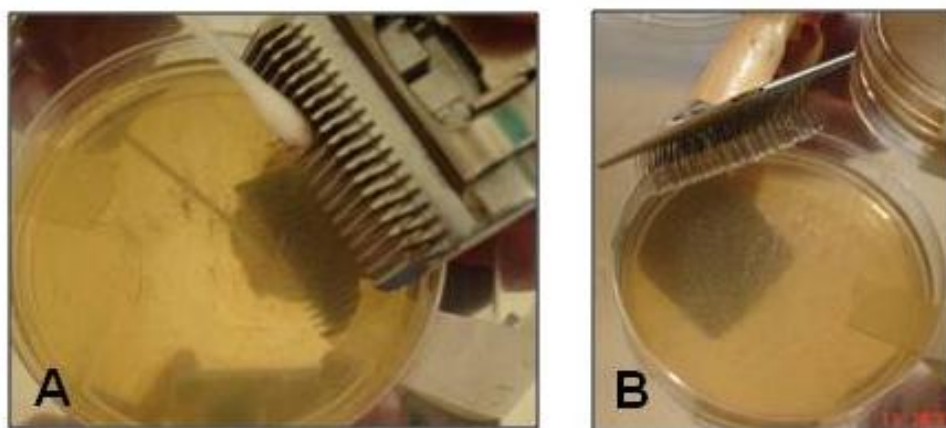


Figura 2 - Método de coleta de amostras dos equipamentos de tosa, lâmina da máquina de tosa (A) e rascadeira (B)

4.3 Identificação dos isolados fúngicos

4.3.1 Fungos filamentosos

Para a identificação das colônias filamentosas foram avaliadas características macro e micromorfológicas. Na macrocromorfologia observou-se textura, topografia, coloração do verso e reverso e velocidade de crescimento das colônias, bem como a presença de pigmento no meio de cultura. Enquanto que, na microscopia, através do exame direto com lactofenol azul de algodão entre lâmina e lamínula, observou-se o tipo e coloração das hifas e das estruturas de frutificação, caracterizadas pela presença de conidióforos com vesícula, métulas ou fiálides e conídios (LACAZ et al., 1998).

Quando a identificação das espécies fúngicas através da macro e micromorfologia das colônias não foi possível, realizou-se microcultivo entre lâminas para observações de estruturas completas de frutificação e ornamentação destes gêneros (RIDEEL, 1950).

Somente as colônias filamentosas compatíveis com o gênero *Aspergillus* foram identificadas nas amostras de superfície. Enquanto que, das amostras provenientes dos instrumentos de tosa foram pesquisados os fungos filamentosos do grupo dos dermatófitos. As demais colônias filamentosas não foram identificadas quanto ao gênero e espécie.

4.3.2 Fungos leveduriformes

As leveduras foram identificadas quanto às características do verso das colônias, bordas, consistência, coloração e textura. Para avaliação dos aspectos micromorfológicos foi realizado exame direto através de esfregaço dos cultivos corado pelo método de Gram com posterior visualização em aumento de 1000X com óleo de imersão. Para visualização da presença de cápsula dos isolados utilizou-se a coloração com tinta nanquim. Como testes complementares para identificação de gênero e espécie foram realizados a prova da catalase e urease, repique em ágar niger, prova do tubo germinativo e repique em ágar CHROMagar® *Candida*³. Este método cromogênico identifica as espécies de *Candida albicans*, ficando a colônia de coloração verde, *C. tropicalis* de coloração azul e *C. kruzei* e outras espécies de *Candida* spp tornam-se de coloração roxa.

Para a identificação das espécies de *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* foi utilizado o kit comercial de identificação automatizada API ID 32C⁴. A identificação das leveduras através deste sistema com leitura e interpretação automatizada foi realizada com a colaboração do Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita da Santa Casa – Complexo Hospitalar de Porto Alegre/RS, sob a supervisão do Dr. Luiz Carlos Severo.

Para identificação através do API ID32, as leveduras foram subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a 25°C por 24h. Os inóculos foram preparados em NaCl 0,85%, ajustados na escala 2 de McFarland no densitômetro. Cada poço da galeria contendo os açúcares foi preenchido com 135µl desta suspensão e após, identificadas com o número do isolado e realizada a incubação a 30°C (Fig. 3). A primeira leitura e interpretação automatizada através do aparelho ATB Expression™ foi realizada em 24h e quando não se obtinha uma excelente identificação da levedura em estudo, a galeria era novamente incubada e lida em 48 e/ou 72h.

³ DIFCO, Meylan Cedex/França

⁴ BioMérieux SA, Marcy l'Etoile/França

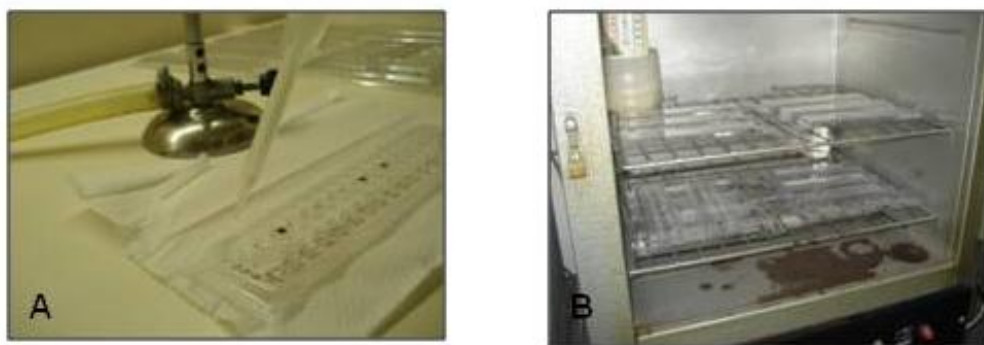


Figura 3 - Preenchimento da galeria com o inóculo fúngico para identificação de leveduras (A) e disposição das galerias (ID32C) na estufa a 30°C (B)

4.4 Teste de suscetibilidade de fungos filamentosos e leveduriformes frente a desinfetantes e antissépticos

O estudo da suscetibilidade *in vitro* de fungos frente a desinfetantes e antissépticos foi realizado de acordo com as normas do documento M38-A2 para fungos filamentosos e M27-A3 para leveduras do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), adaptado para agentes químicos. O teste foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, sendo utilizadas microplacas estéreis contendo 96 orifícios, as quais foram preenchidas com o inóculo fúngico e com os desinfetantes/antissépticos previamente diluídos e ajustados em caldo RPMI-1640⁵ adicionado de MOPS⁶. Todas as amostras foram testadas em duplicata frente aos desinfetantes/antissépticos.

4.4.1 Isolados e inóculos fúngicos

Todos os isolados fúngicos filamentosos e leveduriformes obtidos do ambiente hospitalar foram utilizados para a realização do estudo de suscetibilidade *in vitro*.

Para a preparação dos inóculos filamentosos, os isolados foram subcultivados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA)⁷ e incubados a 35° C por sete dias, obtendo-se culturas jovens e puras. Após o crescimento fúngico foi adicionado às culturas, 1 mL de salina estéril com 1% de Tween 20, em seguida os conídios e hifas foram coletados da superfície da colônia com auxílio de pipeta estéril e transferidos para um tubo de ensaio estéril. Decorrido o tempo de

⁵ Sigma Chemical Co. Steinheim, Alemanha

⁶ Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brasil

⁷ Neogen Acumedia®, Michigan/EUA

sedimentação de cinco minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio estéril, e então homogeneizado em agitador de tubos vórtex e sua concentração final foi ajustada a 5×10^4 UFC/mL, de acordo com escala de Mc Farland. Esta suspensão foi diluída a 1:50 em caldo RPMI-1640, alcançando duas vezes a concentração necessária, para ser adicionada a cada orifício da microplaca em volume igual ao do agente químico, conforme o protocolo padrão.

Para a produção dos inóculos leveduriformes, os isolados foram repicados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e incubados a 35°C por 48hs. Após o crescimento foi retirada uma alçada da colônia e transferida para um tubo de ensaio estéril contendo solução salina estéril, homogeneizado em agitador de tubos vórtex, e ajustado a concentração final de 5×10^6 UFC/mL, de acordo com a escala de Mc Farland. A partir desta concentração foi realizado uma diluição de 1:50 em salina estéril e, logo após, a diluição final de 1:20 em caldo RPMI-1640.

Para confirmação das concentrações dos inóculos foi realizada a técnica de Pour-plate em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

4.4.2 Preparação das diluições dos desinfetantes e antissépticos

Quatro desinfetantes/antissépticos comerciais foram utilizados no teste de microdiluição, sendo clorexidina-cetrimida⁸, hipoclorito de sódio⁹, cloreto de benzalcônio (amônia quartenária)¹⁰ e um derivado cloro-fenol (orto-benzil p-clorofenol 0,25% e orto-fenil fenol 0,50%)¹¹.

Foram preparadas seis diluições sucessivas dos quatro agentes químicos em log₂, utilizando-se caldo RPMI-1640 como diluente, os quais foram identificados como: HIP (hipoclorito), CB (cloreto de benzalcônio), CC (clorexidina-cetrimida) e CLO (derivado de cloro-fenol). As concentrações finais do CB, CLO e CC foram de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 vezes a concentração de uso recomendada pelo fabricante do produto, enquanto que HIP foi 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 vezes a concentração de uso indicada para os isolados filamentosos (XAVIER et al., 2007) e

⁸ Chemitec Agro-veterinária, São Paulo, Brasil

⁹ Indústria Anhembí S/A, São Paulo, Brasil

¹⁰ Acquacloro Química Desinfetante®, Fundação Simon Bolívar/Acqua Cloro Química, UFPel/ RS

¹¹ Colgate-Palmolive Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil

2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 vezes a concentração de uso para isolados leveduriformes.

4.4.3 Preenchimento das microplacas com os inóculos fúngicos e diluições dos agentes químicos

A primeira coluna das microplacas (coluna A) foi utilizada como controle de crescimento, sendo preenchida com 200 µL do inóculo e a última coluna (coluna H) correspondeu ao controle de esterilidade, onde os orifícios foram preenchidos com 200 µL da maior diluição do desinfetante. As demais colunas (colunas de B a G) foram preenchidas com 100 µL do inóculo e 100 µL da diluição do agente químico em sequência, da maior para menor diluição do produto.

4.4.4 Incubação das microplacas

As microplacas contendo inóculos fúngicos filamentosos e leveduriformes foram incubadas em estufa regulada a uma temperatura de 35° C, sendo a leitura visual dos resultados realizada após 72h.

4.4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela maior diluição do agente químico capaz de inibir o crescimento fúngico. Além disso, realizou-se a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), através de cultivo de 10µL de cada poço em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas as 35°C, durante cinco dias para fungos filamentosos e quatro dias para fungos leveduriformes.

Após os resultados obtidos, foram calculadas as concentrações inibitórias e fungicidas mínimas dos desinfetantes/antissépticos capazes de inibir 50 (CIM 50) e 90% (CIM 90) dos isolados filamentosos e leveduriformes testados.

4.5 Análise Estatística

Os dados referentes à contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) sofreram transformação logarítmica para adquirirem normalidade. As análises comparativas de contaminação anterior ao procedimento de limpeza foram feitas por

análise de variância e teste de Tukey. A análise do efeito limpeza/desinfecção foi realizada pelo teste t pareado, procedimentos realizados através do pacote estatístico Statistix 6.0.

As análises de frequência de isolamento foram realizados pelo método qui-quadrado, utilizando Epi info 6.

As análises das CIM e CFM capazes de inibir 50 e 90% dos isolados testados foram calculadas de acordo com Reed; Muench, 1937.

5 Resultados

5.1 Fungos em superfícies hospitalar

Do total de 520 amostras de superfície estudadas, 79% (411/520) foram positivas para fungos, sendo 52,5% (216/411) AD e 47,4% (195/411) PD.

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/cm²) filamentosas e leveduriformes com relação ao local de coleta demonstrou diferenças significativas entre a sala de internação e sala cirúrgica antes da desinfecção (tab. 2). Assim, observou-se que a sala de internação foi o ambiente com maior contaminação fúngica antes da desinfecção enquanto que a sala cirúrgica foi a menos contaminada.

Tabela 2 - Média das UFC/cm² dos locais coletados em relação à contaminação fúngica antes e depois da desinfecção

LOCAL ANALISADO	MÉDIA	MÉDIA
	AD	PD
	(UFC/cm ²)	(UFC/cm ²)
Sala de internação	31,54 ^{a,A}	26,25 ^A
Sala do consultório	15,47 ^{a,b,A}	9,24 ^A
UTI	11,44 ^{a,b,A}	15,19 ^A
Sala de cirurgia	8,04 ^{b,A}	4,85 ^A

*Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença estatística, letras maiúsculas nas linhas e minúsculas na coluna com p>0,05

AD – antes da desinfecção

PD – após a desinfecção

A análise das médias das UFC/cm² dos ambientes do hospital veterinário demonstrou uma redução de 20,5% da contaminação fúngica após a desinfecção. As médias das UFCs foram de 14,5UFC/cm² antes da desinfecção e 11,5UFC/cm² após a desinfecção, não apresentando diferença estatística.

Quanto à análise das superfícies, observou-se que a baia era a superfície mais contaminada antes da desinfecção, enquanto que a calha apresentou menor contaminação (tab. 3). Além disso, observou-se que a contaminação fúngica em UFC/cm² aumentou significativamente após a desinfecção na superfície da calha (p=0,0022), enquanto que, nas mesas de atendimento, de instrumental e cirúrgica ocorreu diminuição da contaminação (p=0,026).

Tabela 3 – Comparação das médias da contaminação fúngica das superfícies antes e depois da desinfecção

SUPERFÍCIE ANALISADA	MÉDIA AD	MÉDIA PD
	(UFC/cm ²)	(UFC/cm ²)
Baia	71,47 ^{a,A}	66,79 ^A
Mesa	22,34 ^{a,b,A}	5,42 ^B
Parede	17,30 ^{a,b,A}	13,57 ^A
Armário	15,03 ^{a,b,c,A}	13,14 ^A
Mesa de instrumental	11,14 ^{a,b,c,A}	3,93 ^B
Torneira	6,17 ^{b,c,A}	3,71 ^A
Calha	2,00 ^{c,A}	8,92 ^B

*Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença estatística, letras maiúsculas nas linhas e minúsculas na coluna com p=0,0001

AD – antes da desinfecção

PD – após a desinfecção

5.2 Caracterização dos isolados fúngicos

Os isolados de *Aspergillus* spp. foram caracterizados de acordo com as características macro e micromorfológicas das colônias obtidas a 25°C, sendo identificados *A. niger* (n= 2), *A. fumigatus* (n= 50) e *A. flavus* (n= 45) (Fig. 4).

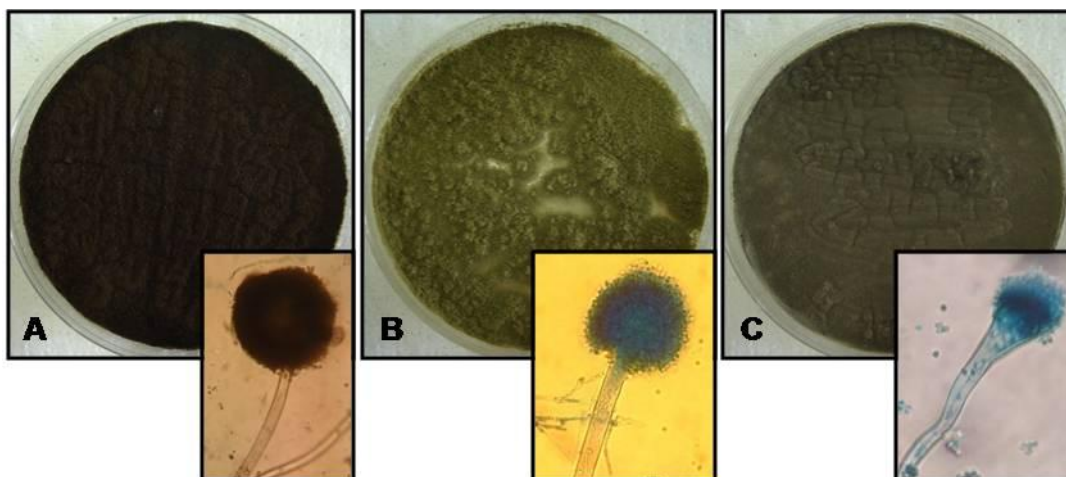


Figura 4 - Aspecto macro e microscópico dos isolados de *A. niger* (A), *A. flavus* (B) e *A. fumigatus* (C) identificados nas amostras provenientes das superfícies hospitalares

Os isolados leveduriformes dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* apresentavam colônias de consistência cremosa a mucóide, textura lisa a rugosa e coloração branca a creme (Fig. 5).

Quanto aos isolados leveduriformes pertencentes ao gênero *Candida*, a prova do tubo germinativo resultou em negativa para todos isolados testados, indicando a inexistência da espécie *C. albicans*. Assim, 67 isolados foram caracterizados como *C. famata* (n=4), *C. guilliermondii* (n=12), *C. glabrata* (n=1), *C. catenulata* (n=4), *C. lipolytica* (n=1), *C. parapsilosis* (n=5) e *Candida* sp. (n= 39) apresentavam colônias leveduriformes de diferentes texturas e colorações. Dessa forma, *Candida* sp., *C.famata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* possuíam colônias de coloração branca, lisa e cremosa, enquanto que *C. catenulata* apresentava coloração creme, rugosa e cremosa. Já *C. lipolytica* possuía coloração branca e rugosa. Microscopicamente, através da coloração de gram, as colônias eram caracterizadas por blastoconídios que variavam de esféricos a ovalados.

Os isolados do gênero *Cryptococcus* pertenciam às espécies *C. uniguttulatus* e *C. laurentii* e apresentavam colônias de coloração creme e consistência cremosa (*C. uniguttulatus*) ou mucóide (*C. laurentii*). Os isolados foram subcultivados em ágar niger, porém as colônias não apresentaram pigmentação marrom, característica da produção de melanina. Microscopicamente, através da coloração de gram a espécie *C. unigutulattus* apresentava blastoconídios esféricos enquanto que *C. laurentii* apresentava blastoconídios ovalados. No exame direto

com tinta nanquim foi observada a presença de cápsula de tamanho variável em ambas as espécies.

Quanto ao gênero *Trichosporon* foram identificadas as espécies *T. asahii* e *T. mucoides*, as quais apresentavam colônias de coloração creme e textura rugosa e mucóide, respectivamente. Microscopicamente, as colônias eram caracterizadas por grande número de artroconídios hialinos.

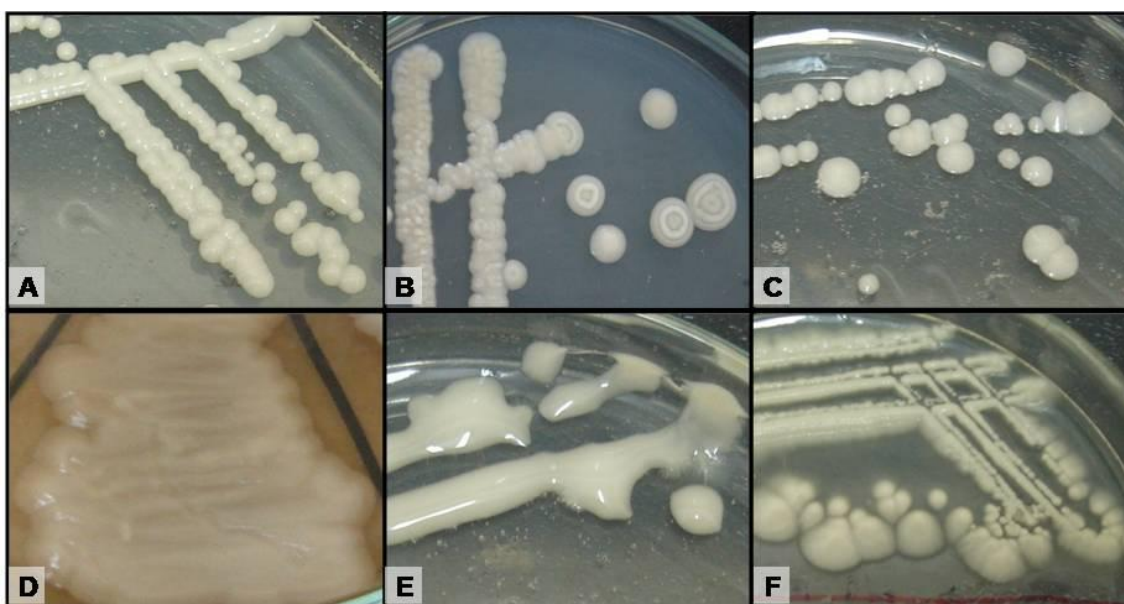


Figura 5 - Aspectos macromorfológicos das colônias de *Candida guilliermondii* (A), *Candida lipolytica* (B), *Cryptococcus uniguttulatus* (C) e *Cryptococcus laurentii* (D), *Trichosporon asahii* (E) e *Trichosporon mucoides* (F) em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 35°C, isoladas da superfície hospitalar veterinária

Malassezia pachydermatis foi identificada através das características macro e microscópicas, crescimento em meio sem azeite de oliva e positividade nas provas da catalase e da urease. As colônias apresentavam coloração creme, textura consistente e topografia convexa. Na microscopia foram observadas células ovais com ou sem brotamento unipolar de base larga com formato de “pino de boliche” e ausência de hifas ou pseudohifas.

Os isolados do gênero *Rhodotorula* demonstraram positividade na prova da urease e foram identificados como *R. mucilaginosa* e *Rhodotorula* spp., os quais apresentavam colônias de coloração laranja-avermelhadas a salmão com textura lisa e rugosa, respectivamente (Fig. 6).



Figura 6 - Diferenças macromorfológicas das colônias de *Rhodotorula mucilaginosa* (A) e *Rhodotorula* spp. (B) em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 35°C

As colônias filamentosas compatíveis com *S. schenckii* apresentavam aspecto membranoso, rugoso, de coloração inicialmente creme passando a enegrecidas após sete dias de incubação a 25°C. Microscopicamente foram observadas hifas finas, hialinas, ramificadas e septadas, com numerosos conídios hialinos e piriformes ao redor das hifas e presença de conidióforo com conídios ao seu redor conferindo a forma de “margarida” (Fig. 7). A confirmação do dimorfismo foi obtida pelo crescimento do fungo em caldo infusão cérebro-coração (BHI) a 37°C, caracterizado microscopicamente, por células ovais e alongadas.

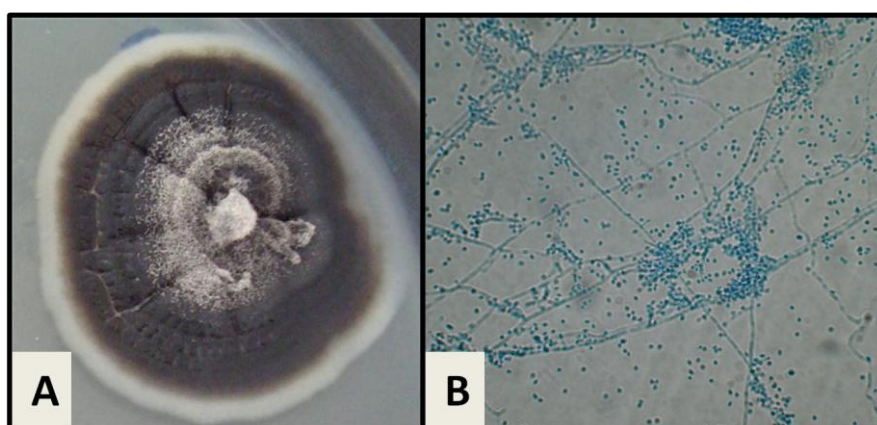


Figura 7 - Aspectos macro (A) e micromorfológicos (B) da forma filamentosa do fungo *Sporothrix schenckii* isolado da superfície do armário do hospital veterinário

Os isolados leveduriformes com características macro e micromorfológicas semelhantes foram estudados no meio comercial CHROMagar® *Candida* e demonstraram colorações não compatíveis com a descrição do fabricante, como por exemplo, segundo o fabricante, a coloração azul corresponde a isolados de *Candida tropicalis* e no presente estudo, isolados de *C. guilliermondii*, *T. asahii* e *T. mucoides* apresentaram essa coloração (Fig. 8 e tab. 4).

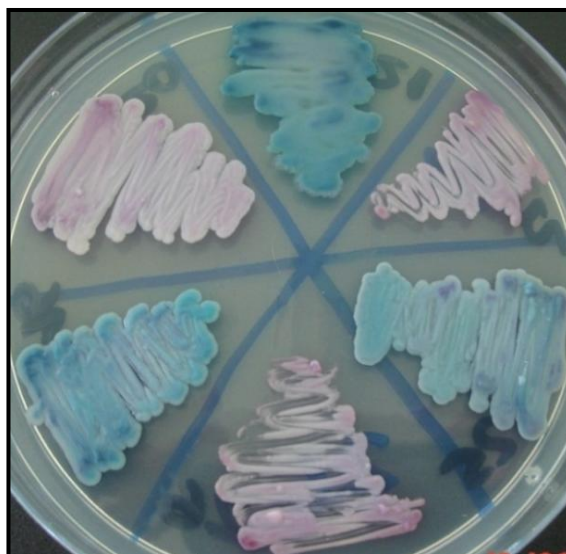


Figura 8 - Colônias leveduriformes em meio CHROMágar *Candida*®, com coloração roxa identificadas como *C. kruzei* e a coloração azul como *C. tropicalis*

Tabela 4 - Identificação das leveduras isoladas das superfícies hospitalares e dos instrumentos de tosa através de dois métodos distintos

GÊNERO	API ID 32C®	Coloração em CHROMagar® Candida
<i>Candida</i>	<i>catenulata</i> (n=4)	Azul* [†]
	<i>guilliermondii</i> (n=12)	Roxo (n=11) ^{††} , azul (n=1)
	<i>parapsilosis</i> (n=6)	Roxo*
	<i>famata</i> (n=4)	Roxo*
	<i>glabrata</i> (n=1)	Roxo
	<i>lipolytica</i> (n=1)	Roxo
	<i>Candida</i> sp (n=1)	Azul esverdeada
<i>Trichosporon</i>	<i>asahii</i> (n=3)	Roxo (n=1), azul (n=1), verde (n=1) ^{†††}
	<i>mucoides</i> (n=1)	Azul
<i>Cryptococcus</i>	<i>uniguttulatus</i> (n=3)	Roxo*
	<i>laurentii</i> (n=1)	Roxo

* : todos isolados apresentaram a mesma coloração no meio CHROMagar® Candida

[†] : *Candida tropicalis*

^{††} : *C. krusei* e outras espécies

^{†††} : *C. albicans*

5.3 Isolamento fúngico em superfície hospitalar

5.3.1 Isolamento fúngico antes da desinfecção

Das 216 amostras AD positivas para isolamento fúngico, 192 resultaram no crescimento de fungos filamentosos, sendo identificado o gênero *Aspergillus* em 29,2% (56/192) destas. O crescimento de fungos leveduriformes ocorreu em 11,1% (24/216) das amostras, sendo pertencentes aos gêneros *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*.

Das 56 amostras positivas para o gênero *Aspergillus*, duas foram caracterizadas como *A. niger*, 27 *A. flavus* e 27 *A. fumigatus*. Este gênero foi frequentemente isolado da sala do consultório, sendo que o maior número de isolados foi obtido da mesa de atendimento (tab. 5 e Fig. 9).

Tabela 5 - Amostras positivas para *Aspergillus* spp. nos diferentes ambientes de estudo antes da desinfecção

Local	Amostras positivas (%)
UTI (n= 128)	13 ^{a,b} (10,2%)
Consultório (n= 128)	23 ^a (18%)
Cirurgia (n= 136)	12 ^b (8,9%)
Internação (n= 128)	8 ^b (6,3%)
Total	56

a,b,c – letras iguais não apresentam diferença estatística entre as médias ($p=0,009$)

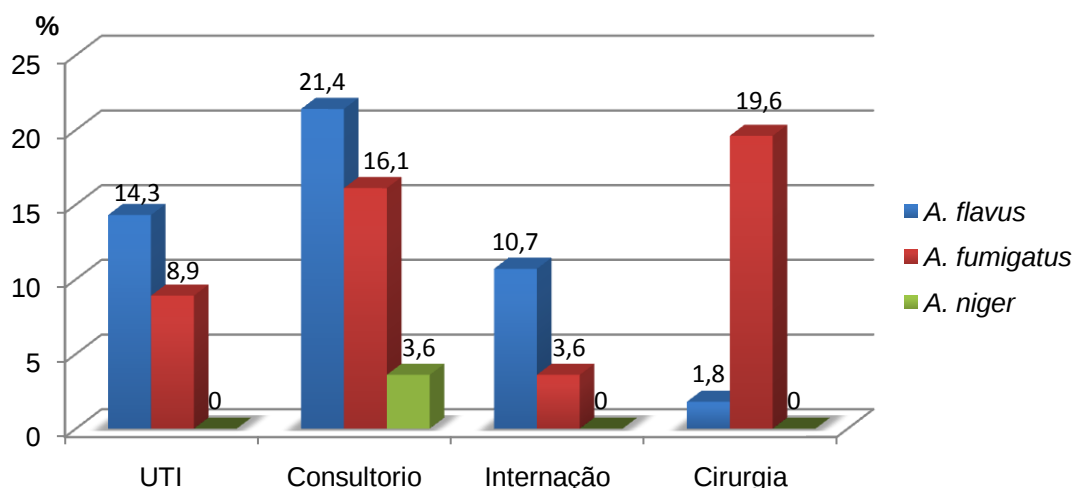


Figura 9 - Frequência de espécies de *Aspergillus* nos diferentes ambientes hospitalares antes da desinfecção.

Das 24 amostras na qual se obteve isolamento de leveduras, 13 eram pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, seis *Candida* spp., duas *Malassezia* spp. e três *Cryptococcus* spp. A maior frequência de isolamento leveduriforme foi da sala da internação, sendo que o maior número de isolados foi obtido da superfície da baia (Fig. 10).

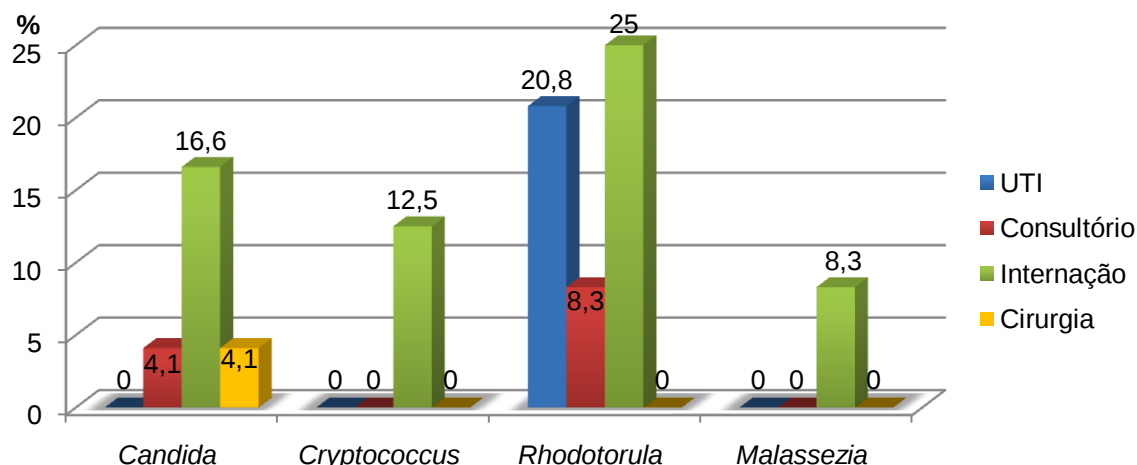


Figura 10 - Frequência de leveduras isoladas nos diferentes ambientes hospitalares antes da desinfecção

Com relação ao gênero *Candida* foram identificadas as espécies *C. guilliermondii* (2), *C. parapsilosis* (1), *C. glabrata* (1), *C. catenulata* (1) e *Candida* sp (1), as quais foram isoladas em todos ambientes do hospital veterinário com exceção da sala da UTI.

Os gêneros *Cryptococcus* e *Malassezia* foram isolados apenas na sala de internação, sendo a espécie *C. uniguttulatus* (3) proveniente das superfícies das baias e torneira e, *M. pachydermatis* (2) das superfícies das baias e paredes.

As leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* foram identificadas como *R. mucilaginosa* (1) e *Rhodotorula* spp. (12), sendo isoladas em todos os ambientes estudados e na maioria das superfícies, com exceção da sala cirúrgica.

5.3.2 Isolamento fúngico após a desinfecção

Das 195 amostras PD positivas para fungos, 143 destas resultaram no crescimento de fungos filamentosos, sendo identificado o gênero *Aspergillus* em 28,7% (41/143). O crescimento de fungos leveduriformes ocorreu em 26,2% (51/195) das amostras, sendo pertencentes aos gêneros *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Cryptococcus*. Também foi isolado em 0,5% (1/195) das amostras o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*.

Das 41 amostras pertencentes ao gênero *Aspergillus*, 18 foram caracterizadas como *A. flavus* e 23 *A. fumigatus* (Fig. 11). Este gênero foi isolado com maior frequência na sala da internação, onde o armário apresentou maior número de isolados fúngicos.

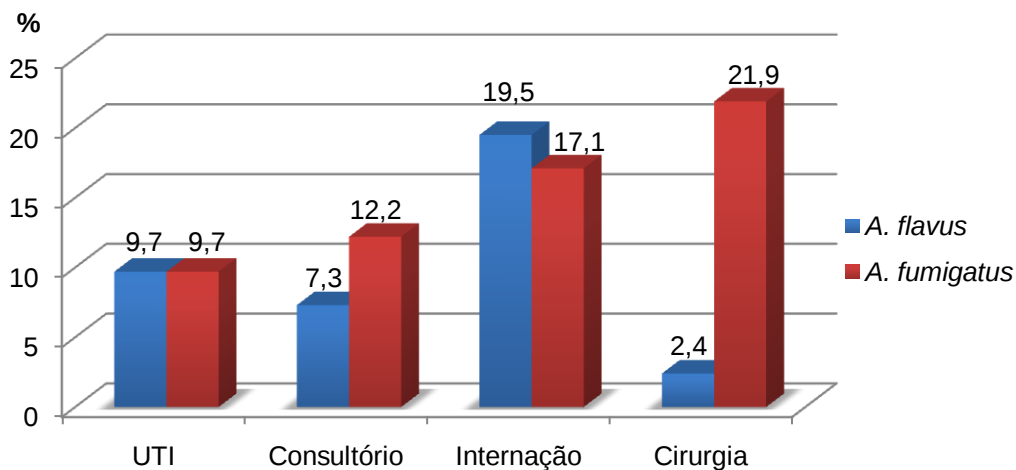


Figura 11 - Frequência de espécies de *Aspergillus* nos diferentes ambientes hospitalares estudados depois da desinfecção

As 51 amostras de leveduras resultaram na identificação de 34 isolados do gênero *Candida*, 11 *Rhodotorula* spp., dois *Cryptococcus* spp, duas *Malassezia* spp e dois *Trichosporon* spp. Estes fungos leveduriformes foram isolados com maior frequência na internação, sendo que na baia houve maior número de isolados (Fig. 12).

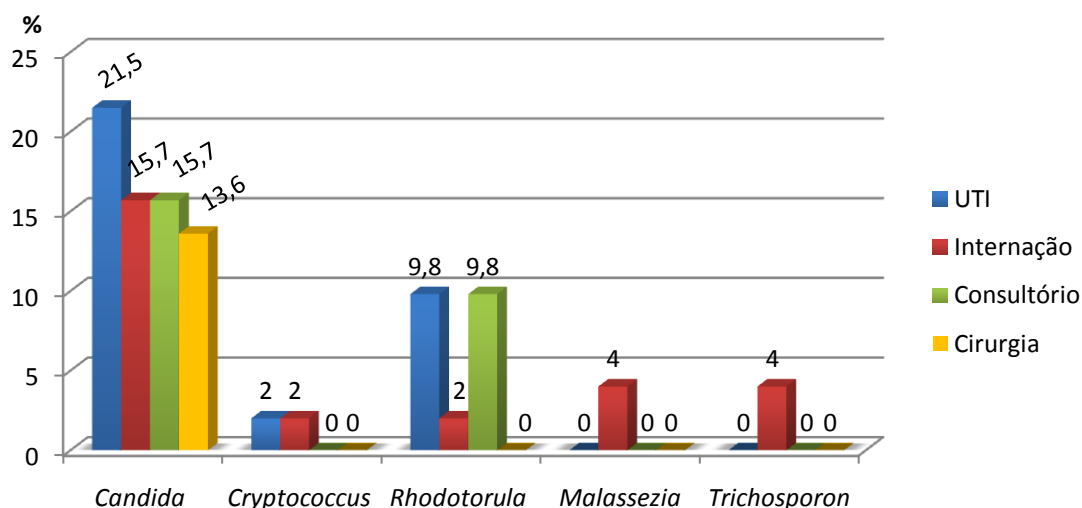


Figura 12 - Frequência de leveduras isoladas nos diferentes ambientes hospitalares depois da desinfecção

Os isolados do gênero *Candida* foram identificadas como *C. guilliermondii* (5), *C. famata* (3), *C. catenulata* (1) e *Candida* spp. (25), sendo a espécie *C. guilliermondii* a mais frequentemente isolada nas amostras, encontrada em todos os ambientes pesquisados.

As espécies de *Cryptococcus* identificadas como *C. laurentii* (1) e *C. uniguttulatus* (1) foram isoladas nas superfícies das baias da UTI e da sala de internação.

A única espécie isolada do gênero *Malassezia* foi *M. pachydermatis* (2), sendo somente encontrada nas superfícies das baias e paredes da sala de internação.

Com relação ao gênero *Rhodotorula*, foi possível a identificação de *R. mucilaginosa* (1) permanecendo o restante, como *Rhodotorula* spp (10). Estas leveduras foram isoladas em todos os ambientes estudados, com exceção da sala cirúrgica.

O gênero *Trichosporon* foi identificado somente na superfície da torneira e baias da sala de internação, sendo caracterizado como *T. mucoides* (1) e *T. asahii* (1).

O único fungo dimórfico isolado foi *Sporothrix schenckii*, o qual foi obtido a partir da superfície do armário na sala da UTI.

5.4 Isolamento fúngico em instrumentos de tosa

O isolamento de fungos foi obtido em 38,7% (58/150) das amostras, dos quais 58,6% (34/58) eram provenientes da lâmina da máquina de tosa e 41,4% (24/58) da rascadeira, o que resultou na obtenção de 78 isolados leveduriformes uma vez que não foram isolados fungos filamentosos pertencentes ao grupo dos dermatófitos (tab. 6).

Tabela 6 - Número de amostras positivas para fungos, de acordo com o local e instrumentos de tosa

LOCAIS DE COLETA	LÂMINA (n=80)	RASCADEIRA (n=70)	TOTAL
Hospital (n=10)	7 ^a	-	7
Clínicas (n=40)	5 ^b	9 ^a	14
Consultórios (n=40)	9 ^b	7 ^a	16
Pet Shops (n=60)	13 ^b	8 ^a	21
TOTAL	34 (p=0,002)	24 (p=0,49)	58

a,b,c – letras iguais não apresentam diferença estatística entre as médias

Dos 78 isolados fúngicos obtidos, 27 pertenciam ao gênero *Candida*, 37 ao gênero *Malassezia*, dois ao gênero *Trichosporon* e 12 ao gênero *Rhodotorula*. Quanto ao local de estudo obteve-se o isolamento das leveduras do gênero *Candida* e *Malassezia* em todos os locais, enquanto que o gênero *Trichosporon* foi isolado somente nas amostras provenientes de clínica veterinária e o gênero *Rhodotorula* de pet shop e consultório veterinário (tab 7).

Tabela 7 - Isolados leveduriformes, de acordo com o local de estudo

GÊNERO FÚNGICO	HOSPITAL	CLÍNICAS	CONSULTÓRIOS	PET SHOPS
<i>Candida</i>	11	10	2	4
<i>Trichosporon</i>	-	2	-	-
<i>Rhodotorula</i>	-	-	8	4
<i>Malassezia</i>	1	12	10	14
TOTAL	12	24	20	22

Quando considerado o instrumento de tosa, o gênero *Malassezia* foi o mais isolado tanto a partir das amostras da lâmina da máquina de tosa quanto nas amostras da rascadeira, enquanto que, o gênero *Trichosporon* foi isolado somente nas amostras da rascadeira (Fig. 13).

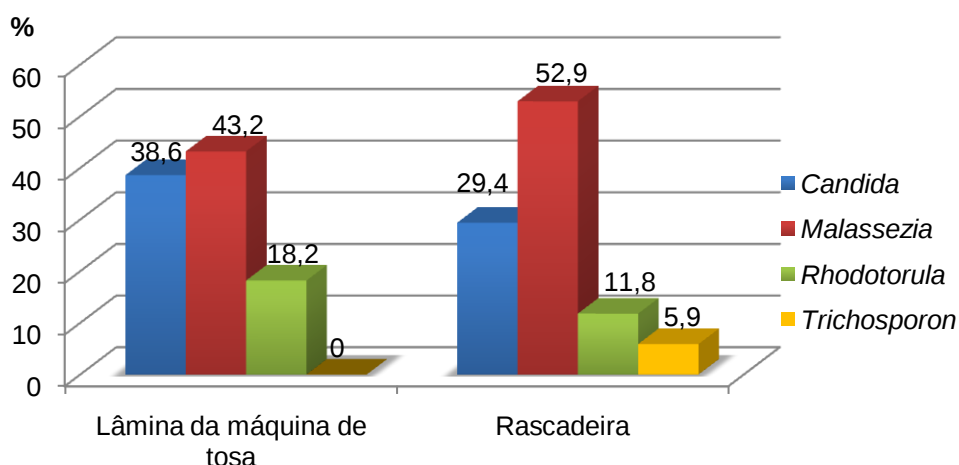


Figura 13 - Frequência de isolamento de leveduras dos gêneros *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* em instrumentos de tosa

As espécies do gênero *Candida* foram identificadas como *C. parapsilosis* (5), *C. lipolytica* (1), *C. catenulata* (2), *C. guilliermondii* (5), *C. famata* (1) e *Candida* spp (13). Enquanto que no gênero *Trichosporon* foi identificada apenas a espécie *T. asahii* (2), assim como no gênero *Malassezia* que foi *M. pachydermatis* (37) e 12 isolados do gênero *Rhodotorula*.

5.5 Teste de suscetibilidade *in vitro*

5.5.1 Isolados fúngicos filamentosos

Para a preparação dos inóculos fúngicos de *Aspergillus* spp. utilizou-se 18 isolados, sendo sete *A. flavus*, nove *A. fumigatus* e dois *A. niger*.

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) obtidas dos isolados de *Aspergillus* spp. frente aos quatro desinfetantes/antissépticos variaram de $\leq 1,25$ a $> 160 \mu\text{l/mL}$ e $\leq 1,25$ a $80 \mu\text{l/mL}$, respectivamente (tab. 8). A CFM de seis isolados não foi realizada, devido ao crescimento na diluição mais concentrada do agente químico.

Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de isolados de *Aspergillus* spp. frente a clorexidina-cetrimida (CC), hipoclorito de sódio (HIP), derivado de cloro-fenol (CLO) e cloreto de benzalcônio (CB)

ESPÉCIE	CC (CI: 66,7 $\mu\text{l/mL}$)		HIP (CI: 40 $\mu\text{l/mL}$)		CLO (CI: 30 $\mu\text{l/mL}$)		CB (CI: 20 $\mu\text{l/mL}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>A. flavus</i> n=7	$\leq 4,2$	4,2 - 8,3	40-160	40-160	3,75-30	7,5-30	1,25-20	2,5-20
<i>A. fumigatus</i> n=9	$\leq 4,2$	4,2-8,3	40-160	40-160	3,75-15	7,5-30	1,25-5	1,25-5
<i>A. niger</i> n=2	$\leq 4,2$	4,2	40-160	40-160	3,75-15	15-30	2,5	2,5

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

CI: Concentração de uso indicada pelo fabricante do desinfetante

A clorexidina-cetrimida, cloreto de benzalcônio e derivado de cloro-fenol foram eficazes em todos os isolados, com concentração inibitória mínima menor que a indicada pelo fabricante, exceto em uma cepa de *A. flavus*, a qual foi inibida na concentração de uso do cloreto de benzalcônio e derivado de cloro-fenol. O hipoclorito foi ineficaz em 33,3% dos isolados de *A. fumigatus*, 42,8% de *A. flavus* e 50% de *A. niger*, ocorrendo crescimento na concentração de uso indicada pelo fabricante e na maior concentração testada (Fig. 14).

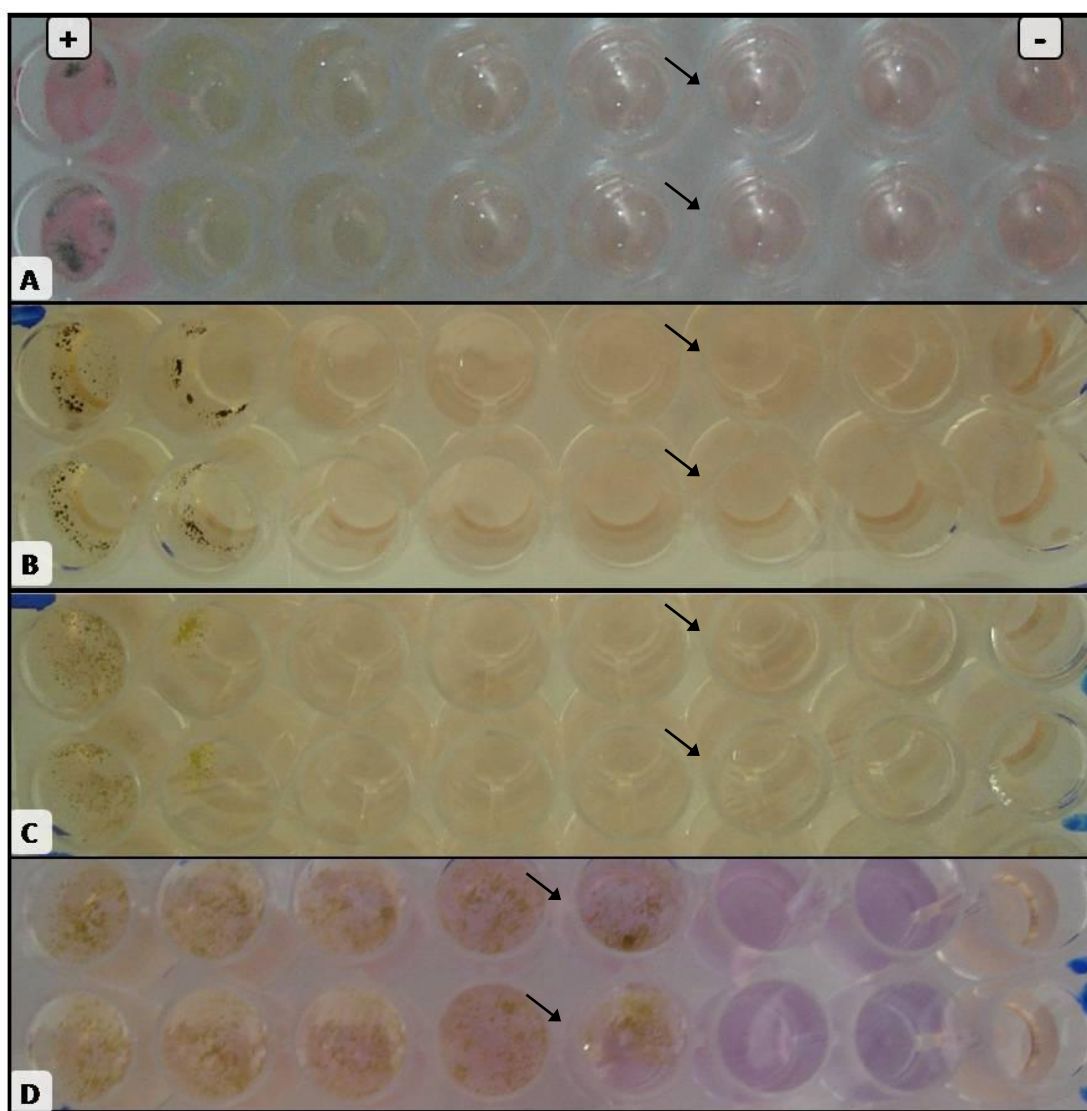


Figura 14 - Antifungigrama através da técnica de microdiluição em caldo de *Aspergillus fumigatus* frente a clorexidina-cetrimida (A); *A.niger* frente a derivado de cloro-fenol (B), *A. flavus* frente ao cloreto de benzalcônio (C) e *A. flavus* frente ao hipoclorito de sódio (D). +: controle de crescimento, -: controle de esterilidade. Poços da esquerda para direita correspondem a maior para menor diluição do desinfetante, (seta – concentração de uso).

As concentrações inibitórias e fungicidas mínimas dos desinfetantes/antissépticos capazes de inibir 50 e 90% dos isolados de *Aspergillus* spp. provenientes da superfície do ambiente veterinário observados neste estudo estão descritas na tab. 9, sendo que apenas o hipoclorito de sódio necessitou de quatro vezes a concentração de uso para inibir 90% dos isolados testados.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de cada desinfetante testado frente a *Aspergillus* spp. isolados de ambiente veterinário

DESINFETANTE	CIM ($\mu\text{L/mL}$)		CFM ($\mu\text{L/mL}$)	
	50%	90%	50%	90%
Cloreto de benzalcônio (CI- 20 $\mu\text{L/mL}$)	1,90	4,2	2,2	4,9
Derivado de cloro-fenol (CI- 30 $\mu\text{L/mL}$)	5,3	11,3	7,5	18,2
Hipoclorito de sódio (CI- 40 $\mu\text{L/mL}$)	55	>160	72,9	>160
Clorexidina-cetrimida (CI- 66,7 $\mu\text{L/mL}$)	<4,2	<4,2	<4,2	7

CI: Concentração de uso indicada pelo fabricante do desinfetante

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

5.5.2 Isolados fúngicos leveduriformes

Para a preparação dos inóculos leveduriformes foram utilizados 14 isolados do gênero *Candida*, quatro do gênero *Cryptococcus*, dois do gênero *Trichosporon* e quatro do gênero *Rhodotorula*.

A concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima obtidas dos isolados leveduriformes frente aos quatro desinfetantes e antissépticos variaram de $\leq 1,25$ a 40 $\mu\text{L/mL}$ (tab. 10).

Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de isolados de leveduras frente a clorexidina-cetrimida (CC), hipoclorito de sódio (HIP), derivado de cloro-fenol (CLO) e cloreto de benzalcônio (CB)

ESPÉCIE	CC (CI: 66,7µl/mL)		HIP (CI: 40µl/mL)		CLO (CI: 30µl/mL)		CB (CI: 20µl/mL)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida parasilosis</i> n=1	<4,2	< 4,2	40	40	7,5	7,5	< 1,25	< 1,25
<i>Candida glabrata</i> n=1	< 4,2	< 4,2	40	40	3,75	3,75	< 1,25	2,5
<i>Candida catenulata</i> n=2	< 4,2	< 4,2	20-40	20-40	1,9-3,75	1,9-3,75	< 1,25	1,25-2,5
<i>Candida guilliermondii</i> n=7	4,2 – 8,3	4,2-8,3	10-40	20-40	1,9-7,5	1,9-7,5	1,25-5	1,25-5
<i>Candida famata</i> n=3	4,2-16,7	4,2-16,7	20-40	20-40	1,9-7,5	1,9-15	< 1,25	< 1,25
<i>Candida sp.</i> n=1	< 4,2	< 4,2	40	40	3,75	3,75	< 1,25	< 1,25
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> n=3	4,2-16,7	4,2-16,7	10-20	10-40	3,75-15	3,75-15	2,5-5	2,5-5
<i>Cryptococcus laurentii</i> n=1	8,3	8,3	40	40	15	15	2,5	2,5
<i>Trichosporon asahii</i> n=1	< 4,2	< 4,2	40	40	< 1,9	< 1,9	< 1,25	< 1,25
<i>Trichosporon mucoides</i> n=1	< 4,2	< 4,2	40	40	< 1,9	< 1,9	< 1,25	< 1,25
<i>Rhodotorula sp</i> n=2.	< 4,2	< 4,2	20-40	20-40	1,9-3,75	1,9-3,75	< 1,25	< 1,25
<i>Rhodotoula mucilaginosa</i> n=2	< 4,2	< 4,2	40	40	1,9-3,75	1,9-3,75	< 1,25	< 1,25

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

CI: Concentração de uso indicada pelo fabricante do desinfetante

A clorexidina-cetrimida, cloreto de benzalcônio e derivado de cloro-fenol foram eficazes em todos os isolados leveduriformes, com concentração inibitória mínima menor que a indicada pelo fabricante. No entanto, observou-se crescimento fúngico na concentração de uso do hipoclorito de sódio em 64% dos isolados leveduriformes pertencentes às espécies *C. famata* (1), *C. catenulata* (1), *C. parapsilosis* (1), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (5), *Candida sp* (1), *Trichosporon asahii* (1), *T. mucoides* (1), *Cryptococcus laurentii* (1), *Rhodotorula sp* (1) e *Rhodotorula mucilaginosa* (2) (Fig.15 e 16).

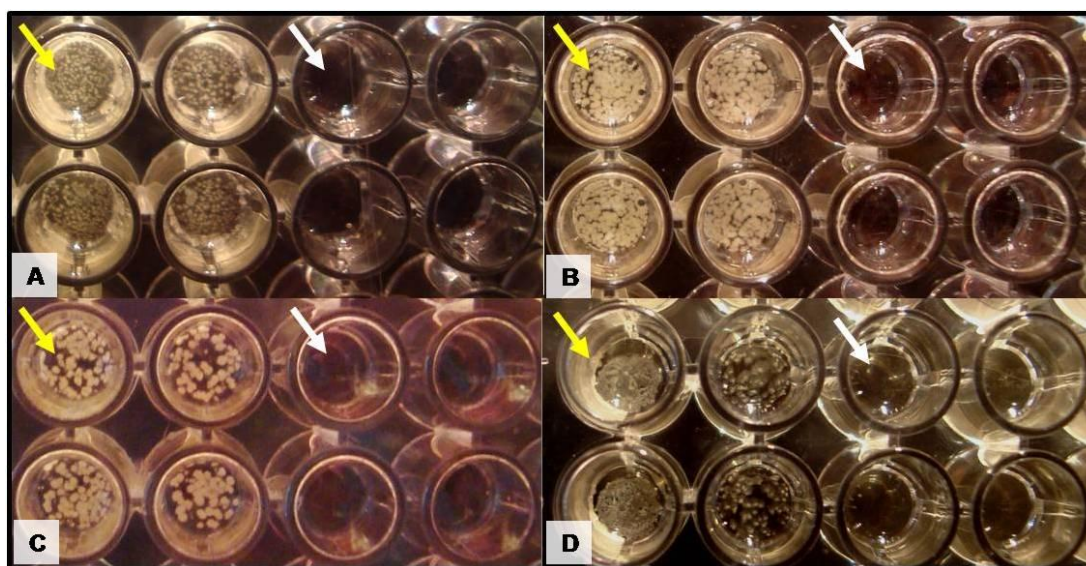


Figura 15 - Antifungigrama através da técnica de microdiluição em caldo com hipoclorito de sódio frente a *Trichosporon asahii* (A), *Candida glabrata* (B), *C. parapsilosis* (C), *C. famata* (D), demonstrando poço com crescimento (seta amarela) e sem crescimento (seta branca)

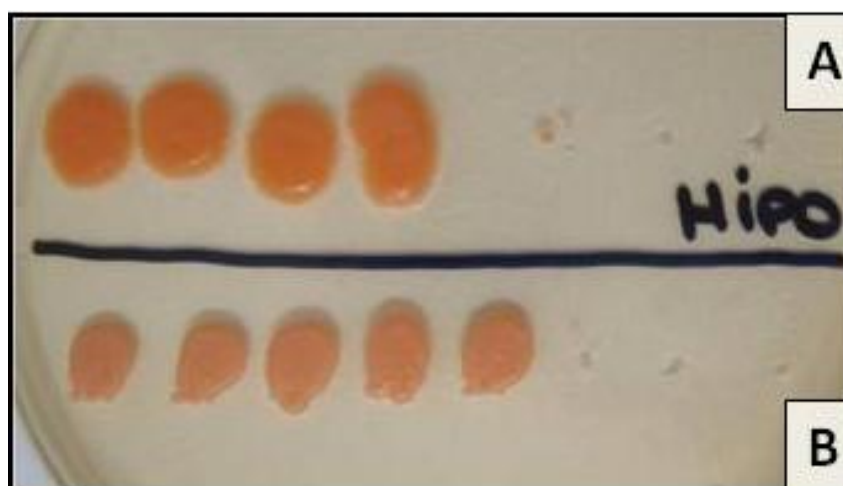


Figura 16 – Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do hipoclorito de sódio frente aos isolados de *Rhodotorula* spp. (A) e *Rhodotorula mucilaginosa* (B)

As concentrações inibitórias e fungicidas mínimas dos desinfetantes/antissépticos capazes de inibir 50 e 90% dos isolados leveduriformes provenientes da superfície do ambiente veterinário observados neste estudo estão descritas na tab. 11, sendo que todos os desinfetantes/antissépticos testados foram eficazes nas concentrações de uso indicadas pelo fabricante. O crescimento das

leveduras ocorreu no controle positivo e nas concentrações inferiores a de uso da clorexidina-cetrimida, cloreto de benzalcônio (Fig. 17) e derivado de cloro-fenol.

Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de cada desinfetante testado frente as leveduras isoladas de ambiente veterinário

DESINFETANTE	CIM ($\mu\text{L/mL}$)		CFM ($\mu\text{L/mL}$)	
	50%	90%	50%	90%
Cloreto de benzalcônio (CI- 20 $\mu\text{L/mL}$)	1,2	2,8	1,3	2,9
Derivado de cloro-fenol (CI- 30 $\mu\text{L/mL}$)	2,7	5,8	2,8	5,9
Hipoclorito de sódio (CI- 40 $\mu\text{L/mL}$)	23,8	36,1	23,1	35,8
Clorexidina-cetrimida (CI- 66,7 $\mu\text{L/mL}$)	7	3,7	7	3,7

CI: Concentração de uso indicada pelo fabricante do desinfetante

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

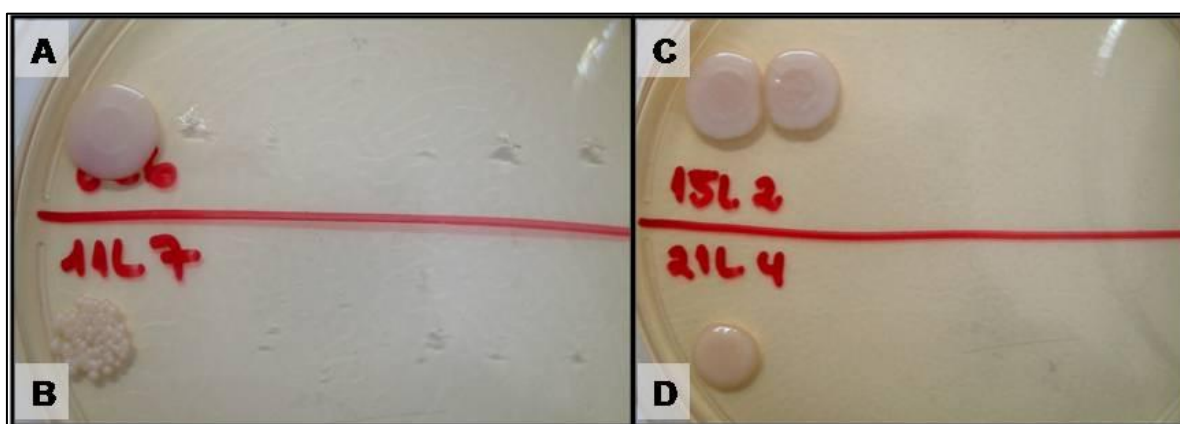


Figura 17 – Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) da clorexidina-cetrimida frente aos isolados de *Candida famata* (A) e *Candida guilliermondii* (B) e cloreto de benzalcônio frente aos isolados de *Candida guilliermondii* (C) e *Trichosporon mucoides* (D)

6 Discussão

Nos últimos anos, os estudos sobre a presença de fungos nos mais variados tipos de ambientes aumentaram, principalmente em hospitais, pois os pacientes internados nestes locais estão vulneráveis a diversas infecções oportunistas por microrganismos com potenciais patogênicos (MARTINS-DINIZ et al., 2005; COUTINHO et al., 2007; MENDONZA et al., 2007). Assim, um estudo realizado sobre a desinfecção de leitos de um hospital, utilizando a mesma técnica de placas de contato empregada no presente estudo, constatou a presença de fungos em 219 amostras antes e 180 amostras após a desinfecção destes (ANDRADE; ANGERAMI; PADOVANI, 2000). Números muito semelhantes foram obtidos no presente estudo, com redução de 20,5% da contaminação fúngica após a desinfecção, no entanto, sem ocorrer significância estatística.

Em outro estudo sobre a presença de *Staphylococcus aureus* em 52 enfermarias utilizando fitas adesivas estéreis em superfícies observou-se presença desta bactéria em 50% das amostras (CARVALHO, 2005). Em nosso estudo, esta técnica foi empregada para coletar a torneira das salas do hospital veterinário e comparada esta com outras superfícies amostradas tendo demonstrado eficácia para isolamento fúngico, demonstrada na tab. 4.

Os gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Malassezia* e *Cryptococcus* foram isolados tanto antes quanto após a desinfecção das salas do hospital veterinário. Entretanto, *Trichosporon* spp e *Sporothrix schenckii* foram isolados apenas depois da desinfecção, podendo ter ocorrido a contaminação através das secreções das lesões de um felino com esporotricose internado no hospital. Martins-

Diniz et al. (2005) realizaram um estudo sobre o monitoramento de fungos em hospital humano, no qual foi isolado do ambiente o gênero *Aspergillus*, enquanto que, nas mãos de profissionais de saúde e mobiliário foram isolados *Candida* spp e *Trichosporon* spp, destacando a importância destes fungos em ambientes críticos, bem como o controle da desinfecção destes locais e dos profissionais de saúde.

No presente estudo foram isoladas as espécies *Candida glabrata*, *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. parapsilosis* e *C. lipolytica*, as quais ainda não haviam sido isoladas de ambiente hospitalar veterinário, sendo este o primeiro relato. Embora estas espécies não estejam relacionadas a doenças em animais, são consideradas potencialmente patogênicas ou oportunistas e com crescentes casos descritos na literatura médica (SHIN et al., 2000; MEDRANO et al., 2006; PASQUALOTTO; ANTUNES; SEVERO, 2006). Assim, as espécies *C. parapsilosis* e *C. glabrata* e *C. guilliermondii* já foram descritas tanto como agentes causadores de candidemias, quanto de candidose vaginal (GALLE; GIANINNI, 2004; BOFF et al., 2008). Além disso, a *C. glabrata* possui resistência natural ao fluconazol (SIDRIM; ROCHA, 2004). Já *C. lipolytica* é raramente associada a infecções em humanos, porém no ano de 2000 foram descritos cinco casos de candidemia causada por essa espécie em uma unidade pediátrica (SHIN et al., 2000). Em veterinária, as espécies *C. glabrata*, *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram isoladas de vacas com mastite no Brasil, Japão, Polônia e Itália (KRZYZANOWSKI, SIELICKA, 1996; MORETTI, PASQUALI, MENCARONI, 1998; KRUKOWSKI, TIETZE, MAJESWSKI, 2000; SPANAMBERG et al., 2008). Em cães hígdos já foi isolada a espécie *C. parapsilosis* em amostras de mucosas vaginal, oral, perianal e prepucial (CLEFF et al., 2005; BRITO et al., 2009). A candidose em animais esta relacionada a espécie *C. albicans*, havendo relatos em cães, gatos e macaco-prego (FERREIRO et al., 2002; CLEFF et al., 2007; CLEFF et al., 2008). No entanto, no presente estudo esta espécie não foi encontrada, sendo que a espécie *C. guilliermondii* que foi a mais isolada, já foi descrita como agente etiológico de candidose cutânea em cão (MUELLER; BETTENAY; SHIPSTONE, 2002).

A frequência de infecções hospitalares em humanos causadas por espécies não-*albicans* tem aumentado, desse modo a identificação correta da espécie envolvida torna-se crucial no tratamento da micose. Neste contexto, infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Trichosporon asahii* e *T. mucoides* são raras,

porém vários casos têm sido descritos em pacientes imunodeprimidos (KENDIRLI et al, 2005; LACASSE; CLEVELAND, 2008).

No ambiente hospitalar estudado, a espécie mais isolada na superfície deste local foi *A. fumigatus*, com alta frequência na sala cirúrgica tanto antes quanto após a desinfecção. Tendo em vista que estes animais são submetidos a procedimentos invasivos, estes serviriam de porta de entrada para instalação de micoses oportunistas, especialmente a aspergilose. Em pacientes humanos HIV positivos a probabilidade de desenvolverem uma ou mais infecções fúngicas durante o curso da doença é de 60 a 80%, sendo que a candidose orofaríngea é a mais frequente (WINGETER et al., 2007). Além disso, em pacientes neutropênicos a aspergilose é considerada uma micose de grande importância, sendo que o *Aspergillus fumigatus* é a espécie mais frequentemente isolada de materiais clínicos. Esta infecção fúngica causa mortalidade de 30 a 80% dos pacientes mesmo em tratamento (PERKHOFER et al., 2007). Em cães, a aspergilose ocorre mais comumente na região nasal, porém os estudos sobre a ocorrência desta micose no Brasil são escassos (FERREIRA, 2008). Apenas um relato foi descrito em dois cães no estado de São Paulo diagnosticados através da rinoscopia com presença de colônias fúngicas na cavidade nasal (YOSHITOSHI, 2003).

Na bibliografia consultada não foram encontrados relatos de isolamento em ambiente hospitalar no Brasil, sendo este o primeiro relato de isolamento deste fungo em superfície hospitalar veterinária. Assim, o fungo *Sporothrix schenckii* é o agente causador da esporotricose em animais e humanos, tendo assumido grande importância em saúde pública devido ao crescente registro de casos em humanos, felinos e caninos assim como casos zoonóticos (BARROS et al., 2001; SCHUBACH et al., 2001; XAVIER et al., 2004; MADRID et al., 2008). Dessa forma, o isolamento do fungo em superfícies de ambientes veterinários destaca o risco de contaminação de pessoas e animais nestes locais. O *S. schenckii* já foi isolado em telefones públicos do estado de Pernambuco (Brasil), solo da Venezuela, México e Brasil, em caules de milho cultivados próximo ao ambiente domiciliar de pessoas que desenvolveram a micose na Índia (COUTINHO; CAVALCANTI; NETO, 2007; MEHTA et al., 2007; MENDONZA et al., 2007; PÉREZ et al., 2007).

A presença do *S. schenckii* em superfície de madeira (armário), encontrado neste estudo já tem sido descrito na literatura (LACAZ et al., 2002), pois o habitat do fungo é o solo, casca de árvores, madeira, plantas, vegetais e materiais em

decomposição. Por se tratar de um ambiente veterinário, a contaminação pode ter ocorrido pela presença de felinos acometidos pela micose, os quais possuem grande quantidade de células leveduriformes em suas lesões e nas unhas; além da superfície em questão ser um ambiente propício para sua permanência. Schubach e colaboradores (2001) isolaram o fungo em amostras de *swabs* orais de felinos saudáveis que conviviam com felinos com esporotricose, enquanto que Souza e colaboradores (2006) isolaram das unhas de felinos saudáveis.

O isolamento do *Sporothrix schenckii* em ambiente hospitalar após a desinfecção destaca a importância desta ser correta e eficiente, pois pode ter ocorrido a eliminação de fungos contaminantes presentes no local, permitindo a sua permanência no ambiente. Assim, deve-se ter conhecimento dos produtos utilizados e suas concentrações de uso indicadas para cada tipo de agente infeccioso, com intuito de eliminá-lo definitivamente do ambiente.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre a presença de leveduras e dermatófitos em instrumentos de tosa em ambientes veterinários, sendo o presente estudo, o pioneiro. Entretanto, nenhum dermatófito foi isolado nestes locais nas condições estudadas, o que demonstra a ausência destes fungos em instrumentos de tosa e consequentemente, contágio mínimo entre os animais (ATES et al., 2008). Porém, o isolamento de leveduras nestes instrumentos alerta para uma correta desinfecção, pois estes poderiam ser uma fonte de infecção para animais e pessoas.

Através do meio CHROMagar® Candida foi identificado um isolado de *Candida albicans* e a maioria *C. krusei*, no entanto quando comparado com o método automatizado, não haviam as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, portanto discordante do estudo realizado por Ghelardi et al. (2008), no qual utilizando o método cromogênico na identificação de *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* obteve especificidade de 99,8% para *C. guilliermondii* e 100% para *C. krusei* e *C. tropicalis*. Além disso, em outro estudo colônias de *Trichosporon mucoides* apresentaram coloração semelhante às observadas no presente estudo, decorrente da baixa produção de uma enzima presente nesta espécie (GHELARDI et al., 2008). Assim, o método cromogênico possui baixa especificidade, podendo ser utilizado para identificar infecções mistas por diferentes espécies de *Candida* spp. em uma amostra. Porém para a correta identificação das espécies de leveduras, o método automatizado é o mais recomendado.

Pedrini e Margatho (2003) ao testar diferentes concentrações de hipoclorito de sódio frente a cepas padrões de bactérias causadoras de mastite clínica, constataram que a diluição 0,5% não foi efetiva frente a estes isolados. O cloreto de benzalcônio a 1% foi ativo apenas contra gram positivos, e a clorexidina a 0,5% foi a que obteve melhor atividade sobre as cepas testadas. A eficácia da clorexidina frente a microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus* spp. e *Aspergillus* spp. já foi descrita por outros autores (XAVIER et al., 2007; XAVIER et al., 2008; MEDEIROS et al., 2009). No presente estudo observamos resultados semelhantes, no qual o hipoclorito de sódio não teve ação satisfatória frente aos isolados filamentosos testados, enquanto que a clorexidina-cetrimida mostrou-se eficaz frente a esses mesmos isolados de *Aspergillus* spp.

Estudos de sensibilidade *in vitro* de patógenos fúngicos a desinfetantes são escassos na literatura. Xavier et al. (2007) descreveram a eficácia da clorexidina e do cloreto de benzalcônio frente a isolados de *Aspergillus* spp obtidos de centros de reabilitação de animais marinhos e de casos clínicos de aspergilose em pingüins. Além disso, observaram a resistência de todos os isolados ao iodóforo nas diluições testadas. Similarmente, no presente estudo, os isolados de ambiente de *Aspergillus* spp foram sensíveis frente aos desinfetantes/antissépticos escolhidos, porém seis espécies foram resistentes ao hipoclorito e quatro sensíveis na concentração de uso deste, demonstrando que este produto não seria indicado para a desinfecção do local de pesquisa.

De acordo com literatura consultada, o *A. niger* é sensível à concentração de 200µg/mL de clorexidina e 100-200µg/mL de cloreto de benzalcônio (MCDONNELL; RUSSELL, 1999), porém, Xavier (2003) e Xavier et al. (2007) demonstraram que concentrações de 40 µg/mL de clorexidina-cetrimida e de 2,5 µL/mL de um derivado de amônia quaternária foram suficientes para inibir o crescimento desta espécie. Assim, nossos resultados concordam com a literatura em relação a estes dois desinfetantes, porém foi demonstrado que concentrações menores a estas como, 4,2 µL/mL tanto de clorexidina-cetrimida quanto de cloreto de benzalcônio podem inibir o crescimento deste microrganismo.

A CIM da clorexidina-cetrimida capaz de inibir 90% dos isolados foi menor em comparação aos outros desinfetantes, enquanto que a CIM do hipoclorito de sódio foi maior. Entretanto a menor CFM obtida foi referente ao cloreto de benzalcônio. Desse modo, a clorexidina-cetrimida possui ação frente a isolados de

ambiente e o cloreto de benzalcônio poderia ser uma alternativa no rodízio de desinfetantes, diminuindo custos e evitando o aparecimento de cepas resistentes.

Os resultados das concentrações fungicidas mínimas foram diferentes em alguns isolados da concentração inibitória mínima frente aos desinfetantes testados *in vitro*, demonstrando a importância da utilização desta técnica para a correta diluição dos desinfetantes, pois se houve resistência destes isolados sem interações do ambiente, certamente *in vivo* não serão eliminados dos ambientes hospitalares.

Estudos anteriores têm avaliado a ação de desinfetantes e antissépticos, como clorexidina, álcool 70°, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, radiação ultravioleta entre outros, frente a isolados clínicos e de ambiente de espécies fúngicas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Apenas a clorexidina numa concentração de 0,5% obteve resultado satisfatório frente a esses isolados (THÉRAUD et al., 2004). Enquanto que, no presente estudo as concentrações de clorexidina-cetrimida que inibiram os isolados de *Cryptococcus* spp. variaram de 1,6 a 0,8%, para isolados de *Rhodotorula* spp. foram de 0,4% e para *Candida* spp. variaram de 1,6 a 0,4%.

O teste de suscetibilidade do hipoclorito de sódio frente a leveduras demonstrou que 64% dos isolados apresentaram crescimento na concentração de 40µl/mL, sendo esta, recomendada pelo fabricante. Enquanto que, na CFM 19 isolados leveduriformes foram inibidos nesta concentração. Os outros desinfetantes (derivado de cloro-fenol, clorexidina-cetrimida e cloreto de benzalcônio) foram eficazes frente aos isolados leveduriformes testados no presente estudo, concordando com os resultados obtidos por Santos; Borsatto; Delgobo (2007) os quais demonstraram atividade fungicida de derivado de cloro-fenol, amônia quaternária, hipoclorito de sódio e formaldeído frente a isolados de *C. albicans* nas concentrações de 0,1% a 10%. Embora, no presente estudo não tenha sido testado nenhum isolado de *C. albicans*, podemos constatar que o hipoclorito de sódio tanto nos isolados filamentosos quanto nos leveduriformes teve o pior desempenho, sendo que este é o mais utilizado em limpezas em geral, além do baixo custo. O derivado de cloro-fenol, clorexidina-cetrimida e cloreto de benzalcônio foram eficazes tanto frente aos isolados leveduriformes quanto aos filamentosos.

Embora não existam relatos da ocorrência em pequenos animais de micoses causadas por *Candida catenulata*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica*, *Trichosporon* spp, *Rhodotorula* spp. e *Cryptococcus* não-neoformans

encontradas no presente estudo, o isolamento de leveduras é importante e alerta para a presença destas em ambiente veterinário, pois são microrganismos com potencial patogênico tanto para animais quanto para humanos. Além disso, estes fungos estão cada vez mais relacionados a doenças graves em humanos, principalmente em imunodeprimidos e pacientes internados em hospitais.

Em animais tem se aprofundado os estudos da ocorrência de micoses, principalmente como diagnóstico diferencial de outras enfermidades. Assim, Medeiros et al. (2009) relata que a desinfecção do ambiente hospitalar é um dos mais importantes aspectos na prevenção de enfermidades nosocomiais, de forma que a escolha do produto mais adequado para este fim é crucial para a eliminação de patógenos oportunistas.

Através dos resultados obtidos, espera-se que a pesquisa destes fungos em ambientes veterinários continue sendo realizada, para que exista o conhecimento das espécies envolvidas que possa predispor infecções, além de implantar um programa de desinfecção eficiente para remoção destes microrganismos que possam ser uma fonte de infecção para animais imunodeprimidos.

7 Conclusões

Nos ambientes veterinários estão presentes fungos filamentosos e leveduriformes.

A sala de internação do hospital veterinário foi o ambiente que apresentou maior contaminação fúngica e a sala cirúrgica foi a menos contaminada, antes da desinfecção. Enquanto que, na análise das superfícies demonstrou que as baias eram as mais contaminadas antes da desinfecção e a calha apresentava menor contaminação. Houve redução da contaminação fúngica de 20,5% por local de estudo hospitalar.

Os gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Malassezia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* foram isolados antes da desinfecção. Após a desinfecção estes gêneros também foram isolados acrescidos do gênero *Trichosporon* e do fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. As espécies de leveduras mais frequentemente isoladas foram *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. catenulata* e *C. famata*, sendo o primeiro isolamento destas em ambiente veterinário.

A lâmina da máquina de tosa foi a mais contaminada, com predominância de *Malassezia pachydermatis*, além do isolamento das espécies *Candida parapsilosis*, *C. lipolytica*, *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichosporon asahii*, porém nenhum dermatófito foi isolado nestes instrumentos.

A clorexidina-cetrimida, cloreto de benzalcônio e derivado de cloro-fenol foram eficazes na concentração de uso indicada pelo fabricante frente aos isolados filamentosos e leveduriformes provenientes da superfície hospitalar, enquanto que o hipoclorito de sódio na concentração de uso não apresentou resultado satisfatório frente a estes isolados.

Referências

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*, 2003. Disponível em <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>> Acesso em: 23 março 2008.
- AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine skin disease. **British Veterinary Journal**. v.152, p. 269-281, 1996.
- ALMEIDA, M.; MARTINI, M.; PORTO, E.; CAMARGO, A.; RIZZO, E.; LACAZ, C. Identificação da microbiota fúngica de ambientes considerados assépticos. **Revista de Saúde Pública**. v..22, n.3, 1988.
- AMARAL, R. C.; IBAÑEZ, J. F.; MAMIZUKA, E. M.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; LARSSON, C. E. Microbiota indígena do meato acústico externo de gatos hípidos. **Ciência Rural**. v.28, n.3, p.441-445, 1998.
- ANDERSEN, B.M.; RASCH, M.; KVIST, J.; TOLLEFSEN, T.; LUKKASSEN, R.; SANDVIK, L.; WELO, A. Floor cleaning: effect on bacteria and organic materials in hospital rooms. **Journal of Hospital Infection** v. 71, p. 57-65, 2009.
- ANDRADE, D.; ANGERAMI, E.; PADOVANI, C. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista de Saúde Pública**. v.34, n. 2, p. 163-9, 2000.
- ANTUNES, A.G.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 46, p. 239-241, 2004.
- AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 9, p. 411-418, 2005.
- ATES, A.; ILKIT, M.; OZDEMIR, R.; OZCAN, K. Dermatophytes isolated from asymptomatic dogs in Adana, Turkey: A preliminary study. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 154-157, 2008.

AYLIFFE, G.; COLLINS, B.; LOWBURY, J. Cleaning and Disinfection of Hospital Floors. **British Medical Journal**. p. 442-445, 1966.

BARBERINO, M.G.; SILVA, N.; REBOUCAS, C.; BARREIRO, K.; ALCANTARA, A.P.; NETTO, E.M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 10, p. 36-40, 2006.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3.ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2000. 1139p.

BARROS, M.; SCHUBACH, T.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.; SCHUBACH, A.; FIALHO-MONTEIRO, P.; REIS, R. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 6, p.777–779, 2001.

BERBARI, S. A.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.

BOFF, E.; LOPES, P.; SPADER, T.; SCHEID, L.; LORETO, E.; DAL FORNO, N.; AQUINO, V.; SEVERO, L.; SANTURIO, J.; ALVES, S. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n.1, p. 36-40, 2008.

BOND, R.; LAMPORT A. I.; LLOYD, D. H. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. **Research in Veterinary Science**, v.68, p.291-293, 2000.

BOND, R.; LLOYD, D. H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.8, p.101-106, 1997.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **The Veterinary Journal**. v. 182, p 320-326, 2009.

CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLA, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Research**, v.7, p.1064-1076, 2007.

CAFARCHIA, C., ROMITO, D., SASANELLI, M., LIA, R., CAPELLI, G., OTRANTO, D. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. **Mycoses**, v. 47, p. 508–513, 2004.

CARVALHO, K. **Contaminação de superfícies em enfermarias de pacientes com infecções por *Staphylococcus aureus* no hospital de clínicas da Universidade Federal de Uberlândia**. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Faculdade de Ciências Biomédicas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L.R., ARREGUÍN-ESPINOSA, R., SANTOS, G.R., LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Frequency of *Cryptococcus* Species and Varieties in México and their Comparison with some Latin American Countries. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. v. 42, p. 35-40, 2000.

CHERMETTE, R., FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in Animals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 385–405, 2008.

CLEFF, M.; LIMA, A.; FARIA, R.; MEINERZ, A.R.; ANTUNES, T.; ARAÚJO, F.; NASCENTE P.; NOBRE, M.; MEIRELES, M. Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of health canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**.v.36, p. 201-204, 2005.

CLEFF, M.B.; SILVA, G.; MEINERZ, A.; MADRID, I.; MARTINS, A.; FONSECA, A.; NASCENTE, P.; MEIRELES, M.; MELLO, J. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**. v.14, n.2, dez., p. 164-168, 2007.

CLEFF, M.; SOARES, M.; MADRID, I.; MEINERZ, A.; XAVIER, M.; ALBANO, A.; FONSECA, A.; SILVEIRA, E.; MEIRELES, M. Candidíase cutânea em *Cebus apella* (macaco prego). **Ciência Animal Brasileira**. v. 9, n. 3, p. 791-795, 2008.

COLOMBO, A.L.; NUCCI M; PARK, B.J.; NOUER, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J; Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.L; GUIMARAES, T.; SILVA, L.R.; ALMEIDA, D.; MONFARDINI, L.P.; CUNHA, A.K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 28, p. 570-576, 2007.

COUTINHO, F.; CAVALCANTI, M.; NETO, F. Isolation of filamentous fungi from public telephones of the metropolitan region of city of Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 324-329, 2007.

CUCÉ, L.; ANDRADE, F.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. Flora anemófila em ambiente hospitalar (PS e UTI). **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 68, n. 4, p. 201-204, 1993.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.; CÉSAR, E.; SPANÓ, E.; MARCHESAN, M.; PÉCORA, J. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**. v.13, n. 2, p.113-117, 2002.

FALVEY, D.; STREIFEL, A. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, p. 35-41, 2007.

FERREIRA, R.R. **Pesquisa sorológica de *Aspergillus fumigatus* e cultivo fúngico de amostras obtidas de cães com descarga nasal**. Dissertação de mestrado UFRGS, 2008.

FERREIRO, L.; MOREIRA JR., J. P. R.; APPELT, C. E.; BERG, V.; OLIVEIRA, I. A.; MUSCHNER, A. C.; REISCHAK, D.; CHERMETTE, R. Associações entre o isolamento da *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV), tratamentos com corticóides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**.v. 30, n.3, p. 179-183, 2002.

FLEMMING, R.V.; WALSH, T.J.; ANAISSIE, E.J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infectious Disease Clinics North America**. v. 16, p. 915-933, 2002.

GALLE, L.C.; GIANINNI, M.S. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 40, n. 4, p. 229-36, 2004.

GHELARDI, E.; PICHIERRI, G.; CASTAGNA, B.; BARNINI, S.; TAVANTI, A.; CAMPA, M. Efficacy of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. **Clinical Microbiology Infection**. v.14, p. 141–147, 2008.

GOLDANI, L.Z; MARIO, P.S. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **Journal of Infectology**. v. 46, p. 155-160, 2003.

GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 312–316, 2005.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Micologia Especial e Clínica. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005, parte 3B, p.473-505.

GROGAN, S.G; HART, B.D. Feline Cryptococcosis. A retrospective Evaluation. **J. American National Hospital Association**. v. 33, 1997.

GUIDA, A. Mechanism of action of sodium hypochlorite and its effects on dentin. **Minerva Stomatologica**. v. 55, n. 9, p. 471-82, 2006.

GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; MAILLARD, R. Les candidoses des carnivores domestiques actualisation à propos de 10 cas. **Point Vétérinaire**, v.28, n.175, p.51-61, 1996.

HARVEY, R. G.; HARARI, J; DELAUCHE, A.J. **Doenças de ouvido em cães e gatos**. Rio de Janeiro: Revinter, p. 272, 2004.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 623-627, 2004.

HOLECHEK, S.; CASQUERO, J.; ZURITA, S.; GUEVARA, J.; MONTOYA, Y. Variabilidad genética em cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas em Abancay, Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**. v. 21, n. 2, p. 87-91, 2004.

KENDIRLI, T.; CIFTÇI, E.; INCE, E.; ÖNCEL, S.; DALGIÇ, N.; GÜRİZ, H.; UNAL, E.; DOGRU, U. Successful treatment of *Trichosporon mucoides* infection with lipid complex amphotericin B and 5-fluorocytosine. **Mycoses**. v. 49, p. 251–253, 2005.

KREMERY, V.J.; MATEIKA, F.; KUNOVA, A.; SPANIK, S.; GIARFAS, J.; SYCOVA, Z.; TRUPL, J. Hematogeneous Trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Support Care Cancer**. v. 7, p. 39-43, 1999.

KRUKOWSKI, H.; TIETZE, M.; MAJESWSKI, T. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. **Mycopathologia**, v. 150, p. 5-7, 2000.

KRZYZANOWSKI, J.; SIELICKA, B. Characteristics of yeasts isolated from clinical cases of mastitis in cows. **Annales Universitatis Mariae Curie Sklodowska Sectio DD, Medicina Veterinaria**, v.51, p.59-64, 1996.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992, 866p.

JEANSONNE, M.; WHITE, R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**. v. 20, n. 6, p. 276-278, 1994.

LABRECQUE, O; SYLVESTRE, D; MESSIER, S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Dobermann pincher. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** , v. 17, p. 598-600, 2005

LACASSE, A.; CLEVELAND, K.O. *Trichosporon mucoides* fungemia in a liver transplant recipient: case report and review. **Transplant Infectious Disease**. p. 1-5, 2008.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. Sarvier, SP, 497 p, 1998.

LACAZ, C., PORTO, E, MARTINS, J., HEINS-VACCARI, E., MELO, N. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; AMARAL, R.C.; GANDRA, C.R.P.; HAGIWARA, M.K.; FERNANDES, W.R. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Veterinária**. v.4, p.63-68, 1988.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.

LAUTENSCHLÄGER, JUSSARA. Pelotas tem um cão para 5,6 habitantes. **Diário Popular**, Pelotas, 12 jul. 2008. Caderno Cidade. Disponível em: <http://www.diariopopular.com.br/12_07_08/p0301.html> Acesso em: 27 mar. 2009

LUSSIER, N.; LAVERDIÈRE, M.; DELORME, J.; WEISS, K.; Dandavino, R. *Trichosporon beigelli* funguria in renal transplant recipients. **Clinical Infection Disease**. v. 31, p. 1299 - 1301, 2000.

MADRID, I.M.; JÚNIOR, R.S.; SAMPAIO JR, D.P.; MUELLER, E.M.; DUTRA, D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose canina: relato de três casos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, n. 1, p. 105-108, 2007.

MADRID, I.; MARTINS, A.; ANTUNES, T.; MENDES, J.; NOBRE, M.; MEIRELES, M. Aspectos terapêuticos da esporotricose em felinos domésticos. In: **I Encontro Gaúcho de Micologia**, Porto Alegre, 119p, 2008.

MALUCHE, M.E.; SANTOS, J.I. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.40, n 1, p. 65-67, 2008.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.

MARTINS, A. A.; ROSA, C.; NASCENTE, P.; SOUZA, L.; FARIA, R.; MEIRELES, M.C.A. Utilização dos tópicos 20, 40, 60 e 80 para identificação das espécies do gênero *Malassezia*. In: **Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica**. Pelotas, 2004.

MARTINS-DINIZ, J.; SILVA, R.; MIRANDA, E.; MENDES-GIANNINI, M. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Rev. Saúde Pública**. v. 39, n. 3, p. 398-405, 2005.

MATTEI, A.S.; MADRID, I.; COIMBRA, H.; CLEFF, M.; XAVIER, M.; MARTINS, A.; FONSECA, A. MEIRELES, M.; NOBRE, M. Isolamento de fungos filamentosos em hospital e clínicas veterinárias. In: **Anais do XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária**. Gramado, 2006.

MCDONELL, G.; RUSSEL, D.. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. Jan, p. 147–179, 1999.

- MEDEIROS, E.; SANTOS, M.; PINHEIRO JR, J.; FARIA, E.; WANDERLEY, G.; TELES, J.; MOTA, R. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009.
- MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.D.; ROCHA, M.F.; RABENHORST, S.H.; SIDRIM, J.J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 48, p. 17-20, 2006.
- MEHTA, K.; SHARMA, N.; KANGA, A.; MAHAJAN, V.; RANJAN, N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. **Mycoses**. v. 50, p. 496–501, 2007.
- MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Universitária. UFPEL, 2009. 543p.
- MELCHERT, A.; MOTTA, Y. P.; GIUFFRIDA, R.; LAPOSY, C. B. Avaliação citológica e microbiológica do lavado broncoalveolar em cães hígidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 157-164, 2008.
- MENDOZA, M.; DIAZ, E.; ALVARADO, P.; ROMERO, E.; ALBORNOZ, M. Aislamiento de *Sporothrix schenckii* del medio ambiente en Venezuela. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 24, p. 317-319, 2007.
- MESA-ARANGO, A.; REYES-MONTES, M.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚÑIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* Isolates According to Geographic Origin and Clinical Form of Sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 8, p. 3004–3011, 2002.
- MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Journal of Veterinary Medicine**, v. 45, p. 129-132, 1998.
- MORRIS, M.; KOKKI, M.H.; ANDERSON, K.; RICHARDSON, M.D. Sampling of *Aspergillus* spores in air. **Journal of Hospital Infection**. v. 44, p. 81-92, 2000.
- MORRIS, D. O. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 83-88, 2005.
- MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. Ear dermatoses. In: **Small Animal Dermatology**. 4^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 807-827, 1989.
- MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous Candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **The Veterinary Record**. v.150, p.728-730, 2002.

NAKAGAKI, K., HATA, K., IWATA, E. AND TAKEO, K. *Malassezia pachydermatis* isolated from a South American sea lion (*Otaria byronia*) with dermatitis. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 62, p. 901–903, 2000.

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.26, n.2, p.79-82, 2004.

NASCENTE, P.; SANTIN, R.; LUND, R.; BUENO, M.; FEIJÓ, A.; CLEFF, M.; MEIRELES, M. Leveduras isoladas em ambientes de UTI – estudo preliminar. In: **Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L.F.; SOUZA, L.L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 447 - 452, 1998.

NOBRE, M.O., MEIRELES, M.C. ; CORDEIRO, J.M.C. Importância do felino doméstico na epidemiologia da dermatofitose por *Microsporum canis*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v.7/8, n.1, p. 81-84, 2000.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infections agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996-1997). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, n. 3, p. 243-247, 2001.

OWENS, C.D.; STOESSEL, K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. **Journal of Hospital Infection**. v. 70, p. 3–10, 2008.

PANAGOPOULOU, P.; FILIOTI, J.; PETRIKKOS, G.; GIAKOUPI, P.; ANATOLIOTAKI, M.; FARMAKI, E.; KANTA, A.; APOSTOLAKOU, H.; AVLAMI, A.; SAMONIS, G.; ROILIDES, E. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. **Journal of Hospital Infection**, v.52, p.185-191, 2002.

PASQUALOTTO, A.C.; ANTUNES, A.G.; SEVERO, L.C. *Candida guilliermondii* as the etiology of candidosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 48, p. 123-127, 2006.

PASQUALOTTO, A.C.; DE MORAES, A.B.; ZANINI, R.R.; SEVERO, L.C. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 28, p. 799-804, 2007.

PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; ARAUJO, C.R.; NASCIMENTO, E.S.; SOUZA, L.K.; ODE, F.F.; SALES, W.S.; SILVA, M.R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**. v. 163, p. 145-151, 2007.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, n. 3, p. 239-243, 2006.

PERKHOFER, S.; BLUM, G.; SPETH, C.; MAYR, A.; DIERICH, M.; LASS-FLÖRL, C. Influence of amphotericin B and amphotericin B colloidal dispersion on the functions of human phagocytes in defence against *Aspergillus* species. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**. v. 26, p.413–417, 2007.

PÉREZ, R.; LOZANO, Y.; ROLDÁN, E.; ESCOBAR, M.; TEXIS, A. Epidemiología de la esporotricosis en el municipio de Huauchinango, Puebla. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**. v. 27, n. 2, p. 38-43, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PLANT J. D.; ROSENKRANTZ, W.S.; GRIFFIN, E.C. Factores associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201, n.6, p.879-882, 1992.

POLLOCK, C.; ROHRBACH, B.; RAMSAY, E. Fungal dermatitis in captive Pinnipeds. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 31, n. 3, p. 374–378, 2000.

RAMALHO, F., FARIAS, M., BIER, D., CONDAS, L., MURO, M., PIMPÃO, C. Avaliação do estado de carreador assintomático de fungos dermatofíticos em gatos destinados à doação em centros de controle de zoonoses e sociedade protetora de animais. In: **Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Recife, 2007.

RAMOS-BARBOSA, S.; GUAZZELI, L.; SEVERO, L. Criptococose mamária manifesta após corticoterapia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p.65-66, 2004

REED, L.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoint. **American Journal of Hygiene**. v. 27, p.493-497, 1937.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia** v.42, p.265-270, 1950.

RIPPON, J. N. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In: **Medical Micology**, Sauders, 1988. 797p.

SANTOS, J.; BORSATTO, E.; DELGOBO, C. Atividade fungicida de desinfetantes comerciais de uso doméstico frente a *Candida albicans*. **Anais da 6ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão, UFSC**, 2007.
http://www.sepex.ufsc.br/anais_6/trabalhos/459.html. Acesso em 4 de janeiro de 2010.

SANTOS, L.; SCALCO NETO, J.; RIZZO, N.; BASTIANI, P.; RODRIGUES, L.; FERREIRA, D.; SCHWANTS, N.; BARCELLOS, H.; BRUN, M. Avaliação dos procedimentos de limpeza, desinfecção e biossegurança no Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (HV-UPF). **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, p. 357-362, 2007.

SCHUBACH, T.; SCHUBACH, A.; REIS, R.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.; MONTEIRO, T.; BARROS, M.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.; MONTEIRO, P.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**. v. 153, p. 83–86, 2001.

SHERLOCK, O.; O'CONNELL, N.; CREAMER, E.; HUMPHREYS, H. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness. **Journal of Hospital Infection**. Jun-Jul, p. 1-7, 2009.

SHIN, J.; KOOK, H.; SHIN, D.; HWANG, T.; KIM, M.; SUH, S.; RYANG, D. Nosocomial Cluster of *Candida lipolytica* Fungemia in Pediatric Patients. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**. v. 19, p. 344–349, 2000.

SIDIRM, J. ; ROCHA, M. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, P.R., RABELO, R.A., TERRA, A.P., TEIXEIRA, D.N. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 2, p.158-162, 2008.

SOUZA, L.; NASCENTE, P.; NOBRE, M.; MEINERZ, A.; MEIRELES, M. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 372-374, 2006.

SPANAMBERG, A.; WÜNDER JR, E.; PEREIRA, D.; ARGENTA, J.; SANCHES, E.; VALENTE, P.; FERREIRO, L. Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 25, p. 154-156, 2008.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.; SANTURIO, J.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**. v.39, n.1, p.282-290, 2009.

STEWART, L. J. Newly reported skin disease syndromes in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 20, n.6, p.1603-1613, 1990.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p.1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M. SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v.48, n.8, p.579-583, 2004.

THÉRAUD, M.; BÉDOUIN, Y.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1013–1018, 2004.

VONBERG, R.; GASTMEIER, P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. **Journal of Hospital Infection**, v. 63, p. 246-254, 2006.

WALSH, T.J.; MELCHER, G.P.; RINALDI, M.G.; LECCIONES, J.; MCGOUGH, D.A.; KELLY, P.; LEE, J.; CALLENDER, D.; RUBIN, M.; Pizzo, P.A. *Trichosporon beigelli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1616 - 22, 1990.

WALSH T, J.; LEE, J. W.; MELCHER, G. P.; NAVARRO, E.; BACHER, J.; CALLENDER, D.; REED, K.D.; WU, T.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; PIZZO, P.A. Experimental *Trichosporon* infection in persistently granulocytopenic rabbits: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of an emerging opportunistic mycosis. **Journal Infection Disease**, v. 166, p. 121 – 133, 1992.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENS, J. FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAÏSSIE, E. Infection due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n. 1, p. 48-66, 2004.

WEBER, D.; RUTALA, W.; SICKBERT-BENNETT, E. Outbreaks Associated with Contaminated Antiseptics and Disinfectants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4217–4224, 2007.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T.I. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

XAVIER, P.C.N. Levantamento de contaminação fúngica em ambiente hospitalar e avaliação de eficiência do desinfetante à base de derivado de amônia quartenária. **O Mundo da Saúde**, v. 27, p. 579-588, 2003.

XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; SAMPAIO JR, D.P.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, P.S.; SÓRIA, F.B.A.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**. v. 34, p. 1961-1963, 2004.

XAVIER, M.O.; MADRID, I.M.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Atividade “in vitro” de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 74, p. 49-53, 2007.

XAVIER, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; OSÓRIO, L.G.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.; SILVA FILHO, R.P.; MEIRELES, M.C.A. Eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.4, p.873-877, 2008.

YARROW, D.; AHEARN, D.G. Genus 7. *Malassezia* Baillon. In The Yeasts a taxonomic zeep, C.P. (1950). Ear disease of the dog and cat. **Canadian Journal Comparative Medicine**. v.14, p.15-19, 1984.

YOSHITOSHI, F.N. **Contribuição da rinoscopia na avaliação de afecções nasais no cão (*Canis familiaris*)**. 2003. 135 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZAAS, A.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B.; MILLER, J.; PERFECT, J. Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 5233–5235, 2003.

ZANATTA, F.B; RÖSING, C.K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A** v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.