

Isolamento de leveduras patogênicas da microbiota superficial de tamanduás mantidos em cativeiro

Isolation of pathogenic yeasts from the surface microbiota of anteaters held in captivity

Aislamiento de levaduras patogénicas de la microbiota superficial de osos hormigueros en cautividad

Recebido: 06/12/2021 | Revisado: 11/12/2021 | Aceito: 12/12/2021 | Publicado: 21/12/2021

Henri Donnarumma Levy Bentubo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0091-2504>

Universidade Paulista, Brasil

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

E-mail: hbentubo@yahoo.com.br

Flávia Regina Miranda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3804-3781>

Grupo de trabalho pela conservação do tamanduá no Brasil, Brasil

Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil

E-mail: flaviamiranda@yahoo.com

Cátia Dejuste de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9769-4915>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: cdejuste@gmail.com

Selene Dall'Acqua Coutinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9715-6500>

Universidade Paulista, Brasil

E-mail: selene@uol.com.br

Resumo

A composição da microbiota fúngica do pelame de animais silvestres ainda é pouco conhecida. Estabelecer parâmetros microbiológicos que permitam prever eventos infecciosos oportunistas nesses animais pode ser útil na preservação de espécies ameaçadas de extinção. O objetivo dessa investigação foi isolar e identificar leveduras de potencial patogênico do pelame de tamanduás mantidos em cativeiro. Vinte e sete tamanduás, provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zôo-Sorocaba, SP) foram pesquisados. Catorze espécimes serão de tamanduá-bandeira (*Mymercophaga tridactyla*) e 13 de tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), dos quais, 63% machos e 37%, fêmeas. A técnica do quadrado do carpete foi empregada na obtenção das amostras de pelame. As leveduras isoladas foram identificadas por meio de suas características morfológicas e por método semi-automatizado ID-32C[®]. Para descrever as variáveis obtidas por meio do instrumento de pesquisa, foram verificadas a frequência de ocorrência e os resultados foram expressos em valores relativos. Foram isoladas, no total, 33 leveduras a partir das amostras de pelame dos 27 tamanduás. As espécies de leveduras isoladas foram: oito *Candida guilliermondii* (24,2%), três *C. famata* (9,1%), três *C. kefyr* (9,1%), duas *C. glabrata* (6,1%), três *Cryptococcus laurentii* (9,1%), um *C. humicola* (3,0%), seis *Geotrichum candidum* (18,2%), três *Malassezia pachydermatis* (9,1%), duas *Rhodotorula glutinis* (6,1%) e dois *Trichosporon asahii* (6,1%). Pode-se concluir que leveduras reconhecidas patogênicas podem colonizar a microbiota do tegumento de tamanduás-bandeira e tamanduás-mirim mantidos em cativeiro e representam potencial risco de infecção oportunista para esses animais.

Palavras-chave: Leveduras patogênicas; Microbiota normal; Tamanduá-bandeira; Tamanduá-mirim.

Abstract

The composition of the fungal microbiota in the fur of wild animals is still poorly known. Establishing microbiological parameters that allow predicting opportunistic infectious events in these animals can be useful in the preservation of endangered species. The aim of this investigation was to isolate and identify potentially pathogenic yeasts from the coat of anteaters kept in captivity. Twenty-seven anteaters, from the Parque Zoológico de São Paulo Foundation (FPZSP) and Quinzinho de Barros Municipal Park (Zôo-Sorocaba, SP) were surveyed. Fourteen specimens will be giant anteater (*Mymercophaga tridactyla*) and 13 anteater (*Tamandua tetradactyla*), of which 63% males and 37% females. The carpet square technique was used to obtain the skin samples. Isolated yeasts were identified by their morphological characteristics and by semi-automated ID-32CTM method. To describe the variables obtained through the research instrument, the frequency of occurrence was verified and the results were expressed in relative values. A total of 33 yeasts were isolated from the skin samples of the 27 anteaters. The yeast species isolated

were: eight *Candida guilliermondii* (24.2%), three *C. famata* (9.1%), three *C. kefyr* (9.1%), two *C. glabrata* (6.1%), three *Cryptococcus laurentii* (9.1%), one *C. humicola* (3.0%), six *Geotrichum candidum* (18.2%), three *Malassezia pachydermatis* (9.1%), two *Rhodotorula glutinis* (6.1%) and two *Trichosporon asahii* (6.1%). It can be concluded that yeasts known to be pathogenic can colonize the integument microbiota of giant anteaters and anteaters kept in captivity and represent a potential risk of opportunistic infection for these animals.

Keywords: Pathogenic yeasts; Normal microbiota; Giant anteater; Baby anteater.

Resumen

La composición de la microbiota fúngica en el pelaje de los animales salvajes es aún poco conocida. Establecer parámetros microbiológicos que permitan predecir eventos infecciosos oportunistas en estos animales puede ser útil en la preservación de especies amenazadas. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar levaduras potencialmente patógenas del pelaje de osos hormigueros mantenidos en cautiverio. Se encuestó a 27 osos hormigueros, de la Fundación Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) y del Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zôo-Sorocaba, SP). Catorce ejemplares serán oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*) y 13 oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*), de los cuales 63% machos y 37% hembras. Se utilizó la técnica de la alfombra cuadrada para obtener las muestras de piel. Las levaduras aisladas se identificaron por sus características morfológicas y por el método semiautomático ID-32C[®]. Para describir las variables obtenidas a través del instrumento de investigación, se verificó la frecuencia de ocurrencia y los resultados se expresaron en valores relativos. Se aislaron un total de 33 levaduras de las muestras de piel de los 27 osos hormigueros. Las especies de levadura aisladas fueron: ocho *Candida guilliermondii* (24,2%), tres *C. famata* (9,1%), tres *C. kefyr* (9,1%), dos *C. glabrata* (6,1%), tres *Cryptococcus laurentii* (9,1%), una *C. humicola* (3,0%), seis *Geotrichum candidum* (18,2%), três *Malassezia pachydermatis* (9,1%), dos *Rhodotorula glutinis* (6,1%) y dos *Trichosporon asahii* (6,7%). Se puede concluir que las levaduras que se sabe que son patógenas pueden colonizar la microbiota del tegumento de osos hormigueros gigantes y osos hormigueros mantenidos en cautiverio y representan un riesgo potencial de infección oportunista para estos animales.

Palabras clave: Levaduras patógenas; Microbiota normal; Oso hormiguero gigante; Oso hormiguero bebé.

1. Introdução

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), um mamífero endêmico do cerrado brasileiro, é espécie atualmente considerada em vulnerabilidade de extinção. Entidades como a “União Internacional de Conservação da Natureza” (IUCN) incluem o tamanduá-bandeira em sua “Lista Vermelha” de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2021). No Brasil, o tamanduá faz parte da “Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção” (ICMBio, 2021) e é classificado como espécie “criticamente em perigo” pelo “Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Estado do Paraná” (Braga, 2003). Pouco se conhece sobre a microbiota fúngica de espécimes selvagens, dessa forma, a oportunidade de se incluir esses animais neste trabalho caracteriza objeto de interesse científico. A realização da investigação sobre a presença de leveduras de potencial patogênico na microbiota de tamanduás, permitirá a implementação de futuros programas sanitários que tenham por objetivo a conservação daquelas e outras espécies ameaçadas de extinção (Bentubo et al, 2006).

A maior parte das evidências patológicas envolvendo tamanduás restringe-se a relatos de traumas, isto é, eventos de atropelamento em beira de estradas e casos de morte decorrente das consequências da destruição dos habitats (Weiss & Vianna, 2012). Pouco se conhece acerca do status sanitário das espécies de tamanduá. Alguns autores têm se dedicado ao estudo de ectoparasitas nesses animais, como carrapatos, importantes vetores de doenças infecciosas para animais domésticos (Martins et al, 2004). Levantamentos realizados na região amazônica sugerem que os tamanduás também sejam portadores de *Leishmania* sp e *Tripanossoma* sp (Gottdenker et al, 2012; Muñoz-García et al, 2019). A presente pesquisa é dedicada ao estudo da presença e diversidade de leveduras de potencial patogênico, incluindo àquelas consideradas emergentes e oportunistas em quadros infecciosos na intenção de elucidar esse aspecto ecológico da colonização de tamanduás.

A microbiota fúngica que compõe a superfície corpórea dos seres vivos é constitutivamente dinâmica, ou seja, sofre periodicamente, mudanças qualitativas e/ou quantitativas. Essas mudanças decorrem, em grande parte, de fatores ambientais, como, localização geográfica, sanidade e condições climáticas (temperatura e o tempo de exposição à luz ultravioleta) (Araújo et al, 2003). Dentre os fungos que constituem a microbiota superficial do homem, as leveduras apresentam destacada

importância, principalmente em indivíduos neutropênicos (Sun et al, 2015). Os fungos leveduriformes mais comumente isolados são: *Candida* spp. (Crocco et al, 2004; Oliveira et al, 2006), *Rhodotorula* spp. (Garcia-Martos et al, 2004; Lunardi et al, 2006; Riedel et al, 2007), *Malassezia* spp. (Scholotfeldt et al, 2002; Tarazooie et al, 2004; Oliveira et al, 2006) e *Trichosporon* spp. (Girmenia et al, 2005).

A emergência de novos patógenos fúngicos, mas de grande importância médica e veterinária, tem contribuído para o aumento da morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Infecções fúngicas invasivas são causa significativa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (Fisher & Sterbeck, 2005; Sun et al, 2015). Entre os pacientes humanos, aqueles com câncer, diabetes, transplantados de órgãos, etc, constituem uma nova população de doentes, dos fins do século XX e início do século XXI, que apresentam maior sobrevida devido a técnicas cirúrgicas mais agressivas, regimes terapêuticos com emprego de novos fármacos e diagnósticos mais aprimorados. Em Medicina Veterinária, a evolução dos protocolos terapêuticos para doenças alérgicas e a terapia anticâncer representam os principais eventos que permitiram aumentar a longevidade dos animais. Contudo, os fatores predisponentes às infecções fúngicas oportunistas ainda são pouco estudados e, por isso, pouco se conhece a seu respeito. Essa população da “nova era”, ao mesmo tempo, que atinge maior longevidade, também está mais sujeita a infecções oportunistas por patógenos emergentes (Giusiano et al, 2004; Silva & Girmenia et al, 2005).

Uma vez que a microbiota residente/transitória caracteriza fonte de infecção para indivíduos imunocomprometidos, estudos ecológicos a respeito da diversidade de espécies de leveduras potencialmente patogênicas, como aquelas do gênero *Trichosporon*, que compõem a biota normal da superfície corpórea de animais representam importante passo no estudo da epidemiologia de infecções dessa natureza. O desconhecimento sobre a diversidade fenotípica e fatores associados à virulência das leveduras que ocorrem em nosso meio justificam a presente pesquisa. O objetivo da presente pesquisa foi investigar a frequência de isolamento de leveduras potencialmente patogênicas e consideradas emergentes em infecções oportunistas que compõem a microbiota superficial do pelame de tamanduás mantidos em cativeiro, bem como, caracterizar os isolados leveduriformes por meio de kit comercial semi-automatizado ID 32 C® (Biomérieux®).

2. Metodologia

2.1 Animais

Leveduras patogênicas oportunistas foram pesquisadas em 27 tamanduás, provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zôo-Sorocaba, SP), ambos, integrantes do projeto de pesquisa multicentralizado idealizado pelo Grupo de Trabalho pela Conservação do Tamanduá no Brasil (GCTB-IBAMA). Catorze espécimes de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e 13 espécimes de tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), dos quais, 63% eram machos e 37%, fêmeas serão incluídos na presente investigação. A contenção dos animais será realizada por técnicos designados pela coordenação geral do projeto e seguirá em acordo com os protocolos estabelecidos pelos médicos veterinários responsáveis pelos animais em suas respectivas instituições de albergue.

2.2 Colheita das amostras

As amostras foram obtidas por meio da fricção de quadrados de carpete (Mariat & Adam-Campos, 1967; Bentubo et al, 2006) no pelame do dorso dos animais estudados. Quadrados de carpete de, aproximadamente, 5x5 centímetros foram lavados com água e detergente neutro, enxaguados e mantidos em água corrente por 24 horas para garantir que estivessem livres de quaisquer resíduos de produtos químicos. Em seguida, os carpetes foram envolvidos em um invólucro composto por duas camadas. A camada interna era de papel alumínio e a externa de papel pardo. Cada quadrado de carpete foi esterilizado

em autoclave para uso. A caracterização das amostras foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBMC) da Universidade Paulista –UNIP (CLININFEC-CNPq), São Paulo, SP, Brasil.

2.3 Caracterização morfológica dos isolados

Todas as amostras foram semeadas uniformemente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Difco®) acrescidas de 0,5% de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente até que fosse evidenciado crescimento microbiano. Cada colônia foi agrupada de acordo com sua semelhança macroscópica, isolada e repicada em triplicata para tubos contendo o mesmo meio; repiques periódicos eram realizados para manter a viabilidade das amostras. Todos os cultivos leveduriformes foram submetidos à técnica de microcultivo em lâmina conforme preconiza Porto et al (1981). Cada amostra foi semeada em estrias sobre lâminas contendo meio de ágar-fubá acrescido de Tween 80. Posteriormente, as estrias foram cobertas com lamínula de vidro e cada placa será incubada a 30°C durante 24 horas e submetida à leitura para verificação de suas características morfológicas microscópicas (Kurtzman & Fell, 1998; De Hoog et al, 2004).

2.4 Caracterização bioquímica dos isolados

Todas as amostras foram testadas para a produção de urease em meio de ágar uréia de Christensen (Christensen, 1946) e para a fermentação de carboidratos (Wickerham, 1951). Cepas-padrão de *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e *Candida albicans* (ICB 12A) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

2.5 Identificação semi-automatizada das leveduras (ID 32 C, Biomerieux®)

Para a realização das provas de identificação de leveduras pelo método ID 32 C (Biomerieux®), os isolados foram semeados em ASD e incubados por 24-72h a 30°C. Suspensão de microrganismos será preparada em tubos contendo 2mL de água destilada esterilizada de acordo com o tubo 2,0 da escala de MacFarland. Duzentos e cinquenta microlitros (250µL) de cada inóculo serão dispensados numa ampola contendo meio de assimilação de carbono. Após homogeneização, 135µL de cada diluição serão adicionados a cada poço da galeria de ID 32 C, as quais foram incubadas em câmara úmida sob 30 °C de temperatura, durante 72h e submetidas à leitura a cada 24h, conforme orientação do fabricante. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentarem turvação superior a do controle negativo. O perfil numérico obtido na leitura visual será analisado pelo programa Apiweb® (Fricker-Hidalgo et al, 1996). Foram considerados identificados os isolados que apresentaram níveis de acurácia $\geq 85\%$ à leitura no programa.

2.6 Análise dos resultados

Para descrever as variáveis obtidas por meio do instrumento de pesquisa, foi verificada a frequência de ocorrência de cada espécie de levedura dentro do total de isolados obtidos. Os resultados foram expressos em números absolutos (N) e relativos (%).

3. Resultados e Discussão

Em relação às espécies silvestres, ainda são pouco expressivos os trabalhos de pesquisa relacionados aos aspectos elementares da sanidade desses animais. A crescente preocupação com o meio ambiente e a necessidade da conservação da fauna brasileira endêmica tem estimulado iniciativas pioneiras por todo o país. É o caso do Grupo de Trabalho pela Conservação do Tamanduá no Brasil (GCTB) que, sediado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP), tem como missão promover ações que favoreçam a conservação das espécies de tamanduá no Brasil. Por meio de uma colaboração científica estabelecia entre GCTB e o Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBMC) da Universidade Paulista –UNIP

onde também está sediado o CLININFEC (Grupo de Pesquisa em Clínica e Doenças Infecciosas, cadastrado no CNPq) foi desenvolvido o presente trabalho.

Foram isoladas 33 leveduras a partir das amostras de pelame dos 27 tamanduás investigados. Mais de um isolado leveduriforme por amostra foi obtido em alguns casos, como pode ser observado na Tabela 1. As demais espécies isoladas foram: *Candida guilliermondii* (N=8), *C. famata* (N=3), *C. kefyf* (N=3), *C. glabrata* (N=2), *Cryptococcus laurentii* (N=3), *C. humicola* (N=1), *Malassezia pachydermatis* (N=3), *Geotrichum candidum* (N=6), *Rhodotorula glutinis* (N=2) e *Trichosporon asahii* (N=2).

Tabela 1: Isolamento de leveduras da microbiota do pelame de 27 tamanduás sadios provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil) e Parque Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba-SP, Brasil).

Espécie	Sexo	Nº amostra	Identificação da amostra	Identificação do isolado
T. bandeira	Macho	01	28666	<i>Rhodotorula glutinis</i>
T. bandeira	Fêmea	02	14777	<i>Candida kefyf</i>
T. bandeira	Macho	03	22760	<i>Candida famata, Trichosporon asahii</i>
T. bandeira	Macho	04	25106	<i>Candida guilliermondii</i>
T. bandeira	Macho	05	16446	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Macho	06	22759	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T. bandeira	Macho	07	27109	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T. mirim	Macho	08	25848	<i>Cryptococcus humicola, Malassezia pachydermatis</i>
T. mirim	Macho	09	28097	<i>Candida kefyf</i>
T. mirim	Macho	10	20979	<i>Candida famata</i>
T. mirim	Fêmea	11	20679	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Macho	12	28948	<i>Candida glabrata</i>
T. mirim	Fêmea	13	28949	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Macho	14	MC38484	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Fêmea	15	22442	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Macho	16	23885	<i>Geotrichum candidum, Malassezia pachydermatis</i>
T. mirim	Macho	17	28639	<i>Candida guilliermondii, Trichosporon asahii</i>
T. mirim	Fêmea	18	28869	<i>Candida guilliermondii</i>
T. bandeira	Macho	19	TB001	<i>Candida glabrata</i>
T. bandeira	Macho	20	TB002	<i>Candida kefyf</i>
T. bandeira	Fêmea	21	TB003	<i>Candida famata</i>
T. bandeira	Fêmea	22	TB004	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Fêmea	23	TB005	<i>Geotrichum candidum</i>
T. bandeira	Fêmea	24	TB006	<i>Candida guilliermondii</i>
T. mirim	Fêmea	25	TM001	<i>Candida guilliermondii, Malassezia pachydermatis</i>
T. mirim	Macho	26	TM002	<i>Cryptococcus laurentii, Rhodotorula glutinis</i>
T. mirim	Macho	27	TM003	<i>Geotrichum candidum</i>

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular e Celular/CLININFEC-CNPq (UNIP), São Paulo, SP, Brasil.

A técnica do quadrado de carpete friccionado sobre o dorso, originalmente descrita por Mariat & Adam-Campos (1967) para a obtenção de amostras para o isolamento de fungos filamentosos. Seu emprego para essa finalidade já foi testado e comprovado em trabalhos realizados anteriormente (Bentubo et al, 2006). A técnica clássica também se mostrou bastante eficiente para a obtenção de isolados leveduriformes, tal qual foi possível observar na presente investigação. Por meio da análise da morfologia macroscópica dos isolados obtidos em cultura foi possível estabelecer correspondência com o provável gênero da levedura. Para a confirmação das suspeitas foram realizados testes adicionais de cultivo em lâmina, para a avaliação da morfologia microscópica e método semi-automatizado por kit ID-32C[®] (Biomerieux[®]), para averiguação das características fisiológicas dos isolados. Esses métodos, quando utilizados em associação, permitem maior acurácia na identificação específica de fungos leveduriformes (Lacaz et al, 2002).

Dos cinco isolados que apresentaram coloração branca, textura lisa e aspecto úmido e opaco que, inicialmente, se mostraram compatíveis com leveduras do gênero *Candida* sp, apenas três puderam ser identificados como pertencentes a gênero suspeito: um de *Candida famata*, um de *Candida guilliermondii* e um de *Candida kefyf*. Um dos isolados apresentou estrutura de natureza hidrofóbica observada na superfície das células no teste de tinta nankin e foi identificado pelo kit ID-32C[®] (Biomerieux[®]) como *Cryptococcus laurentii*. E por último o isolado caracterizado pela textura mais membranosa, assim

como se suspeitava, foi identificado como um *Geotrichum candidum*, pelo mesmo método (Lacaz et al, 2002). Nesta pesquisa, outras leveduras, como *Candida* spp., *Geotrichum* sp, *Cryptococcus* spp. e *Rhodotorula* sp, também foram isoladas do pelame dos animais submetidos à investigação. Dessas leveduras, os gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, merecem destaque especial, por constituírem patógenos importantes.

As leveduras do gênero *Candida* (*C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermndii* e *C. kefyr*) foram isoladas da maior parte da população de tamanduás pesquisada (59,2%), sugerindo que estas sejam as leveduras mais comumente encontradas colonizando a superfície do corpo de tamanduás. Embora *C. albicans* seja a espécie mais relatada em casos de infecção envolvendo animais, as novas condições de vida capazes de produzir estresse e, conseqüentemente, imunossupressão promovem a emergência de novas espécies em processos patológicos, os quais serão gradativamente referenciados na literatura médico-veterinária (Greene, 2006). *Cryptococcus* spp. são patógenos reconhecidos em medicina humana. Esse gênero apresentou frequência de isolamento de 13, 3% entre os tamanduás. A literatura sugere que pombos e outras aves sejam importantes disseminadoras de *C. neoformans*, espécie relevante em doença humana. Se levarmos em conta que a maior parte dos parques zoológicos do mundo sejam, frequentemente, visitados por aves migratórias e que espécies de *Cryptococcus*, tais como *C. laurentii*, verificadas neste trabalho, já tenham sido isoladas a partir de fezes de aves migratórias como o ganso canadense (*Branta canadensis*), talvez não seria improvável a obtenção de isolados da microbiota transitória superficial de animais residentes daqueles recintos visitados (Filion et al, 2006; Rosário et al, 2008). A imunossupressão constitui fator determinante para a ocorrência de infecções oportunistas. Como já foi dito, enfermidades de base com característica imunocomprometedora (Aids, câncer, diabetes, transplante de órgãos, antibióticoterapia e/ou corticoterapia prolongadas) são fatores predisponentes bastante conhecidos, especialmente para seres humanos. Além disso, a caça predatória, tráfico e o cativeiro são situações potencialmente imunossupressoras, dado o nível de estresse às quais os animais envolvidos estão sujeitos (Tashiro et al, 1995; Kremery et al, 1999).

O gênero *Malassezia* sp compreende diversas espécies, muitas delas responsáveis pelas otites e dermatites em cães e gatos. Porém, existem poucos registros da presença delas como colonizadoras da microbiota de animais selvagens, e nenhum especificamente relacionado a tamanduás. O presente trabalho obteve como resultado o isolamento de *Malassezia pachydermatis* em três tamanduás-mirim (11,1%). Em 2006, Coutinho et al avaliaram amostras de cerume de 132 felídeos selvagens adultos e saudáveis mantidos em cativeiro. O grupo foi dividido em grandes e pequenos felídeos, os quais tinham uma amostragem de 55 e 77 animais, respectivamente. O primeiro grupo teve resultados positivos somente para *Malassezia sympodialis* em 56,9% dos indivíduos, enquanto o segundo grupo mostrou positividade exclusivamente para *Malassezia pachydermatis* em 43,1% deles. Dentre o grupo de grandes felídeos, os leões foram a espécie que apresentou maior incidência de leveduras. De 26 animais, 25 (96,2%) foram positivos para *M. sympodialis*. Gandra et al (2008) isolaram *Malassezia* spp. do meato acústico de 24 (80%) morcegos insetívoros (*Molossus molossus*) da região de Montenegro, em Rondônia, sendo a espécie mais frequentemente encontrada, *Malassezia pachydermatis*, isolada em 15 animais (62,5%), seguida pela *M. furfur*, em cinco (20,8%), *M. globosa*, em três (12,5%) e *M. sympodialis*, em um indivíduo (4,2%). Em Pisa, na Itália, existem estudos que relatam a presença de espécies de *Malassezia* sp no conduto auditivo externo de suídeos saudáveis pertencentes a diferentes raças e idades (oito meses à quatro anos). Para este estudo foram utilizados 185 javalis selvagens, 107 animais de raças de grande porte e 116 da raça Cinta Senese. Os resultados demonstraram que *Malassezia pachydermatis* foi a única espécie isolada na raça Cinta Senese (20,7%), em indivíduos jovens de raças de grande porte (13,6%) e em javalis (12,9%). Nos animais adultos de grande porte foi possível o isolamento e caracterização das espécies *M. sympodialis* (63,6%) e *M. furfur* (22,7%) (Nardoni et al, 2010). Até o momento, os estudos apresentados possuem algumas características relevantes em comum.

O presente trabalho, assim como os de Coutinho et al (2006) e Nardoni et al (2010), utilizaram como amostragem, em sua grande maioria, animais provenientes de cativeiro. Gandra et al (2008) teve como base de seu estudo animais de vida livre, que foram capturados para a realização do mesmo. Contudo, em nenhum dos dois casos os indivíduos utilizados apresentavam sinais clínicos de infecção causada pelo fungo. Esse aspecto também foi observado em nossos animais. Outro ponto importante a ser discutido é a frequência de isolamento de espécies da levedura em questão. Por meio da análise dos dados obtidos observou-se a prevalência de *Malassezia sympodialis* nos resultados de Coutinho et al (2006) e Nardoni et al (2010). Já no presente estudo, assim como nos demais trabalhos apresentados, *Malassezia pachydermatis* foi a única espécie isolada do pelame, indicando ser esta predominante nesse microambiente. Outra questão relevante seria a metodologia de crescimento em meio de cultura utilizada, que pode não ter sido a ideal para o crescimento de outras espécies de *Malassezia* sp.

Em consonância às suspeitas levantadas, foi possível confirmar que o isolado que apresentou coloração branca, textura rugosa e aspecto seco e opaco compatíveis com o de uma levedura do gênero *Trichosporon* sp. era, de fato, um *T. asahii* (Guého et al, 1994; Kurtzman & Fell, 1998; De Hoog et al, 2004). Assim como aquele isolado, o mais distinto de todos, que exibia coloração alaranjada, textura lisa e aspecto úmido e brilhante, compatível com o gênero *Rhodotorula* foi identificado como *R. glutinis*. Vale ressaltar que também foi possível observar a presença discreta de uma substância de natureza hidrofóbica na superfície das células de *Rhodotorula glutinis* no teste de tinta nanquim (Kurtzman & Fell, 1998). Segundo autores renomados, a presença de cápsula pode ser observada não apenas em leveduras do gênero *Cryptococcus* como também em *Rhodotorula* spp. (De Hoog et al, 2004).

Segundo a literatura, *Trichosporon* spp. já foram isoladas do solo e da água em ambiente selvagem (Paula et al, 1983; Martins et al, 1989), o que justifica os isolamentos obtidos nesse trabalho. No entanto, levando-se em conta que os animais estudados vivem em condição de cativeiro, ou seja, são rotineiramente expostos ao contato com tratadores, médicos veterinários e outros profissionais da área, que também podem albergar essa levedura na sua microbiota, não se pode ignorar a possibilidade desses indivíduos exercerem papel como agentes disseminadores de agentes microbianos diversos, entre eles, *T. asahii*, espécie que além de ser a mais importante nos casos de infecção humana oportunística (Fleming et al., 2002; Madariaga et al, 2003), também é considerada agente comum do ambiente (Sugita et al, 2000). A literatura menciona apenas uma descrição de *Trichosporon* sp como agente patogênico de pedra branca superficial em primatas não humanos; entretanto, acredita-se que a ocorrência desses processos superficiais nos animais seja subestimada em virtude, principalmente, da carência de relatos na literatura (Kaplan, 1959). Ainda não existem descrições de infecção causada por *T. asahii* em animais domésticos ou silvestres, de qualquer espécie. No entanto, a presença do microrganismo na microbiota associada à possível condição de imunossupressão, expõe os animais aos mesmos riscos aos quais estão expostos os seres humanos.

A macromorfologia das colônias não pode ser considerada como critério único para a identificação dos isolados obtidos a partir das amostras colhidas do pelame dos tamanduás. Nossas observações foram compatíveis com as de vários autores da escola clássica de micologia (Lacaz et al, 2002), confirmando que é imprescindível recorrer a outras características como morfologia microscópica e comportamento fisiológico dos isolados [o kit de identificação ID-32C® (Biomérieux®) deverá auxiliar de maneira relevante nesse processo de identificação], bem como aos demais testes complementares disponíveis na composição de um repertório viável, mais criterioso e consistente para a identificação taxonômica de microrganismos, sejam eles provenientes de processos infecciosos ou simplesmente membros da microbiota residente/transitória de um espécime. Também cabe comentar que foi observado o isolamento de outros gêneros fúngicos, com característica filamentososa, considerados nessa pesquisa como contaminantes devido ao seu caráter sapróbio. É importante ressaltar que os animais utilizados neste estudo não mostraram nenhum tipo de alteração clínica, assim como ocorre com aqueles citados em outros estudos de referência.

4. Considerações Finais

Em relação à origem dos animais utilizados, sabe-se que eram provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba. Visto que os animais estão fora de seu ambiente natural e que o estresse pode influenciar na colonização dos animais, trabalhos com espécimes de vida livre devem ser estimulados a fim de que seja possível estabelecer parâmetros mais contundentes para as espécies estudadas considerando, inclusive, outros tipos de microbiota potencialmente patogênicas, como por exemplo, aquela constituída por fungos filamentosos e bactérias de importância médico-veterinária. Tamanduás mantidos em cativeiro são portadores de leveduras com importante potencial patogênico, assim sendo, para manter o sucesso de programas de preservação das espécies, esses animais devem também ter sua microbiota monitorada devido aos fatores predisponentes que podem incidir sobre o meio onde eles estão inseridos e, quanto ao surgimento de manifestações clínicas de infecções oportunistas. O emprego de técnicas semi-automatizadas, quando empregadas em associação com técnicas clássicas produzem resultados de identificação muito satisfatórios. *Malassezia pachydermatis* também é levedura integrante da microbiota residente e/ou transitória normal do pelame de tamanduás-mirim à semelhança do que se observa em estudos realizados com outros mamíferos. Outro ponto de relevância seria a não observância de outras espécies desse gênero de levedura, o que na opinião dos autores requer mais investigações, já que, novas espécies têm sido cada vez mais comumente identificadas na microbiota de animais de diferentes espécies. Talvez a adoção de meios de cultura mais adequados para a rotina de isolamento de espécies lipodependentes possa contribuir para elucidação desse caráter ecológico de colonização por *Malassezia* spp. no pelame de tamanduás.

Agradecimentos

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Paulista – UNIP, São Paulo, SP, Brasil.

Referências

- Araújo, A. J. G., Bastos, O. M. P., Souza, M. A. J. & Oliveira, J. C. (2003). Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An Bras Dermatol*, 78, 445-455.
- Bentubo, H. D. L., Fedullo, J. D. L., Corrêa, S. H. R., Teixeira, R. H. F. & Coutinho, S. D. (2006). Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of health wild felids kept in captivity in Brazil. *Braz J Microbiol*, 37, 148- 152.
- Braga, F. G. (2003). Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), espécie em perigo: uma preocupação no Estado do Paraná. *Acta Biol*, 33, 193-194.
- Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol*, 52, 461-466.
- Coutinho, S. D., Fedullo, J. D. & Corrêa, S. H. (2006). Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. *Sabouraudia*, 44(4), 383-387.
- Crocco, E. I., Mimica, L. M. J.; Muramatu, L. H., Garcia, C., Souza, V. M., Ruiz, L. R. B. & Zaitz, C. (2004). Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An Bras Dermatol*, 79, 689-697.
- De Hoog, G. S., Guarro, J., Gené J. & Figueiras, M. J. (2004). *Atlas of Clin.Fungi*. (No. Ed. 2), Utrecht & Réus: Centralbureau voor Schimmelcultures to \Universitat Rovira, Virgili.
- Filion, T., Kidd, S. & Aguirre, K. (2006). Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. *Mycopathologia*, 162, 363-368.
- Fischer, L. & Sterneck, M. (2005). Invasive fungal infections in patients after liver transplantation. *Mycoses*, 48, 27-35.
- Fleming, R. V., Walsh, T. J. & Anaissie, E. J. (2002). Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am*, 16, 915-933.
- Fricker-Hidalgo, H., Vandapel, O., Duchesne, M. A., Mazoyer, M. A., Monget, D., Lardy, B., Ledeau, B., Freney, J., Ambroise-Thomas, P. & Guillot, R. (1996). Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32 C system for identification of clinical important species. *J Clin Microbiol*, 34, 1846-1848.
- Gandra, R. F., Simão, R. C. G., Matsumoto, E. F., Silva, B. C. M., Ruiz, L. S., Silva, E. G., Gambale, W. & Paula, C. R. (2006). Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis patients. *Mycopathologia*, 162, 273-280.
- García-Martos, P., García-Agudo, L., Ruiz-Aragón, J., Saldarreaga, A. & Marín, P. (2004). Asimilación de carboidratos por cepas de *Rhodotorula glutinis* de origen clínica y ambiental. *Rev Iberoam Micol*, 21, 90-92.

- Girmenia, C., Pagano, L., Martino, B., D'antonio, D., Fanci, R., Specchia, G., Melillo, L., Buelli, M., Pizzarelli, G., Venditti, M. & Martino, P. (2005). Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*, 43, 1818-1828.
- Giusiano G. E., Mangiaterra M., Rojas, F. & Gómes, V. (2004). Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. *Mycoses*, 47, 300-303.
- Gottdenker, N. L., Chaves, L. F., Calzada, J. E., Saldaña, A. & Carroll, C. R. (2012). Host life history strategy, species diversity, and habitat influence *Trypanosoma cruzi* vector infection in changing landscapes. *PLoS neglected trop dis*, 6(11), e1884.
- Greene, C. E. (2006). *Infectious diseases of the dog and cat* (No. Ed. 3). WB Saunders/Elsevier Science.
- Guêho, E., Improvisi, L., De Hoog, G. S. & Dupont, B. (1994). *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*, 37, 3-10.
- Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade. (2021). *Lista de espécies ameaçadas de extinção*. <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/2741-lista-de-especies-ameacadas-saiba-mais.html>
- International Union For Conservation Of Nature. (2021). *The IUCN red list of threatened species*. [www.https://www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/)
- Kaplan, W. (1959). Piedra in lower animals; a case report of white piedra in a monkey and a review of literature. *J Am Vet Med Assoc*, 134, 113-117.
- Kremery, V., Mateicka, F. Jr., Kunova, A., Spanik, S., Gyarfás, J., Sycova, Z. & Trupi, J. (1999). Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including five during prophylaxis with itraconazole. *Supp Care Cancer*, 7, 39-43.
- Kurtzman, C., Fell, J. W. & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Lacaz, C. D. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., & Takahashi de Melo, N. (2002). Tratado de micologia médica.
- Lunardi, L. W., Aquino, V. R., Zimmerman, R. A. & Goldani, L. Z. (2006). Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis*, 43, 60-63.
- Madariaga, M. G., Tenorio, A. & Proia, L. (2003). *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. *J Clin Microbiol*, 41, 5827-5829.
- Mariat, F. & Adam-Campos, C. (1967). La technique du carré du tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. *Ann Inst Pasteur*, 113, 666-668.
- Martins, M. T., Gambale, W., Paula, C. R. & Pellizari, V. H. (1989). Utilização de bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiográficos que interferem nos processos de autodepuração de um córrego subtropical. *Rev Microbiol*, 20, 278-291.
- Martins, J.R., Medri, I. M., Oliveira, C. M. & Guglielmone, A. (2004). Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá- mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil. *Ciênc Rural*, 34, 293-295.
- Muñoz-García, C. I., Sánchez-Montes, S., Villanueva-García, C., Romero-Callejas, E., Díaz-Lopez, H. M., Gordillo-Chávez, E. J., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E. & Rendón-Franco, E. (2019). The role of sloths and anteaters as *Leishmania* spp. reservoirs: a review and a newly described natural infection of *Leishmania mexicana* in the northern anteater. *Parasitol Res*, 118(4), 1095-1101.
- Nardoni, S., Merildi, V., Frangioni, S., Ariti, G., Verin, R., Vannucci, P. & Mancianti, F. (2010). Isolation and characterization of *Malassezia* spp. in healthy swine of different breeds. *Vet Microbiol*, 141(1-2), 155-158.
- Oliveira, J. A., Barros, J. A., Cortez, A. C. A. & Oliveira, J. S. R. J. (2006). Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. *An Bras Dermatol*, 81, 238-243.
- Paula, C. R., Purchio, A. & Gambale, W. (1983). Yeasts from beaches in the Southern area of São Paulo, Baixada Santista, Brazil. *Rev Microbiol*, 14, 136-143.
- Porto, E., Takahashi, N., Heins, E. M. & Lacaz, C. da S. (1981). Mieno método para microcultivo de hongos. *Rev Argent Micol*, 4, 24-29.
- Riedel, D. J., Johnson, J. K. & Forrest, G. N. (2007). *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. *Transpl Infect Dis*, 10, 197-200.
- Rosario, I., Acosta, B. & Colom, F. (2008). La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol*, 25, S13-S18.
- Schlottfeldt, F. S., Tramontin, S. W., Nappi, B. P. & Santos, J. I. (2002). Reclasseificação taxonomômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. *J Bras Patol Méd Lab*, 38, 199-204.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Ichikawa, T., Ikeda, R. & Shinoda, T. (2000). Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. *Med Mycol*, 38, 27-30.
- Sun, Y., Huang, H., Chen, J., Li, J., Ma, J., Li, J., Yu, K., Hu, J., Jin, J., Wang, C., Wu, D., Xiao, Y. & Huang, X. (2015). Invasive fungal infection in patients receiving chemotherapy for hematological malignancy: a multicenter, prospective, observational study in China. *Tumor Biol*, 36(2), 757-767.
- Tashiro, T., Nagai, H., Nagaoka, H., Goto, Y., Kamberi, P. & Nasu, M. (1995). *Trichosporon beigelii* pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Chest*, 108, 190-195.
- Tarazooie, B., Kordbacheh, P., Zaini, F., Zomorodian, K., Saadat, F., Zeraati, H., Hallaji, Z. & Rezaie, S. (2004). Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatol*, 4, 1-6.
- Weiss, L. P. & Vianna, V. O. (2012). Levantamento do impacto das rodovias BR-376, BR-373 e BR-277, trecho de Apucarana a Curitiba, Paraná, no atropelamento de animais silvestres. *Publ. UEPG Ci. Biol Saúde*, 18, 121-133.
- Wickerham, L. J. (1951). *Taxonomy of yeasts* (No. 1029). US department of agriculture.