

Perfil de sensibilidade a antifúngicos de *Candida lusitanae* isolada de caso de peritonite felina

Antifungal sensitivity profile of Candida lusitanae isolated from a case of feline peritonitis

Carolina Ferreira Amorim¹, Ana Rita Sokolonski Antón², Ricardo Wagner Portela^{3*}

¹Biomédica formada pela Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana – UNEF, Especialista em Microbiologia Avançada pela Faculdade Unyleya, Mestre em Microbiologia pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Doutoranda do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA; ²Cirurgiã-dentista formada pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Especialista em Farmacologia Geral pelo Portal Educação, PE, Mestre e Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Professora Adjunto de Bioquímica do Instituto de Ciências da Saúde e do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA; ³Médico veterinário formado pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, Mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Professor Associado de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde e do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA

Resumo

Introdução: *Candida* spp. são patógenos encontrados comumente em humanos, mas podem infectar outros animais. *Candida lusitanae* é uma espécie menos frequentemente relatada de *Candida não-albicans* e pode levar a quadros de peritonite em humanos.

Objetivo: relatar a identificação da *C. lusitanae* isolada do líquido peritoneal de um gato adulto e avaliar o perfil de sensibilidade a antifúngicos. **Metodologia:** para identificação do fungo isolado de líquido peritoneal de gato com quadro de peritonite, foi utilizado o sistema MALDI-Biotyper. O ensaio de microdiluição foi realizado seguindo as normas do documento M27-S4 da CLSI para determinar a concentração mínima de antifúngicos capaz de inibir o crescimento de 100% dos fungos (MIC_{100}). Logo após, foi obtida a concentração mínima dos mesmos antifúngicos capaz de inativar 100% dos fungos (MFC_{100}). A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada de acordo com a razão MFC_{100}/MIC_{100} . **Resultados:** O MALDI-Biotyper identificou a *Candida lusitanae* como o agente etiológico da peritonite felina. Os antifúngicos testados nesta pesquisa apresentaram MIC_{100} definido, bem como 3/5 dessas drogas apresentaram ponto de corte epidemiológico. A relação MFC_{100}/MIC_{100} classificou todos os antifúngicos aqui testados como tendo ação fungicida. **Conclusão:** a identificação da *Candida lusitanae*, uma levedura rara, ocasionando peritonite em gatos, leva a uma discussão sobre os avanços dos fungos como agentes patogênicos em animais, especialmente *Candida não-albicans*, e sobre seus perfis de resistência a antifúngicos.

Palavras-chave: Antimicrobiano; *Candida não-albicans*; candidíase; peritonite; resistência antifúngica.

Abstract

Introduction: *Candida* spp. are pathogens commonly found in humans but can infect other animals. *Candida lusitanae* is a less frequently reported species of non-albicans *Candida* and can lead to peritonitis in humans. **Objective:** to report the identification of *C. lusitanae* isolated from the peritoneal fluid of an adult cat and to evaluate the antifungal sensitivity profile. **Methodology:** the MALDI-Biotyper system was used to identify the fungus isolated from the peritoneal fluid of a cat with peritonitis. The microdilution assay followed the guidelines of the CLSI document M27-S4 to determine the minimum concentration of antifungals capable of inhibiting the growth of 100% of the fungi (MIC_{100}). Soon after, the minimum concentration of the same antifungals capable of inactivating 100% of the fungi (MFC_{100}) was obtained. The antimicrobial activity of the compounds was evaluated according to the MFC_{100}/MIC_{100} ratio. **Results:** the MALDI-Biotyper identified *Candida lusitanae* as the etiologic agent of feline peritonitis. The antifungals tested in this research had a defined MIC_{100} and 3/5 of these drugs had an epidemiological cutoff point. The MFC_{100}/MIC_{100} ratio classified all antifungals tested here as having an fungicidal action. **Conclusion:** the identification of *Candida lusitanae* causing peritonitis in cats, leads to a discussion about the advances of fungi as pathogens in animals, especially non-albicans *Candida*, and about their resistance profiles to antifungals.

Keywords: Antimicrobial. non-albicans *Candida*. Candidiasis. Peritonitis. Antifungal resistance.

INTRODUÇÃO

Candida spp. é considerada como um dos principais patógenos de humanos, sendo associada à maior parte dos óbitos ocasionados por fungos, os quais são estimados em 1,6 milhões por ano¹. Apresentam um perfil de patogenicidade considerável, especialmente em casos de imunodepressão². Entre os mecanismos de patogenicidade que esse gênero possui, podem-se citar capacidade de adesão aos tecidos, produção de enzimas hidrolíticas, e formação de biofilme³.

Candida lusitaniae é uma levedura associada a infecções nosocomiais⁴ e que pode induzir de 0,2 a 9,4% de casos de candidemia⁵. Embora seja raramente isolada, seu perfil de resistência adquirida chama a atenção, e frequentemente é relacionada à resistência a anfotericina B (polieno) e fluconazol (azólico), e à capacidade de adquirir rapidamente resistência a drogas, o que dificulta sua erradicação⁴.

Apesar do fato de ser pouco descrita, *Candida* também ocasiona infecções em animais⁶. Pode ser encontrada residindo como microbiota comensal em animais e, assim como em seres humanos, o quadro patológico está majoritariamente relacionado à imunodepressão do hospedeiro⁷. Faltam dados epidemiológicos para traçar um panorama mais correto sobre a candidíase animal⁶. Em cães e gatos, as espécies de *Candida* mais frequentemente encontradas são *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, e *C. rugose*⁸. A candidíase sistêmica nesses animais, é rara, sua causa ainda não é totalmente elucidada, mas acredita-se que a infecção sistêmica esteja associada a processos cirúrgicos e a traumas⁶.

A peritonite é uma inflamação que ocorre no peritônio, membrana que reveste a cavidade abdominal. A peritonite infecciosa, em cães e gatos geralmente está associada a coronavírus felino, *Salmonella typhimurium*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium limosum*, *Mesocestoides* spp., e *Blastomyces* spp.⁹. Não há relatos, na literatura, sobre peritonite por *Candida* spp. em gatos, apenas em cães^{10,11}. Em felinos, só há relato de um granuloma gastrointestinal por *Candida albicans*¹². Este é o primeiro achado de peritonite em gato infectado com *Candida lusitaniae*. O presente trabalho tem como objetivo relatar a identificação da *C. lusitaniae* e avaliar a o perfil de sensibilidade a antifúngicos.

METODOLOGIA

Coleta da amostra

A amostra do líquido peritoneal foi coletada, por veterinários, de um gato adulto com sintomatologia compatível com peritonite. O material foi aspirado pela técnica de abdominocentese. Após a tricotomia e assepsia do local, o animal foi posicionado em decúbito lateral, e a agulha foi introduzida na cavidade abdominal, sendo o líquido peritoneal transferido para um tubo estéril.

Isolamento do microrganismo

Após a coleta, 10 µL do líquido peritoneal foi inoculado em ágar Sabouraud dextrose (ASD) adicionado de 0,5% de cloranfenicol, e semeou-se pela técnica de esgotamento, a fim de serem obtidas colônias isoladas. A placa foi incubada por 48h a 37°C. Posteriormente, foi realizada a caracterização morfológica, utilizando-se o método de Gram, e realizada a identificação do microrganismo¹³.

Identificação do microrganismo

Para identificação do microrganismo, foi utilizada a técnica de MALDI-TOF, a qual o identifica quanto ao gênero e à espécie por marcadores proteômicos que estão indexados em bancos de dados para tal identificação¹⁴. Resumidamente, uma colônia foi adicionada à placa-alvo e fixada com a solução de matriz (1µL) contendo ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (α-CHCA), 50% de acetoni-trila e 2,5% de ácido trifluoroacético¹⁵. Como controle, utilizou-se a proteína padrão da cepa DH5α de *Escherichia coli*¹⁶. Posteriormente a essa fixação, a placa-alvo com o inóculo foi seca em temperatura ambiente¹⁵. O aparelho utilizado na análise foi o MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O score espectral mínimo para identificação de leveduras no nível de espécie foi $\geq 1,8$ ¹⁷.

Ensaio de sensibilidade à antifúngicos

Para avaliação do perfil de sensibilidade da *Candida lusitaniae* a antifúngicos convencionais, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, com o objetivo de determinação da concentração mínima inibitória capaz de inibir 100% do crescimento (MIC₁₀₀) da levedura. Para tanto, seguiu-se a metodologia estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M27-S4¹⁸. A *Candida* foi cultivada em meio ASD adicionado de 0,5% de cloranfenicol, com incubação a 37°C e 24 horas. Posteriormente, o inóculo foi diluído em solução salina estéril a 0,9%, para obter uma densidade óptica (DO) de 0,08 – 0,10 no comprimento de onda de 530 nm, correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão-padrão foi diluída novamente em solução salina (1:50) e, por fim, em meio RPMI, suplementado com 2% de dextrose (1:20), obtendo-se, assim, uma concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL² no poço. Os antifúngicos comerciais utilizados foram o fluconazol (0,125 – 64 µg/mL), itraconazol, cetoconazol, anfotericina B, e nistatina (0,0313 – 16 µg/mL)¹⁸. O inóculo (100 µL por poço) foi adicionado juntamente com o mesmo volume de cada concentração dos antifúngicos, em triplicata. Poços de controles negativos com cada concentração de antifúngico foram utilizados, bem como controles com meio de RPMI sozinho também foram utilizados. Além disso, foram usados controles positivos com inóculo e RPMI. As placas ficaram incubadas por 48 horas a 37°C, e então lidas em espectrofotômetro (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher, Waltham, MA,

EUA) a 625 nm. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas e repetidos duas vezes. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula¹⁹:

Inibição (%) = [(DO poço teste com antifúngico – DO poço controle)/DO poço controle x 100]

Ensaio de Concentração Fungicida Mínima

Com base no experimento anterior, para terminar a concentração fungicida mínima 100% capaz de inativar 100% dos fungos (MFC₁₀₀), foram subcultivados fungos tratados com os antifúngicos, baseando-se na sua MIC₁₀₀. Após 48 horas de incubação a 37° C, o MFC₁₀₀ foi determinado, considerando-se a menor concentração que não apresentou crescimento visível de colônia²⁰. O efeito fungicida e fungistático *in vitro* foi avaliado com base na razão do MFC₁₀₀/MIC₁₀₀, sendo que uma razão ≤4 indicou uma ação fungicida, e uma razão >4 um efeito fungistático²¹.

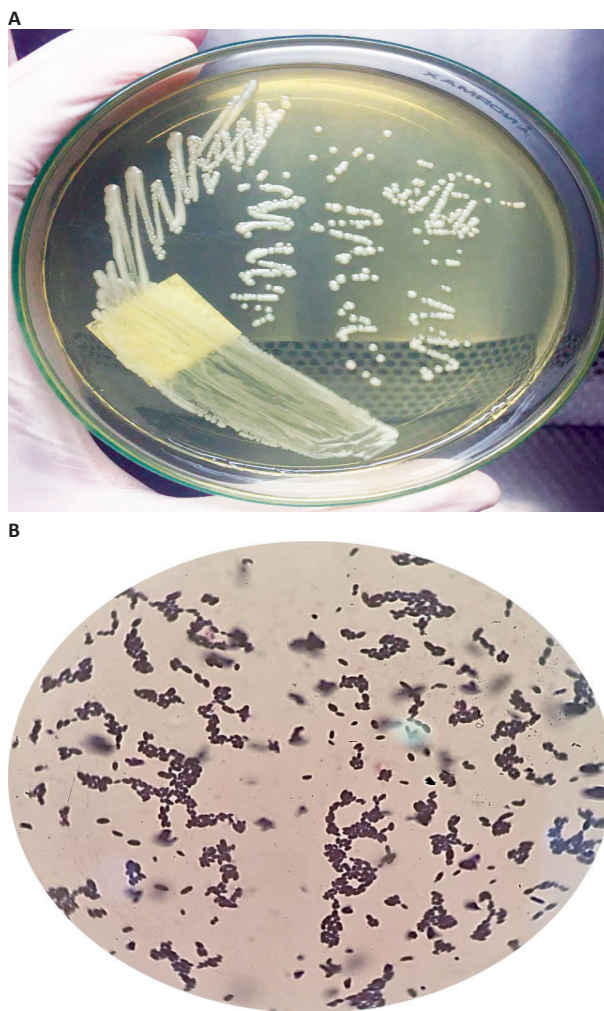
RESULTADOS

A partir da incubação (48h) em ágar Sabouraud dextrose com 0,5% de cloranfenicol, do líquido peritoneal oriundo do felino com peritonite, foram obtidas colônias isoladas com coloração creme, aspecto brilhante, com superfície lisa e bordas regulares (Figura 1A), característico de algumas espécies de *Candida*²². Após o crescimento da levedura, foi realizada a confecção da lâmina com coloração pelo método de Gram, cuja técnica é aplicada na micologia apenas para observação morfológica, diferentemente de sua finalidade na bacteriologia¹³. Assim, na objetiva de 100x, pôde-se observar a presença de blastoconídios (Figura 1B). Com base nos resultados obtidos no sistema MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), um score espectral de ≥ 1,8 identificou *Candida lusitanae* como agente etiológico da peritonite do felino, sem presença de contaminações.

Posteriormente à identificação, no ensaio de microdiluição com os antifúngicos comerciais, obteve-se concentrações que inibiram 100% da *C. lusitanae*, as quais variaram entre 0,0625 µg/mL (para itraconazol e cetoconazol), 1 µg /mL (para fluconazol e anfotericina B), e 4 µg /mL (nistatina), conforme é demonstrado na Figura 2. *Candida lusitanae* não possui valor de corte de sensibilidade para antifúngicos, porém o documento M59 do CLSI²³ traz os valores de corte epidemiológicos (ECV) para fluconazol (1 µg/mL), itraconazol (1 µg/mL) e anfotericina B (2 µg/mL). Com isso, pode-se observar que

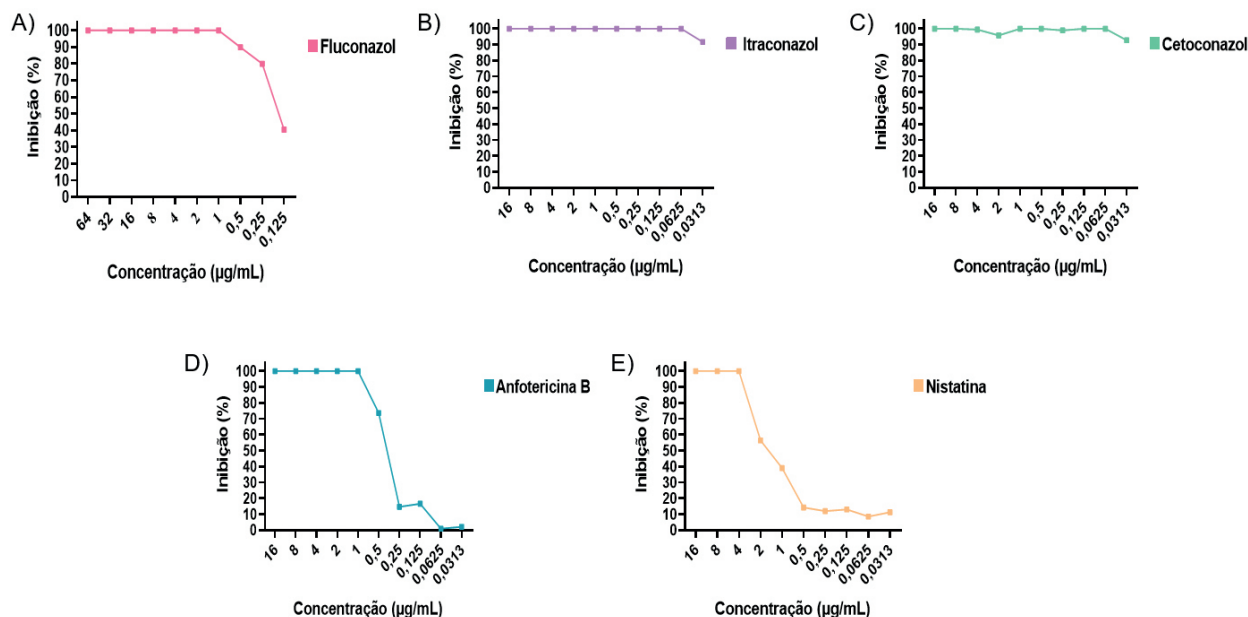
fluconazol (MIC₁₀₀ 1 µg/mL), itraconazol (MIC₁₀₀ 0,0625 µg/mL) e anfotericina B (MIC₁₀₀ 1 µg/mL) alcançaram os pontos de corte epidemiológicos para *C. lusitanae*, conforme o documento supracitado²³. O ECV dos antifúngicos cetoconazol e nistatina não são abordados neste documento. Assim, a classificação dessas drogas não foi realizada. Os antifúngicos apresentaram MFC₁₀₀ definido. Logo, com base nesses resultados, foi possível determinar a atividade dos antifúngicos (*in vitro*) como fungicida, já que as razões MFC₁₀₀/MIC₁₀₀ foram ≤ 4 (Tabela 1).

Figura 1 – (A) *Candida lusitanae* cultivada em ágar Sabouraud dextrose com 0,5% de cloranfenicol após 48 h de incubação a 37° C. (B) Blastoconídios observados no microscópio óptico em aumento de 1000x, utilizando a técnica de coloração de Gram.



Fonte: Autoria própria

Figura 2 – Cinéticas da inibição de crescimento de *Candida lusitanae* por antifúngicos comerciais: (A) fluconazol, (B) itraconazol, (C) cetoconazol, (D) anfotericina B e (E) nistatina. O protocolo de microdiluição em caldo seguiu o documento da CLSI M27-S4 (2012), e os resultados são apresentados como médias de dois experimentos independentes.



Fonte: Autoria própria

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (MIC_{100}), Concentração fungicida mínima (MFC_{100}) e atividade *in vitro* de antifúngicos contra *C. lusitanae*, com base na razão MFC_{100}/MIC_{100} (≤ 4 considerada fungicida, e > 4 fungistático). Os resultados são expressos como médias de dois experimentos independentes.

Antifúngico	MIC_{100} ($\mu\text{g/mL}$)	MFC_{100} ($\mu\text{g/mL}$)	MFC_{100}/MIC_{100}
Fluconazol	1	4	4
Itraconazol	0,0625	0,125	2
Cetoconazol	0,0625	0,25	4
Anfotericina B	1	2	2
Nistatina	4	8	2

Fonte: dados da pesquisa

DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de caso de peritonite por fungo do gênero *Candida* em gatos, especialmente pela espécie *C. lusitanae*. Em geral, relatos de candidíase em animais são raros⁶. Entre as 150 espécies existentes do gênero²⁴, 20 espécies são relatadas como agentes patogênicos em diferentes animais²⁵. *C. lusitanae* é raramente associada a infecções em humanos, sendo frequentemente relacionada a casos de candidemia⁵. Existem apenas nove relatos na literatura sobre peritonite por *C. lusitanae* em humanos²⁶. Em animais, este fungo já foi relatado em equinos, ocasionando ceratomicose, em bovinos levando à quadros de aborto e mastite²⁵, e na ave milhafre-real (*Milvus milvus*) provocando candidíase oral²⁷.

Candida lusitanae foi identificada pela primeira vez em 1979, em humano. Inicialmente, antes do início da terapêutica com anfotericina B, a levedura demonstrou inibição por esse polieno na concentração de 0,31 $\mu\text{g/mL}$. Todavia, após 20 dias da terapia com o antifúngico, adquiriu rapidamente resistência, e uma nova inibição só foi obtida com uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ ²⁸. Possivelmente nosso isolado apresentou inibição de 100% com 1 $\mu\text{g/mL}$ da anfotericina B, por não ter tido pressão seletiva anterior e por ter sido coletado antes da terapia antifúngica, uma vez que, *in vivo*, a *C. lusitanae* adquire rapidamente resistência²³.

A terapêutica de infecções por *C. lusitanae* ainda é desafiadora, uma vez que só há quatro classes de antifúngicos para tratamento sistêmico²⁹. A anfotericina B atua na membrana citoplasmática do fungo, especificamente no ergosterol, e a exposição da *C. lusitanae* a essa droga pode levar a mutações, alterando a biossíntese de ergosterol e, conseqüentemente, gerando resistência³⁰. Além disso, essa levedura vem apresentando perfis de multiresistências³¹.

Outro fator importante é a falta de pontos de corte de sensibilidade ou resistência utilizados para o tratamento clínico como referências para uma terapêutica mais assertiva³². Esses pontos de corte são estabelecidos pela CLSI e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que estabelecem esses pontos com base em testes *in vitro* e *in vivo*, avaliando a interação farmacodinâmica e farmacocinética. Para suprir essa necessidade, há valores de corte epidemio-

lógicos, que são definidos com base em ensaios *in vitro*, os quais tentam nortear um tratamento adequado para as espécies que carecem dessa informação³³. *C. lusitaniae* possui apenas pontos de corte epidemiológicos para alguns antifúngicos, sendo que o documento M59 da CLSI²³ traz a classificação para três dos cinco antifúngicos testados nesta pesquisa, demonstrando, ainda, a deficiência em estabelecer um ECV para espécies de *Candida* não-*albicans*.

É importante destacar que as infecções fúngicas estão cada vez mais frequentes, infectando cerca de 1 bilhão de pessoas anualmente³⁴. Os fungos, em sua maioria, estão normalmente presentes em microbiotas, mas uma parcela desses microrganismos ocasiona infecções em humanos, animais e plantas³⁵. Os animais podem contribuir com cerca de 75% das infecções por fungos em seres humanos, especialmente em indivíduos imunossuprimidos³⁴. Assim, é premente que haja uma intervenção pautada em *One health*, uma vez que há patógenos que podem ser transferidos de humanos para animais e vice-versa, como no caso da candidíase.

CONCLUSÃO

O isolamento de *C. lusitaniae* ocasionando peritonite em gato chama a atenção, uma vez que ainda não havia relatos sobre *Candida* spp. infectando líquido peritoneal de gatos. Apesar da dificuldade de classificação de isolados de *C. lusitaniae* como resistentes ou não a antifúngicos, chama a atenção o fato de que a relação entre o MIC₁₀₀ e o MFC₁₀₀ classificou que compostos antimicrobianos aqui testados tiveram ação fungicida, o que pode indicar uma ausência prévia de seleção por tratamento com drogas antifúngicas.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio da bolsa de doutorado de CFA. RDP é bolsista de Desenvolvimento Tecnológico do CNPq (310058/2022-8).

REFERÊNCIAS

1. Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2023 Feb;71:102237. doi: 10.1016/j.mib.2022.102237
2. Kämmer P, McNamara S, Wolf T, Conrad T, Allert S, Gerwien F, et al. Survival Strategies of Pathogenic *Candida* Species in Human Blood Show Independent and Specific Adaptations. *mBio*. 2020 Oct;11(5):1-21. doi: 10.1128/mBio.02435-20
3. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913
4. Mendoza-Reyes DF, Gómez-Gaviria M, Mora-Montes HM. *Candida lusitaniae*: biology, pathogenicity, virulence factors, diagnosis, and treatment. *Infect Drug Resist*. 2022 Ago;15: 5121-35. doi: 10.2147/IDR.S383785

5. Kumar S, Kumar A, Roudbary M, Mohammadi R, Černáková L, Rodrigues CF. Overview on the Infections Related to Rare *Candida* species. *Pathogens*. 2022 Ago;11(9):963. doi: 10.3390/pathogens11090963
6. Seyedmousavi S, Bosco S, De Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, et al. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med Mycol*. 2018 Mar;56(8):S165-87. doi: 10.1093/mmy/myx104
7. Cordeiro R de A, Sales JA, Castelo-Branco D de SCM, Brilhante RSN, Ponte YB de, dos Santos Araújo G, et al. *Candida parapsilosis* complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. *Vet Microbiol*. Dec 2017; 212:22-30. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.031
8. Reagan KL, Dear JD, Kass PH, Sykes JE. Risk factors for *Candida* urinary tract infections in dogs and cats. *J Vet Intern Med*. 2019 Mar;33(2):648-53. doi: 10.1111/jvim.15444
9. Volk SW. Peritonitis. *Small Animal Crit Care Med*. 2015 Jun:643-8. doi: 10.1016/B978-1-4557-0306-7.00122-7
10. Bradford K, Meinkoth J, Mckeirnen K, Love B. *Candida* peritonitis in dogs: Report of 5 cases. *Vet Clin Pathol*. 2013 Jun;42(2):227-33. doi: 10.1111/vcp.12047
11. Rogers CL, Gibson C, Mitchell SL, Keating JH, Rozanski EA. Disseminated candidiasis secondary to fungal and bacterial peritonitis in a young dog: Case Reports. *J Vet Emerg Crit Care*. 2009 Apr;19(2):193-8. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00405.x
12. Duchaussoy AC, Rose A, Talbot JJ, Barrs VR. Gastrointestinal granuloma due to *Candida albicans* in an immunocompetent cat. *Med Mycol Case Rep*. 2015 Dec;10:14-7. doi: 10.1016/j.mmcr.2015.12.002
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica. Brasília: Anvisa; 2013. P. 1-45.
14. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med*. 2018 Jun;6(12):240. doi: 10.21037/atm.2018.06.28
15. Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Ishii C, Miyabe A, et al. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Jun;400(7):1905-11. doi: 10.1007/s00216-011-4877-7
16. Lau AF. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight for Fungal Identification. *Clin Lab Med*. 2021;41(2):267-83. doi: 10.1016/j.cll.2021.03.006
17. Lu JJ, Lo HJ, Lee CH, Chen MJ, Lin CC, Chen YZ, et al. The use of maldi-tof mass spectrometry to analyze commensal oral yeasts in nursing home residents. *Microorganisms*. 2021 Jan;(1):1-13. doi: 10.3390/microorganisms9010142
18. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement – Third Ed. CLSI Document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
19. Wang J, Liu H, Zhao J, Gao H, Zhou L, Liu Z, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Molecules*. 2010 Ago;15(8):5807-17. doi: 10.3390/molecules15085807
20. Alex D, Gay-Andrieu F, May J, Thampi L, Dou D, Mooney A, et al. Amino acid-derived 1,2-benzisothiazolinone derivatives as novel

- small-molecule antifungal inhibitors: identification of potential genetic targets. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep;56(9):4630-9. doi: 10.1128/AAC.00477-12
21. Mussin J, Robles-Botero V, Casañas-Pimentel R, Rojas F, Angiolella L, San Martín-Martínez E, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of green synthesis silver nanoparticles targeting skin and soft tissue infectious agents. *Sci Reports.* 2021 Dec;11(1):1-12. doi: 10.1038/s41598-021-94012-y
22. Lamichhane RS, Boaz K, Natarajan S, Shrestha M. Assessment of Candidal carriage in patients with Type II Diabetes Mellitus. *J Pathol Nepal.* 2015 Feb;5(9):733-38. doi: 10.3126/jpn.v5i9.13784
23. CLSI. *Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing.* Third Ed. CLSI Document M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
24. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: an overview. *J Oral Maxillof Pathol.* 2014 Sep;18(Suppl 1):S81-5. doi: 10.4103/0973-029X.141325
25. Cabañes FJ. Yeast Pathogens of Domestic Animals. In: Ashbee R, Bignell E, editores. *Pathogenic Yeasts. The Yeast Handbook.* 2010 Sep:253-79.
26. Varda B, Alani M, Ahmed S. A Rare Case of Spontaneous Fungal Peritonitis Caused by *Candida lusitanae* in a Patient With Necrotizing Pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2021 Oct;116:S720. doi:10.7759/cureus.40237
27. Garcês A, Lopes R, Salinas D, Carreira M, Infante S, Lopes A, et al. First Report of Oral Candidiasis by *Candida lusitanae* in a Red Kite (*Milvus milvus*, Lineu 1758). *J Adv Veterinary Res.* 2022 Jun;12(3):321-3.
28. Pappagianis D, Collins MS, Hector R, Remington J. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979 Ago;16(2):123-6. doi: 10.1128/AAC.16.2.123
29. Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, Bicanic T, Bignell EM, Bowyer P, et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nat Rev Microbiol.* 2022 Mar;20(9):557-71. doi: 10.1038/s41579-022-00720-1
30. Young LY, Hull CM, Heitman J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9): 2717-24. doi: 10.1128/AAC.47.9.2717-2724.2003
31. Asner S, Giulieri S, Diezi M, Marchetti O, Sanglard D. Acquired Multidrug Antifungal Resistance in *Candida lusitanae* During Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov; 59(12):7715-22. doi: 10.1128/AAC.02204-15
32. Lockhart SR, Ghannoum MA, Alexander BD. Establishment and Use of Epidemiological Cutoff Values for Molds and Yeasts by Use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. *J Clin Microbiol.* 2017 Feb;55(5):1262-8. doi: 10.1128/JCM.02416-16
33. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* 2016 Jun;33(2):63-75. doi: 10.1016/j.riam.2016.04.001
34. Carpouren JE, de Hoog S, Gentekaki E, Hyde KD. Emerging Animal-Associated Fungal Diseases. *J Fungi.* 2022 Jun;8(6):611. doi: 10.3390/jof8060611
35. Langfeldt A, Gold JAW, Chiller T. Emerging Fungal Infections: from the Fields to the Clinic, Resistant *Aspergillus fumigatus* and Dermatophyte Species: a One Health Perspective on an Urgent Public Health Problem. *Current Clin Microbiol.* 2022 Sep; 9(4):46-51. doi: 10.1007/s40588-022-00181-3

Submetido em: 13/11/2023

Aceito em: 19/11/2023