

LEVANTAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EM ESCAMAS DE *Crotallus durissus terrificus* CRIADAS EM CATIVEIRO

Costa, A.C.B.P.¹, Teodoro, G.R.¹, Oliveira, F.E.², Pereira, C.A.¹ Crosariol, S.K.³

¹ Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Microbiologia/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos / carol_bilog@yahoo.com.br

² Universidade do Vale do Paraíba/ Centro de Estudos da Natureza-Serpentário/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos / serpentariocen@univap.br

³ Universidade do Vale do Paraíba/ Laboratório de Microbiologia/ Av. Shishima Hifumi, 2911 Urbanova São José dos Campos / soniak@univap.br

Resumo- No Brasil, uma das espécies mais criadas em cativeiro é a *Crotallus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel, sendo os cativeiros de serpentes, locais propícios para desenvolvimento fúngico. O estudo teve com o objetivo isolar e identificar as classes e/ou gêneros de fungos em escamas de cascavéis criadas em cativeiro dentro de uma universidade particular no Vale do Paraíba. A coleta foi realizada na região dorso-ventral de 20 cascavéis com auxílio de um "swab" estéril embebido em solução fisiológica estéril. Após a coleta, realizou-se o método de "Pour-plate" em ágar Sabouraud mais cloranfenicol e incubação a temperatura ambiente, durante 10 dias. Em seguida, as colônias fúngicas foram isoladas em ágar Batata, de onde se realizou o microcultivo em lâmina, ocorrendo a identificação macroscópica e microscópica dos fungos. Os resultados obtidos demonstraram que 80% das amostras foram positivas para fungos filamentosos. Os fungos isolados com maior frequência foram, respectivamente, *Aspergillus spp.*(25%), *Penicillium spp.*(20%), *Pestalotia spp.*(5%), *Acremonium spp.*(5%), Zigomicetos (5%) e Dermatófitos (5%). Os resultados despertam interesse no conhecimento e controle da microbiota fúngica em cativeiros de serpentes, para prevenção de micoses.

Palavras-chave: Cascavéis, cativeiro, fungos filamentosos.

Área do Conhecimento: Microbiologia.

Introdução

A serpente *Crotallus durissus terrificus*, conhecida como cascavel, é uma das espécies mais criadas em cativeiro no Brasil, caracteriza-se por cabeça triangular, um par de fossetas loreais, olhos pequenos com pupilas em fenda, escamas sobre a cabeça e dentes inoculadores de veneno (solenóglifa). Na porção terminal da cauda encontra-se o guizo ou chocalho, característica do gênero. Esta espécie é encontrada em regiões secas e pedregosas, não sendo encontrada em florestas e matas úmidas (PIRES, 2004).

Em cativeiro, esta serpente encontra um ambiente úmido, morno, ventilado e convivem com outros animais (NICHOLS *et al.*, 1999); (MILLER *et al.*, 2004); (BORGES, 2001). Estas características favorecem a contaminação dos cativeiros com fungos filamentosos, dos quais fungos oportunistas de origem ambiental têm sido identificados como causadores de micoses em serpentes (MILLER *et al.*, 2004); (BERTELSEN *et al.*, 2005). Muitos destes fungos são considerados microrganismos da microbiota normal de répteis em cativeiro (PARÉ *et al.*, 2003).

Doenças micóticas têm sido devastadoras para as serpentes, tem sido sugerido que estresse associado com captura e transporte, aglomeração, variação de temperatura, nutrição

pobre e histórico de doença fúngica são fatores que contribuem para a infecção (BERTELSEN *et al.*, 2005).

Fungos considerados saprófitos têm sido relatados como agentes etiológicos de micoses em serpentes. A espécie *Aspergillus spp.* foi encontrada em lesão pulmonar de uma fêmea de anaconda (*Eunectes murinus*) nascida em cativeiro (MILLER *et al.*, 2004). As espécies *Trichophyton spp.*, *Verticillium spp.*, *Alternaria spp.*, *Chrysosporidium* anamorfo de *Nannizziopsis vriesii*, *Sporothrix schenckii*, *Pestalotia pezizoides* e *Paecilomyces spp.*, foram relatados como agentes causadores de micose cutânea em serpentes (MILLER *et al.*, 2004); (BERTELSEN *et al.*, 2005); (CHEATWOOD *et al.*, 2003); (NICHOLS *et al.*, 1999). Casos de envolvimento de tecidos e órgãos internos também foram relatados como agentes fúngicos as espécies *Sporothrix schenckii*, *Pestalotia pezizoides*, *Paecilomyces spp.*, *Zigomicetos* e *Fusarium spp.* (CHEATWOOD *et al.*, 2003); (KAPLAN *et al.*, 1983); (HOLZ *et al.*, 2000).

Devido a contaminação e a proliferação de fungos filamentosos saprófitos em cativeiro de serpentes, estes casos vem ganhando destaque na literatura, pois normalmente doenças micóticas em serpentes podem ser fatais. O presente trabalho objetivou identificar as classes e/ou

gêneros de fungos filamentosos em escamas de 20 cascavéis criadas em cativeiro de uma universidade particular do Vale do Paraíba.

Materiais e Métodos

As amostras foram coletadas de 20 serpentes da espécie *Crotallus durissus terrificus* nascidas e criadas em cativeiro. Destas 20 serpentes, 11 eram animais adultos e 9 eram filhotes, das quais todas apresentavam escamas saudáveis. No solário (ambiente externo) ficavam 10 animais adultos e 1 serpente adulta estava em quarentena. Todos os filhotes eram mantidos dentro de aquários perfurados na porção superior.

FIGURA 1- Dados em UFC/mL de cada amostra positiva.

A coleta foi feita nos dias 29 e 30 de março de 2005. Para a coleta das amostras, imobilizou-se as serpentes e com o "swab" embebido em solução fisiológica estéril à 0,85% fez-se a coleta passando o "swab" sobre as escamas na direção dorso-ventral da região central do corpo do animal. Retornou-se o "swab" para o tubo de tampa de rosca com a solução fisiológica.

Após a coleta, realizou-se a técnica de Pour Plate em ágar Sabouraud-Dextrose (DIFCO) mais cloranfenicol. Em placas de Petri foi pipetado 1mL do inóculo primário e derramado 20 mL do meio de cultura à 45-50°C, esta mistura foi homogeneizada. Após a solidificação dos meios de cultura, as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 7 a 10 dias. Nas placas que apresentaram crescimento incontável de colônias fúngicas, fez-se diluições de 1:10 e 1:100 do inóculo primário e realizou-se a técnica de Pour-Plate.

Decorrido o tempo de incubação, as colônias de fungos filamentosos foram contadas através do contador de colônias (PHOENIX) e representadas por Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro (mL). Selecionou-se as colônias predominantes de cada placa e fez-se o repique destas em tubos com ágar Batata-Dextrose (DIFCO) para obtenção de culturas puras isoladas. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 7 a 10 dias.

Após o crescimento dos fungos isolados, anotou-se as características das colônias, como coloração, textura e topografia para auxílio na posterior identificação macroscópica.

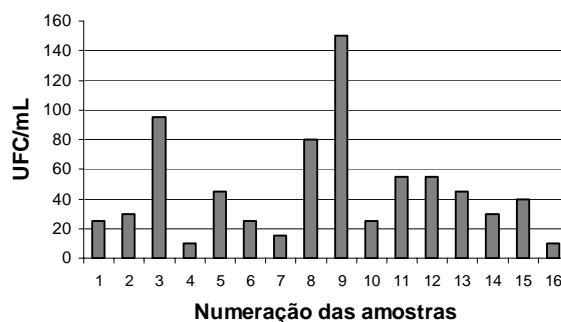
Fez-se o microcultivo em lâmina dos fungos isolados, em que estes foram repicados em quatro regiões do bloco de 1cm² de ágar Batata-Dextrose e coberto com uma lamínula. A lâmina com o bloco de ágar foi armazenada em uma placa de Petri sobre duas varetas. Na placa havia gaze umedecida com água destilada estéril, para manter o ambiente úmido. As placas foram incubadas à temperatura ambiente de 9 a 15 dias.

Após o crescimento dos fungos, a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de azul de lactofenol. O preparado foi aquecido até liberar bolhas. Após este procedimento, a lâmina foi vedada com esmalte incolor e observada ao microscópio óptico. As hifas e corpos de frutificação observados foram fotografados e as características anotadas para posterior identificação microscópica.

Resultados

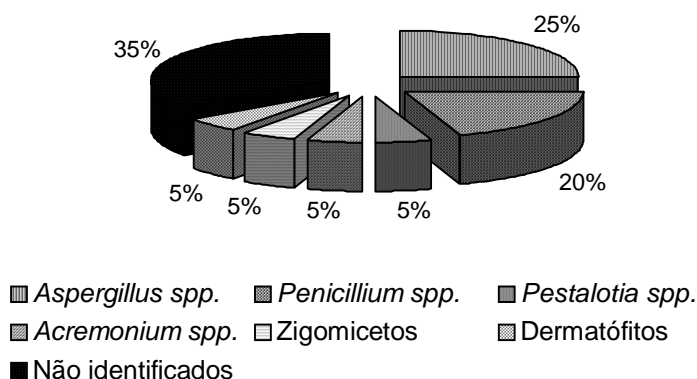
Das 20 amostras coletadas, 80% apresentaram positividade para fungos filamentosos. Fez-se a contagem das colônias fúngicas das amostras positivas para a diluição de 1:10, exceto para a amostra 9 em que a contagem foi feita para a diluição de 1:100 e para as amostras 2, 4, 5, 6 e 7 a contagem foi feita com as placas dos inóculos primários (FIGURA 1).

FIGURA 1- Dados em UFC/mL de cada amostra positiva.



Dos 20 fungos filamentosos, que foram isolados e identificados através das características macroscópicas e microscópicas, obteve-se 4 gêneros diferentes, 1 Zigomiceto e 1 Dermatofito (FIGURA 2).

FIGURA 2- Dados percentuais dos fungos isolados.



Discussão

De acordo com os resultados obtidos com a contagem das colônias, este estudo não apresenta referências em que pode-se comparar o número de colônias e espécies prevalentes na microbiota normal de serpentes em cativeiro.

Pode-se observar que os fungos filamentosos identificados são fungos saprófitos, sendo comumente isolados do solo, fezes de animais, vegetais, matéria orgânica em decomposição, ar atmosférico e animais, mas existindo fatores predisponentes, estes podem se tornar patogênicos levando a quadros graves de micoses que podem ser fatais (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Neste estudo foi observado a prevalência do gênero *Aspergillus spp.* (25%), o qual é um fungo bastante comum presente no solo, detritos vegetais, ar atmosférico e lesões humana e animais (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991). Este é considerado agente oportunista por excelência. Miller *et al.* (2004) isolaram este gênero de lesões pulmonares de uma anaconda nascida e criada em cativeiro, a qual esta já havia apresentado histórico clínico de infecção micótica cutânea.

O segundo achado mais prevalente foi o fungo do gênero *Penicillium spp.* (20%), porém este não apresenta referência na literatura de colonização ou infecção em serpentes.

O gênero *Pestalotia spp.* (5%) encontrado foi descrito por Cheatwood *et al.* (2003) como agente causador de estomatite, dermatite granulomatosa, oftalmite com envolvimento subjacente da musculatura e outros tecidos moles em necropsia de três cascavéis da espécie *Sistrurus miliarius basbouri*.

Infecções micóticas causadas por Zigomicetos foram observadas em cortes histológicos da pele de serpentes e em infecções disseminadas com envolvimento subcutâneo e tecidos viscerais em serpentes criadas em cativeiro por Miller *et al.* (2004) e Kaplan *et al.* (1983), respectivamente. Esta classe foi identificada em 5% dos isolados.

Em nossos isolados foram identificados 5% de dermatófitos, em que este é responsável por micoses superficiais bastante comuns em animais em cativeiro, como descrito por Miller *et al.* (2004) em amostras de pele, o qual foi identificado o gênero *Trichophyton spp.*

O gênero *Acremonium spp.* encontrado em 5% dos isolados é um fungo amplamente distribuído na natureza, entretanto não foi encontrada referências de colonização ou infecção em serpentes.

Os 35% dos fungos isolados não foi possível a identificação, sugere-se que este resultado encontrado ocorreu devido a dificuldade na identificação dos corpos de frutificação de fungos filamentosos saprófitos.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados na microbiota fúngica das serpentes, foi possível observar a importância na identificação desses fungos filamentosos considerados saprófitos que em condições predisponentes podem levar a quadros de infecções fúngicas que podem ser fatais.

O conhecimento da microbiota fúngica encontrada em serpentes criadas em cativeiro é importante para a realização do controle desta microbiota, afim de se evitar infecções fúngicas, como a desinfecção do ambiente e isolamento das serpentes doentes, e tratamento adequado dessas infecção quando presentes.

Referências

- PIRES, L.S. Estudo epidemiológico de acidentes ofídicos na cidade de São José dos Campos (SP) e municípios adjacentes. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2004.
- NICHOLS, D.T. *et al.* Fatal mycotic dermatitis in captive brown tree snakes (*Boiga irregularis*). J.Zoo.Wildl.Med. v.30, n.1, p.111-118, 1999.
- MILLER, D.L. *et al.* Cutaneous and pulmonary mycosis in green anacondas (*Eunectes murinus*). J.Zoo.Wildl.Med. v.35, n.4, p.557-561, 2004.
- BORGES, R.C. Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em caso de acidentes. São Paulo: Atheneu, 2001.
- BERTELSEN, M.F. *et al.* Fatal cutaneous mycosis in tentacled snakes (*Erpeton tentaculatum*) caused by the *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. J.Zoo.Wildl.Med. v.36, n.1, p.82-87, 2005.
- PARÉ, J.A. *et al.* Cutaneous mycobiota of captive squamate reptiles with notes on the scarcity of *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. J.Herpetol.Med.Sug. v.13, p.10-15, 2003.
- CHEATWOOD, J.L. *et al.* Na outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. J.Wildl.Dis. v.39, n.2, p.329-337, 2003.

- KAPLAN, W. *et al.* A zygomycotic infection in captive snakes. *Sabouraudia*. v.21, n.2, p.85-91, 1983.

- HOLZ, P.H. *et al.* Systemic *Fusarium* infection in two snakes, *Carpentophryne*, *Morelia spilota variegata* and a red-bellied black snakes, *Pseustes porphyriacus*. *J.Herpetol.Med.Surg.* v.10, n.2, p.18-20, 2000.

- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1991.