

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E FATORES DE PATOGENICIDADE DE FUNGO ISOLADO NATURALMENTE DE LHAMAS (*Lama glama* - Linnaeus 1758) DO PARQUE ZOOLOGICO DE DOIS IRMÃOS, RECIFE-PE

[Laboratory diagnosis and pathogenic factors of fungi isolated naturally of Lhamas (*Lama glama* Linnaeus 1758) of the Parque Zoológico Dois Irmãos, Recife-PE]

Adriana Nunes de Lima <sup>1\*</sup>; Bruno Severo Gomes <sup>2</sup>; Ana Lizia Brito <sup>3</sup>; Rivania Oliveira <sup>3</sup>; Oliane Maria Correia Magalhães <sup>2</sup>; Cristina Maria de Souza-Motta <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Micologia. Centro de Ciências Biológicas. UFPE. Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, Recife – PE 50670-420.

<sup>2</sup> Professores do Departamento de Micologia. Centro de Ciências Biológicas. UFPE .

<sup>3</sup> Médicas Veterinárias - Parque de Dois Irmãos – Recife, PE.

**RESUMO** - No meio ambiente, tanto fungos filamentosos quanto leveduras podem desencadear micoses em humanos, e em outros animais. Com o objetivo de verificar a ocorrência e fatores de patogenicidade de fungos em lesões de animais do Parque Zoológico de Dois Irmãos foram coletados espécimes clínicos da região superior das patas traseiras das lhamas (*Lama glama*). De cada lhama foram realizadas seis coletas, três dos pêlos e três das escamas epidérmicas. Para o exame direto, os espécimes clínicos foram clarificados com hidróxido de potássio a 20%. Para isolamento dos agentes etiológicos, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata em pontos equidistantes na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (50 mg/L) contido em placas de Petri, as quais foram mantidas a temperatura ambiente (28±1°C) e a 37°C. A identificação dos fungos foi realizada utilizando-se as características macroscópicas, microscópicas. O exame direto dos espécimes clínicos da *Lama glama* não revelou estruturas fúngicas. Na cultura, em todos os pontos de inóculo foi detectado *Paecilomyces farinosus*. Pode-se observar com o teste de caracterização de patogenicidade o crescimento nas temperaturas ambiente 37° e 42°C que é um fator de patogenicidade. Nenhuma das culturas foi positiva para atividade fosfolipásica. Quanto à atividade proteásica o diâmetro da colônia foi de 6 cm e o halo da expressão enzimática foi ZA = 0,7 mm, considerado forte (+++). O diagnóstico laboratorial micológico nos casos relatados é de grande importância para o tratamento e cura, levando conseqüentemente a uma melhor qualidade de vida dos animais.

**Palavras-Chave:** Lhamas, *Paecilomyces farinosus*, Zoológico, Patogenicidade.

**ABSTRACT** - In the environment, both filamentous fungi and yeast may trigger fungal infections in humans and other animals. In order to assess the occurrence and pathogenicity factors of fungal lesions in the Park Zoo animals Brothers clinical specimens were collected from the upper hind legs of the two Llamas (*Lama glama*). In each one six collections were performed, three from the hair and three from the epidermal scales. For direct examination, clinical specimens were cleared with potassium hydroxide to 20%. For isolation of the etiologic agents, clinical specimens were plated in duplicate at equidistant points on the surface of Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol (50 mg / L) contained in Petri dishes, which were kept at room temperature (28 ° ± 1 ° C) and 37 ° C. Identification of fungi was performed using the macroscopic, microscopic. In the Lama's clinical specimens direct examination no fungal structures were revealed. In culture, in all points of inoculum, was detected *Paecilomyces farinosus*. With the characterization test of pathogenic growth with the environment temperatures, 37 and 42 C was possible to observe the growing of *Paecilomyces farinosus* which is a sign of a pathogenicity factor. None of the cultures were positive for phospholipase activity. In the protease activity of the colony the diameter was 06 cm and the enzymatic expression halo was ZA = 0.7 mm, what can be considered as a strong one (+++).

The mycological laboratory diagnosis in reported cases is of great importance for the treatment and cure, thus leading to a better quality of life of animals.

**Keywords:** Llamas, *Paecilomyces farinosus*, Zoo, Pathogenicity.

### INTRODUÇÃO

O conhecimento dos fungos como agentes causadores de processos infecciosos ou micoses é de

grande relevância, pois os quadros podem ser benignos sintomáticos, assintomáticos, graves e de rápida evolução, bem como os causadores de hipersensibilidade imediata ou tardia, promovendo

\* Auto para correspondência: nannylima1@hotmail.com

quadros alérgicos, ou intoxicações pela eliminação de toxinas, ou por ingestão de fungos macroscópicos toxígenos. O estudo da procedência e prevalência de fungos no solo e animais é importante, pois o princípio da profilaxia das micoses reside no conhecimento das fontes de infecção, ou seja, nos seus reservatórios, possibilitando com isso a elaboração de metodologias mais eficazes para o seu combate. Os animais domésticos e silvestres também desempenham papel de veiculadores de fungos, apresentando muitas vezes o agente sem sinais clínicos da doença (Veronesi, 1989).

Das milhares de espécies de fungos, são poucas as que tem capacidade de causar enfermidade em animais. É comum notarmos a proliferação de fungos, quando o animal esta em contato com áreas úmidas, pelo mesmo ter preferência pela umidade. No meio ambiente tanto fungos filamentosos quanto leveduras podem desencadear micoses em humanos assim como em outros animais como, bezerros, touros, lobos, cavalos, macacos, cães, gatos entre outros (Machado et al, 2008).

Os animais de Zoológicos vivem em áreas restritas, chamadas de recintos, nos quais qualquer alteração ou ocorrência nestes recintos traz conseqüências diretas ao comportamento e a saúde dos animais que nele vivem por isso “é de vital importância à observação constante das condições gerais dos recintos e dos animais, de modo a garantir a segurança dos animais, funcionários e público visitantes” (Rutiz et al, 1992).

*Lama glama* (Linnaeus 1758) pertencente à Ordem Artiodactyla, Família Camelidae, é um animal dócil, de fácil manejo, encontrada em toda América do Norte, Europa e Austrália. São mamíferos herbívoros que possuem distribuição ampla, adaptando-se a diferentes regiões da América do Sul. Esta denominação engloba tanto espécies domésticas como a *Lama glama* quanto espécies silvestres (Fowler & Cubas, 1992).

Com relação aos fungos, sabe-se que estes secretam muitas enzimas hidrolíticas em meios de cultura. Essas enzimas têm um papel importante no metabolismo fúngico, podendo estar envolvidas na patogenicidade da infecção, causando danos para as células hospedeiras e provendo nutrientes em um ambiente restrito (Ogawa et al, 1992).

Através de análises bibliográficas verifica-se que são raros ou inexistentes os trabalhos que abordam a ação patogênica dos fungos em animais de zoológicos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar o diagnóstico micológico e

verificar fatores de patogenicidade de fungos isolados naturalmente de lesões da região superior das patas traseiras da lhama (*Lama glama*) do Parque Zoológico de Dois Irmãos, Recife-PE.

## MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no Parque Zoológico de Dois Irmãos localizado a 08° 00' 30" Sul e 34° 56' 30" Leste sendo uma área de proteção ambiental do Estado de Pernambuco, localizada no bairro de Dois Irmãos, cidade de Recife. A reserva do Parque, considerada uma das maiores áreas de Mata Atlântica de Pernambuco, proporciona aos visitantes conhecer o ecossistema, suas plantas e seus animais nativos, como preguiças, sagüis, quatis, além de uma enorme variedade de pássaros. O Parque possui cerca de 850 animais entre aves, répteis e mamíferos distribuídos em mais de 120 espécies (Parque Dois Irmãos..., 2010).

Foram coletados espécimes clínicos da região superior das patas traseiras da lhama (*Lama glama* - Linnaeus 1758). Um total de 12 coletas, sendo seis coletas dos pêlos e seis das escamas epidérmicas, dos dois animais que apresentavam lesões sugestivas para a pesquisa de fungos. As coletas foram realizadas utilizando-se pinças esterilizadas para coleta dos pêlos e bisturis esterilizados para a escarificação das escamas epidérmicas.

As amostras originadas dos animais foram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, previamente identificadas com o nome do animal e local de coleta e em seguida conduzidas ao Laboratório de Micologia Médica, da Universidade Federal de Pernambuco.

Para o exame direto, os espécimes clínicos foram clarificados com hidróxido de potássio a 20%, entre lâmina e lamínula. Para isolamento, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata em pontos equidistantes na superfície do meio Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (50 mg/L) contido em placas de Petri, as quais foram mantidas as temperaturas ambientes (28±1°C) e 37°C. Observadas diariamente até 15 dias. Após o crescimento, procedeu-se à purificação da cultura. Após crescimento, foram transferidas para meios específicos de identificação ao nível de espécie. Para identificação de fungos filamentosos foram adotados os critérios taxonômicos clássicos (Domsch et al, 1993; Klich 2002; Lacaz et al., 2002).

Para detecção das enzimas protease e fosfolipase, os testes foram realizados em triplicata. Os semeios foram realizados transferindo-se fragmentos de culturas jovens com 72 horas de crescimento, para o centro da superfície do meio contido em placas. As três placas foram incubadas a 37°C e três a temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1° C). A produção de protease e de fosfolipase, foi constatada através da formação de halos em torno da cultura.

Para verificação da atividade proteásica foram utilizados como substrato a caseína do leite, em placa de Petri e gelatina em tubos de ensaio (Price et al., 1982). Para a observação da atividade proteásica em placa através da hidrólise da caseína no meio contendo leite desnatado Molico, depois de semeadas, as amostras foram observadas quanto ao crescimento e atividade enzimática, através da formação de halo, durante 15 dias. As amostras foram consideradas positivas para a detecção de protease, quando houve a formação de halo transparente ao redor das colônias. Para confirmar a produção da enzima, utilizou-se a solução acidificada de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>, 12 g; HCl concentrado, 16 mL; água destilada, 80 mL). A atividade enzimática é estimada pela diferença entre o diâmetro do halo formado e o diâmetro da colônia. A ausência de halo indica ausência de atividade de protease. O diâmetro da zona transparente ao redor das colônias em caseína do leite é mensurado para determinar a zona de atividade (ZA). A verificação da atividade proteásica utilizando a gelatina como substrato foi observada através da liquefação da gelatina contida em tubos mantidos a temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1° C).

Para verificação da atividade fosfolipásica foi adotado o método modificado de Price & Cawson (1977), onde o semeio foi realizado transferindo-se um fragmento da cultura para o centro de placas de Petri, e posteriormente mantido a temperatura ambiente (TA = 28°C ± 1°C) e a 37°C contendo o meio ágar Sabouraud adicionado de cloreto de sódio 1M, cloreto de cálcio 0,005M e duas gemas de ovo substituindo o “egg yolk da Difco Laboratories”(Serda & Yucel, 2002). A observação foi realizada no 5°, 10° e 15° dias, a qual é evidenciada através da formação e medição de um halo opaco ao redor da colônia, este foi medido em centímetros, para cálculo da zona de atividade (ZA), onde o diâmetro da colônia é dividido pela soma do diâmetro da colônia, somado ao tamanho da zona de precipitação de acordo com a seguinte fórmula:

$$ZA = \frac{\text{Ø da colônia}}{\text{Ø da colônia} + \text{Zona de precipitação}}$$

ZA: zona de atividade

Ø: diâmetro da colônia

Zona de precipitação: halo formado Interpretação: ZA igual ou maior 1.0 não detecção de atividade fosfolipásica, ZA menor que 1.0, detecção de atividade fosfolipásica.

Para interpretação são considerados: ZA entre 0.9 e 1 (+) muito fraca, 0.89-0.80 (++) fraca, 0.79-0.70 (+++) forte e ZA menor que 0.69 (++++) muito forte (Samson, 1974), que adaptaram a interpretação do método Price & Cawson (1977). De acordo com esse sistema, uma ZA fraca significa uma alta expressão da enzima, enquanto uma ZA forte indica baixa expressão. A detecção de fosfolipase foi realizada de acordo com a metodologia consultada (Price & Cawson, 1977).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espécimes clínicos, pêlos e escamas epidérmicas das lhamas foram obtidos de lesão descamativa, aspecto ligeiramente seco, com quadros de alopecia. O exame direto dos espécimes clínicos da *Lama glama* não revelou estruturas fúngicas. Entretanto, do pêlo e das escamas epidérmicas foi obtido a cultura em meio de Batata Dextrose Ágar do fungo *Paecilomyces farinosus*, apresentando colônia de coloração bege a marrom, aspecto pulverulento. As linhagens formaram apressórios simples e bifurcados, sendo estes importantes no processo de penetração e infecção do hospedeiro. Os conidióforos apresentaram-se de forma simples e em ramos verticilados, com duas a quatro fiálides. Estas características são peculiares da espécie (Samson et al, 1988, Sartafi et al, 1995). Este resultado foi mantido em todas as coletas.

Pôde-se observar com o teste de caracterização de patogenicidade o crescimento nas temperaturas ambiente 37° e também 42°C que é um fator de patogenicidade, visto que o crescimento acima de 37°C demonstra a capacidade de sobrevivência em organismos vivos. Nenhuma das culturas foi positiva para atividade fosfolipásica, onde a enzima fosfolipase poderia participar da degradação de

fosfolipídios presentes nas células do organismo. Quanto à atividade proteásica o diâmetro da colônia foi de 06 cm e o halo da expressão enzimática foi ZA = 0,7 mm, considerado forte (+++) (Samson, 1974). Foi detectada a presença de atividade proteolítica em *Paecilomyces farinosus* tanto em meio contendo gelatina (TA = 28°C ± 1° C), quanto em meio contendo a caseína (TA = 28°C ± 1° C) e a 37°C como substrato.

A atividade proteásica tem um importante papel na patogenicidade de fungos oportunistas (Samson, 1974), sendo a produção por fungos patógenos reconhecida como um importante fator de virulência. Acredita-se que o papel fisiológico das proteases durante a colonização do hospedeiro ocorre pela degradação das barreiras da pele e mucosa, digestão das proteínas para obtenção de nutrientes e ataque dos linfócitos e macrófagos, afetando a defesas imunes (Hube, 2000).

## CONCLUSÃO

O diagnóstico laboratorial micológico no caso relatado é de grande importância para o tratamento e cura, levando conseqüentemente a uma melhor qualidade de vida dos animais, tendo em vista que pouco se conhece sobre parâmetros ligados à saúde destes animais em cativeiro.

Embora a ZA tivesse sido forte, o que indica uma baixa expressão da enzima, fatores como imunidade baixa e elevado stress podem ter contribuído para o acarretamento da micose.

## REFERÊNCIAS

Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. 1993. *Compendium of soil fungi*. V. 18. 2ª. Ed. Eching, IHW-Verlag, 860p.

Fowler, M. E. & Cubas, Z. S. 2001. *Biology, medicine, and surgery of South American Wild Animals*. Iowa: Iowa State University, 536p.

Hube, B. 2000. *Exocellular proteases of human pathogenic fungi*. Contributions to Microbiology 5:126-137.

Klich, M. A. 2002. *Biogeography of Aspergillus species in soil and litter*. Mycologia, v. 94, p. 21-27.

Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M. & Takahasi de Melo, N. 2002. *Tratado de micologia médica*; 9. ed. São Paulo, Sarvier, 1104p.

Machado, J. A. C.; Rocha, J. R.; Santos, L. M.; Oliveira, A. C.; Antonio, N. S.; Canesin, R.; 2008. *Principais agentes etiológicos causadores de micoses cutâneas em eqüinos*. Revista Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano VI. Nº 11. Capturado em 20 de dezembro de 2010. On line. Disponível na internet em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisao/edic-vi-n11-RL79.pdf>

Ogawa, H.; Nozaway Y.; Rojanavanich, V.; Tsuboi R.; Yoshiike, T.; Banno Y.; Takahashi, M.; Nombela C.; Herreros, E.; Garcia-Saez, M. I.; 1992. *Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infection*. Journal of Medical and Veterinary Mycology 30:189-196. In: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(1):63-66, 2009.

Parque de Dois Irmãos. O Parque - *Histórico*. Capturado em 20 de dezembro de 2010. On line, disponível na internet em: <http://www.portaisgoverno.pe.gov.br/web/parque-dois-irmaos/historico> .

Price, M. F. & Cawson, R. A. 1977. *Phospholipase activity in Candida albicans*. Sabouraudia. 15(1): 179 -185. In: J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis vol.17 nº.4 Botucatu, 2011.

Price, M. F.; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. 1982. *Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans*. Sabouraudia. 20(1) : 7-14.

Rutiz, A. J.; Francisco, L. R.; Silva, M. E. P. F. Cubas, Z. S.; 1992. *Manual do tratador de animais*, Zoológico de Curitiba.

Serda S. K & Yucel A. 2002. *Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains*. Mycoses. 45:160-165.

Samson, R. A. *Paecilomyces and some allied Hyphomycetes*. 1974. Studies in Mycology, v.6, p.1-119.

Samson, R. A & Latgé, J. P. 1988. *Taxonomy of Entomopathogenic*. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Berlin: Springer-Verlag, 187p.

Sartafi, J.; Boucias, D. G.; Latgé, J. P. 1995. *Antigens of Aspergillus fumigatus produced in vivo*. Journal of Medical and Veterinary Mycology 33:9-14.

Veronesi, R. 1989. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. In: Lacaz C. S. *Micoses*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.