

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA



Dissertação

**Aspergilose em Pingüins em Cativeiro: Diagnóstico, Prevenção e Controle em
Centro de Recuperação de Animais Marinhos**

Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2007.

Melissa Orzechowski Xavier

**Aspergilose em Pingüins em Cativeiro: Diagnóstico, Prevenção e Controle em
Centro de Recuperação de Animais Marinhos**

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

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientadora: Márcia de Oliveira Nobre

Pelotas, 2007.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Severo - UFRGS

Prof^a. Dra. Cristina Gevehr Fernandes - UFPel

Prof^a. Dra. Márcia de Oliveira Nobre - UFPel

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles – UFPel

Orientador

Agradecimentos

À todo o Grupo de Pesquisa em Micologia, que além de transmitir o conhecimento técnico-científico sempre teve a integração, amizade e carinho de uma grande e valiosa equipe.

Em especial neste grupo agradeço ao meu orientador Prof. Mário pelo esforço em disponibilizar todo o necessário para realização do trabalho, a minha co-orientadora Márcia pela colaboração e ensinamento técnico. À Loren pelo incentivo na etapa inicial e auxílio na elaboração do projeto. Às pós-graduandas Eme, Raquel, Isabel, Ane, Rê, Tati e Paty pela amizade, incentivo e incondicional auxílio nas horas e horas de trabalho juntas. E, às alunas de graduação que contribuíram muito com a execução do experimento, especialmente às Bolsista de Iniciação Científica do projeto, Luíza pela colaboração, esforço e dedicação contínuos dispensados a este trabalho, e Ângela pela paciência e dedicação empregadas como auxílio final para identificação das espécies fúngicas.

Ao Lauro Barcellos, diretor do Museu Oceanográfico “Prof. Eliézer de Carvalho Rios” da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, e à todo o pessoal do Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM), especialmente ao Neneco, pela oportunidade concedida, conhecimento transmitido e confiança depositada em meu trabalho, e à Andréa, Alice e Fabiano pela amizade e colaboração.

Ao Mauro, pelo auxílio nos exames *pos-mortem* dos pingüins durante o experimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelas bolsas de estudo concedidas.

À empresa Chemitec Agro-Veterinária pela gentileza no fornecimento do produto Clorexidina-Cetrimida® para uso no experimento.

E, com muita gratidão à minha família, mãe, pai, Nena, leiê e ao meu coração, Nogueira, pelo amor, compreensão, apoio incansável e auxílio indispensável durante este período.

À todos,

MUITO OBRIGADO!!!

***"Quando uma criatura humana desperta
para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma... Todo o universo
conspira a seu favor!"***

Goethe

Resumo

XAVIER, Melissa Orzechowski. **Aspergilose em Pingüins em Cativeiro: Diagnóstico, Prevenção e Controle em Centro de Recuperação de Animais Marinhos**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A aspergilose é uma doença frequentemente associada com mortalidade de pingüins em cativeiro e geralmente adquirida por inalação dos conídios anemófilos. O trabalho objetivou avaliar a frequência desta micose em pingüins em um centro de reabilitação de animais marinhos (CRAM), bem como pesquisar a presença de espécies de *Aspergillus* no local de cativeiro e desenvolver medida de controle microbiológico no ambiente, buscando a prevenção da doença. Para isso, foram realizados exames post-mortem nos animais que vieram a óbito, colheita de fungos do ar por sedimentação com Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, testes “in vitro” para escolha do desinfetante mais adequado para o estudo, e emprego de rotina de desinfecção ambiental. Durante os dois anos de experimento 12 pingüins foram a óbito sendo cinco por aspergilose. Dos 81 dias de colheita de amostras de ar 33,3% foram positivas para *Aspergillus* spp., com isolamento de sete espécies distintas, totalizando 43 isolados, dos quais a espécie *A. fumigatus* foi predominante correspondendo a 27,9%. O teste “in vitro” de microdiluição em caldo demonstrou a eficácia da amônia quaternária e da clorexidina frente a diferentes espécies de *Aspergillus*, e a ação “in loco” da clorexidina reduziu o isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* das instalações internas do CRAM. O experimento demonstrou a importância da aspergilose em pingüins em cativeiro no CRAM determinando uma alta taxa de mortalidade, e a presença de propágulos fúngicos de distintas espécies patogênicas de *Aspergillus* no ambiente interno de reabilitação. Os resultados obtidos permitiram também concluir que a contaminação ambiental por *Aspergillus* spp. no CRAM pôde ser parcialmente controlada pelo emprego de uma rotina de desinfecção ambiental com o agente químico de melhor ação “in vitro”.

Palavras-chave: *Aspergillus*, aspergilose, pingüins, prevenção, desinfecção.

Abstract

XAVIER, Melissa Orzechowski. **Aspergillosis in Captive Penguins: Diagnosis, Prevention and Control in a Rehabilitation Center of Marine Animals**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Aspergillosis is a disease often associated with mortality of captive penguins and frequently acquired by the conidia inhalation of the air. The aim of the study was to evaluate the frequency of this mycosis in captive penguins in a rehabilitation center of marine animals (CRAM), to search the presence of *Aspergillus* species on the ambient of captivity, and to introduce methods of a microbiology control in the indoor air, wishing a prevention of the disease. To this, post-mortem examinations were done in all penguins died, samples of the fungal air were collected by sedimentation in Agar Sabouraud dextrose added to chloramphenicol, "in vitro" tests were made to choose the more appropriated disinfectant to use on the local, and a routine of environmental disinfection was established. During the two years of the experiment 12 penguins died, and in five of them the cause was aspergillosis. In the 81 days of air samples collection, 33,3% were positive to *Aspergillus* spp. isolation, classified in seven distinct species totalizing 43 isolates, with *A. fumigatus* the predominant species corresponding to 27,9%. The "in vitro" test of microdilution demonstrated the quaternary ammonia and chlorhexidine efficacy against different *Aspergillus* species, and the "in loco" chlorhexidine action reduced the fungal *Aspergillus* isolation on the indoor ambient of the CRAM. The study demonstrated the aspergillosis importance in captive penguins on CRAM, corresponding to elevated rates of mortality, and the presence of different pathogenic species *Aspergillus* fungal propagules on indoor environment of rehabilitation. This results obtained also permit to conclude that the environmental *Aspergillus* contamination on the CRAM could be partially controlled with the establishment of a disinfection routine with the chemical agent that had the better activity "in vitro".

Keywords: *Aspergillus*, aspergillosis, penguins, prevention, disinfection.

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição das colônias reprodutivas de Pingüins-de-magalhães e correntes marítimas que auxiliam sua rota migratória.....	29
Figura 2 – Pingüim-de-magalhães juvenil contaminado por petróleo encontrado na praia do Cassino, RS, Brasil.....	30
Figura 3 – Localização de alguns centros de reabilitação de animais marinhos na América do Sul.....	31
Figura 4 – Exemplares de três diferentes espécies de pingüins no CRAM. (A) pingüim-de-magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) adulto e (a) juvenil; (B) pingüim de penacho amarelo (<i>Eudyptes chrysocome</i>); (C) pingüim-rei (<i>Aptenodytes patagonica</i>).....	32
Figura 5 – Vista aérea das instalações do CRAM, à beira da Lagoa dos Patos – Rio Grande, RS, Brasil.....	32
Figura 6 – Taxas de mortalidade relacionadas à infecção por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> em pingüins em distintos locais de cativeiro.....	34
Artigo 3.1	
Figura 1 – Estruturas de reprodução de diferentes subgêneros de fungos <i>Aspergillus</i> . [A] Subgênero <i>Circumdati</i> ; [B] Subgênero <i>Fumigati</i> ; [C] Subgênero <i>Nidulantes</i> , detalhe dos aleuroconídios encontrados na espécie <i>A. terreus</i> ; [D] Subgênero <i>Aspergillus</i> , setas demonstrando estrutura de reprodução assexuada e sexuada.....	42
Figura 2 – Espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas do ar das instalações de um Centro de Recuperação de Animais Marinhos.....	43
Artigo 3.2	
Figura 1 – Radiografia do trato respiratório do pingüim-de-magalhães, demonstrando aumento da radiopacidade na região da siringe e lesão multifocal nos sacos aéreos torácicos.....	50

Figura 2 – Lesões macroscópicas em pingüim-de-magalhães. (A) Nódulo de aproximadamente dois centímetros na região da siringe. (B) Colônias fúngicas de coloração branca com centro esverdeado no saco aéreo torácico esquerdo. (C) Colônias fúngicas de coloração branca com centro esverdeado no lobo direito do fígado.....	51
Figura 3 – (A) Hifas septadas, ramificadas e bifurcadas em ângulo agudo, visualizadas no exame histopatológico (Grocott, 400X) do pulmão do pingüim-de-magalhães. (B) Estrutura de frutificação completa do <i>Aspergillus fumigatus</i> visualizada no exame histopatológico (PAS, 400X) da siringe do pingüim-de-magalhães.....	52
Artigo 3.3	
Figura 1 – Resultado do teste de microdiluição em caldo demonstrando isolados de <i>A. niger</i> resistentes a todas as concentrações do iodóforo (linhas 3, 4, 9 e 10), e sensíveis a todas as concentrações de amônia quaternária (linhas 1, 2, 7 e 8) e digluconato de clorexidina (linhas 5, 6, 11 e 12).....	63
Artigo 3.4	
Figura 1 – Variação climática de temperatura (°C), umidade (%) e precipitação (mm) da cidade de Rio Grande no primeiro ano do experimento.....	69
Figura 2 – Variação climática de temperatura (°C), umidade (%) e precipitação (mm) da cidade de Rio Grande no segundo ano do experimento.....	69
Artigo 3.5	
Figure 1 – Macroscopic lesions of aspergillosis in Magellanic penguins: (A) air sacs thickness with abundant caseous and nodules; (B) nodules white-yellowish externally on esophagus; (C) fungal colonies in the air sacs.....	80
Figure 2 – Conidial heads of <i>Aspergillus</i> spp. (black arrows) and septate and branching hyphae (blue arrows), in air sacs of the Magellanic penguins at histological examination with HE (100X).....	81

Lista de Tabelas

Artigo 3.3

Tabela 1 – Resultados do teste de suscetibilidade “in vitro” de diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> a três desinfetantes/anti-sépticos comerciais.....	61
--	----

Artigo 3.4

Tabela 1 – Resultados das amostras de ar colhidas durante dois anos, quanto ao isolamento de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> de instalações utilizadas para reabilitação de pingüins.....	68
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

CB – Cloreto de benzalcônio

CIM – Concentração inibitória mínima

CRAM – Centro de Recuperação de Animais Marinhos

DC – Digluconato de clorexidina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FV – Faculdade de Veterinária

GM-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos

HE – Hematoxilina-eosina

Ht – Hematócrito

IF – Iodóforo

IFN – Interferon

IBRRC – (International Bird Rescue Research Center's) Centro Internacional de
Pesquisa e Salvamento de Aves

IL – Interleucina

KOH – Hidróxido de potássio

MIP – (Macrophage inflammatory protein) Proteína inflamatória de macrófagos

MCP – (Monocyte chemotactic protein) Proteína quimiotática de monócitos

MO – Museu Oceanográfico “Prof. Eliézer de Carvalho Rios”

NCCLS – (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Comitê nacional
para padronização de procedimentos clínicos laboratoriais

PAS – (Periodic Acid Schiff) Ácido Periódico de Schiff

PDA – (Potato dextrose Agar) Agar batata dextrose

RNA – Ácido ribonucléico

TNF – Fator de necrose tumoral

UFC – Unidades formadoras de colônias

ZOO – Zoológico

Sumário

1 Introdução geral.....	11
2 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 <i>Aspergillus</i> spp.....	13
2.1.1 Fatores de patogenicidade.....	15
2.2 Aspergilose.....	16
2.2.1 Resposta imune do hospedeiro.....	18
2.2.2 Formas e Sinais Clínicos.....	20
2.2.3 Diagnóstico.....	22
2.2.4 Tratamento e Prevenção.....	26
2.3 Pingüins.....	28
2.3.1 Centros de reabilitação.....	31
2.3.2 Aspergilose em pingüins.....	33
3 Artigos	
3.1 Contaminação do ar quanto ao gênero <i>Aspergillus</i> em ambiente de reabilitação de animais marinhos.....	37
3.2 Aspergilose em Pingüim-de-magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>). Relato de Caso.....	47
3.3 Atividade “in vitro” de três agentes químicos frente a diferentes espécies de <i>Aspergillus</i>	54
3.4 Eficácia da Clorexidina-Cetrimida na desinfecção ambiental contra <i>Aspergillus</i> spp.....	64
3.5 Aspergillosis: a limiting factor during the recovery of captive Magellanic penguins.....	73
4 Conclusões.....	84
5 Considerações finais.....	85
Referências	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

Embora a preocupação com a fauna e flora dos nossos ecossistemas tenha aumentado consideravelmente, a interferência humana no habitat dos animais continua acarretando sérios prejuízos ambientais e ecológicos gerando mortes diretas e indiretas que chegam a culminar com ameaças de extinção em diversas espécies animais (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2007).

Em se tratando especialmente da poluição dos mares, a descarga ilegal de petróleo, caracterizada pela lavagem de tanques cargueiros e/ou pelo descarte deliberado de conteúdo contaminado de embarcações, tem diminuído consideravelmente a população de pingüins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (GANDINI et al., 1994).

Dezenas a centenas de exemplares desta espécie de pingüim são encontradas anualmente nas praias brasileiras, devido à contaminação por petróleo, doenças, fraqueza, ferimentos e/ou separação do grupo. Os animais capturados em monitoramentos e encaminhados ao Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) geralmente são juvenis e devido à debilidade em que se encontram, são extremamente suscetíveis a doenças oportunistas como a aspergilose (RUOPPOLO et al., 2004). Esta predisposição é ainda agravada pelo próprio processo de reabilitação, durante o qual os animais são mantidos em cativeiro com manejos diários para hidratação, alimentação e administração de fármacos, procedimentos estes que cursam com estresse do animal agravando a imunossupressão.

O freqüente aparecimento de casos suspeitos de aspergilose entre os pingüins em reabilitação no CRAM instiga a pesquisa sobre a casuística desta micose, bem como sobre a presença e o controle de fungos do gênero *Aspergillus* nos locais de recuperação. Em vista desta realidade, o trabalho teve como objetivos: determinar a freqüência de aspergilose em pingüins recebidos pelo Centro de Recuperação de Animais Marinhos; isolar fungos do gênero *Aspergillus* spp. das instalações utilizadas para a reabilitação de pingüins no CRAM; classificar a espécie de *Aspergillus* isolada do ambiente e dos animais; realizar testes de suscetibilidade “in vitro” de *Aspergillus* spp. frente a desinfetantes; e estabelecer protocolo de

desinfecção das instalações como medida de controle microbiológico no ambiente onde os pingüins são mantidos para recuperação.

Com isso, espera-se determinar o diagnóstico definitivo e a frequência de aspergilose em pingüins no CRAM e interferir no ambiente de cativeiro reduzindo a concentração de conídios de *Aspergillus* spp., minimizando a inalação destes propágulos fúngicos pelos pingüins, e conseqüentemente reduzindo os casos de aspergilose que interferem no processo de reabilitação destes animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* foi assim designado no ano de 1729, pelo padre micologista italiano Micheli, o qual fez uma alusão da micromorfologia do fungo com o instrumento utilizado durante o culto católico para aspergir a água benta, denominado aspersório, do latim *aspergillum* (RAPER; FENNEL, 1965; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). Este gênero pertence à sub-divisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* (LACAZ et al., 2002). As mais de 100 espécies descritas foram divididas por Raper e Fennell (1965) em 18 grupos, os quais atualmente foram substituídos por seis subgêneros, com uma ou mais seções, seguindo as normas do código internacional de nomenclatura botânica (ABARCA, 2000; KLICH, 2002).

Aspergillus spp. são fungos ubíquos e anemófilos, com capacidade de suprir sua necessidade nutricional facilmente através dos mais variados substratos devido a capacidade de produção de grande número de enzimas, que se inserem em diferentes rotas bioquímicas para assimilação final dos nutrientes. Estão classificados entre os microrganismos mais abundantes, além de mundialmente distribuídos, podendo ser isolados do solo, ar, água, alimentos, plantas, material em decomposição e superfícies (RAPER; FENNEL, 1965; SIDRIM; ROCHA, 2004, WARD et al, 2006).

Este gênero compreende fungos anamórficos que se reproduzem de forma assexuada através de fialoconídios. Algumas espécies de *Aspergillus* possuem a fase sexuada conhecida, podendo se propagar através de ascósporos. Estas espécies são classificadas como teleomorfas, pertencem a sub-divisão *Ascomycotina*, classe *Ascomycetes*, ordem *Eurotiales*, família *Aspergillaceae*, se dividem em dez gêneros e recebem nomenclaturas distintas dos seus anamorfos, como por exemplo, *A. nidulans* na fase sexuada passa a ser denominado *Emericella nidulans* (KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002).

Morfológicamente, todas as espécies de *Aspergillus* possuem colônias filamentosas que apresentam hifas septadas com aproximadamente 4µm de espessura. A estrutura de frutificação, típica do gênero, é caracterizada por um conidióforo com uma célula pé e uma dilatação no ápice chamada de vesícula, onde se inserem as métulas em espécies bisseriadas, ou as fiálides em espécies unisseriadas, as quais dão origem aos conídios (RAPER; FENNELL, 1965; ABARCA, 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Para caracterização das espécies de *Aspergillus*, se faz necessário a utilização de uma chave de identificação, onde são confrontadas as características macro e micromorfológicas do fungo (RAPER; FENNELL, 1965; ABARCA, 2000; KLICH, 2002). Macroscopicamente as colônias de *Aspergillus* spp. variam quanto à textura, topografia, diâmetro, coloração do anverso e reverso, presença de esclerócios, exsudato e pigmento solúvel. Microscopicamente as espécies podem ser uni ou bisseriadas, com métulas e/ou fiálides que variam quanto à disposição na superfície da vesícula, comprimento e diâmetro. Além destas características, a vesícula varia em forma e tamanho, os conídios em forma, textura e diâmetro, e o conidióforo em comprimento, textura e coloração. Algumas espécies ainda apresentam células de Hülle, cleistotécios e ascósporos, dos quais devem ser observadas características como forma, textura, coloração, tamanho e ornamentos (RAPER; FENNELL, 1965; ABARCA, 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

O gênero *Aspergillus* além de desempenhar um papel essencial na natureza, fazendo parte da reciclagem do carbono e do nitrogênio (LATGÉ, 2001), se destaca positivamente no âmbito econômico, à medida que produz enzimas e substâncias muito utilizadas nas indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas, como amilases, proteases e ácido cítrico. Algumas espécies geram diversos metabólitos com ação benéfica, como a “Lovastatina” produzida pelo *A. terreus*, utilizada por humanos para redução do colesterol; a “Ciclosporina A” fármaco antineoplásico produzido por esta mesma espécie, ou ainda, a “Anidulina”, fármaco antifúngico produzido a partir do *A. nidulans* (KLICH, 2002; WARD et al, 2006).

Em contrapartida, os fungos do gênero *Aspergillus* podem ser causadores de sérios prejuízos, afetando o setor agrícola antes e pós-colheita, e demonstrando seu grande impacto na saúde humana e animal através da produção de micotoxinas (micotoxicoses) e principalmente através da capacidade de infecção do organismo

causando a aspergilose, doença com uma ampla diversidade de apresentações clínicas (KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002).

2.1.1 Fatores de patogenicidade

A patogenicidade de fungos do gênero *Aspergillus*, que determina a capacidade de causar danos à saúde dos indivíduos, é multifatorial, provinda desde fatores físico-estruturais a metabólicos. Muitos destes fatores ainda estão em estudo e suas funções são apenas hipóteses, no entanto, outros já possuem papel comprovado no desenvolvimento da micose (LATGÉ, 1999, 2001).

Dentre os fatores de virulência físico-estruturais do gênero *Aspergillus*, podem ser citados: o pequeno diâmetro dos conídios, que permite sua penetração no trato respiratório inferior; a presença de proteínas hidrofóbicas e melanina na parede, que conferem proteção a fagócitos; e a termotolerância, que permite sua resistência e rápido crescimento na temperatura corporal do hospedeiro (LATGÉ, 1999, 2001). A espécie *A. fumigatus* se destaca neste contexto, por resistir e se desenvolver em temperaturas acima de 55°C, apresentar crescimento rápido, e ainda por possuir os conídios de menor diâmetro do gênero, com 2 a 3µm (LATGÉ, 1999, 2001).

Em se tratando de patogenicidade por fatores metabólicos, a maioria dos estudos com *A. fumigatus*, demonstram a participação de diversos componentes, como as adesinas, as toxinas e as enzimas no desencadeamento da doença (BLANCO et al., 1998; LATGÉ, 1999, 2001). As adesinas promovem a interação do fungo com a célula do hospedeiro, em especial, os fatores de aderência do *A. fumigatus* possuem afinidade pelo fibrinogênio, glicoproteína plasmática da cascata de coagulação e das reações inflamatórias, e pela laminina que é o principal componente estrutural da membrana basal pulmonar (BLANCO et al., 1998; LATGÉ, 1999).

Dentre as toxinas produzidas pelo fungo, estão as hemolisinas que são responsáveis pela lise de eritrócitos; as ribonucleases que levam à destruição de células; a fumagilina e principalmente a gliotoxina, responsáveis pela imunossupressão do hospedeiro, através da redução funcional de macrófagos e neutrófilos, da indução de apoptose de células do sistema imunitário, do bloqueio da ativação de linfócitos e da inativação do sistema mucociliar (LATGÉ, 1999, 2001;

LEWIS et al., 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005). As aflatoxinas produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*, possuem ação hepatotóxica, carcinogênica, teratogênica e mutagênica, e as ocratoxinas produzidas pelo *A. ochraceus*, apresentam ação teratogênica e carcinogênica, tendo o tecido renal como principal sítio de atuação (KLICH, 2002).

Dentre as enzimas, as proteases elastinolíticas do *A. fumigatus*, têm sido consideradas de grande importância na virulência do agente, por degradar não só elastina, como também colágeno, laminina, fibrinogênio e outros componentes principais da matriz pulmonar (BLANCO et al., 1998). As peptidases produzidas pelo gênero *Aspergillus*, promovem degradação dos fatores humorais; as catalases e as dismutases agem como antioxidantes durante a fagocitose; e as fosfolipases danificam o tecido epitelial (LATGÉ, 1999, 2001).

2.2 Aspergilose

O termo aspergilose foi utilizado pela primeira vez por Fresenius, em 1850, ao descrever a forma respiratória da doença em aves após o isolamento do *A. fumigatus*. Esta micose, na forma pulmonar, foi uma das primeiras micoses viscerais descritas na literatura médica (LACAZ et al., 2002).

Considerada oportunista, a aspergilose ocorre raramente como doença primária em indivíduos imunocompetentes, e pode acometer a pele, os olhos, o trato digestório e o Sistema Nervoso Central, porém a infecção geralmente se localiza no trato respiratório como sítio primário, podendo se disseminar para outros órgãos (LATGÉ, 1999; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Das diversas espécies reconhecidas do gênero *Aspergillus*, cerca de 20 são consideradas patogênicas, sendo o *A. fumigatus* o mais importante, e responsável por 90 a 95% dos casos de aspergilose. Espécies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans*, também possuem potencial patogênico e ocasionalmente são relatadas como agentes etiológicos da doença (SEVERO et al., 1997; LATGÉ, 1999; ABARCA, 2000; STEVENS et al., 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A aspergilose acomete uma grande variedade de animais, desde mamíferos à alguns répteis, mas sua grande importância é observada em humanos e aves

tanto domésticas como silvestres (GEORGE, 1997; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; TELL, 2005).

Nos últimos 10 anos esta enfermidade adquiriu enorme importância na área médica pelo aumento do número de indivíduos imunossuprimidos, devido aos avanços nas cirurgias de transplantes e nos fármacos utilizados para tratamento de pacientes oncológicos. A aspergilose invasiva, é considerada hoje em dia a segunda micose mais freqüente em diagnósticos, e a maior causa de mortalidade em pacientes imunossuprimidos, principalmente nos centros de tratamento de leucemia e de transplante de medula óssea, e nas unidades de transplantes de órgãos sólidos (LATGÉ, 1999; STEVENS et al., 2000; WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000).

Em medicina veterinária, a aspergilose tem destaque especial na produção avícola, sendo responsável por grandes perdas econômicas. Nestes estabelecimentos, a aspergilose é considerada a infecção fúngica de maior ocorrência, levando à altos índices de mortalidade, que podem ultrapassar 50% do lote em aves jovens nos primeiros dias de vida, podendo também acometer embriões no interior dos ovos (REDIG, 1993; KEARNS; LOUDIS, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004; TESSARI et al., 2004; TELL, 2005). As aves silvestres e marinhas, algumas com elevado valor ecológico, são especialmente suscetíveis à infecção por *Aspergillus* spp., o que acarreta sérios prejuízos em zoológicos e centros de reabilitação (CORK et al., 1999; GARCIA; BLANCO, 2000; MARTINÉZ; CERECERO; CERVANTES, 2000; STONE; OKONIEWSKI, 2001; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

A aspergilose não é considerada contagiosa por transmissão horizontal e/ou vertical, e a infecção ocorre através dos conídios infectantes, que se disseminam pelo ar e penetram no organismo, principalmente por via inalatória (LATGÉ, 1999; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). Pesquisas ambientais indicam que o *A. fumigatus* está presente em altas concentrações (1-100 conídios/m³) no ar, tanto de ambientes internos como externos, demonstrando que todos os indivíduos inalam centenas destes propágulos fúngicos por dia, os quais são eliminados pela resposta imune inata do hospedeiro sadio, não causando dano algum ao organismo (LATGÉ, 1999, 2001, RIVERA; HOHL; PAMER, 2006).

A infecção fúngica com conseqüente desencadeamento da doença é decorrente do tamanho do inóculo, e principalmente da imunossupressão do hospedeiro que o torna incapaz de eliminar do organismo os conídios inalados.

Estes conídios penetram no trato respiratório inferior, germinam e formam hifas iniciando uma invasão tecidual e endotelial, causando lesão, infarto hemorrágico e trombose (LATGÉ, 1999; WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000; SIDRIM; ROCHA, 2004; MENDES-GIANNINI et al., 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005; RIVERA; HOHL; PAMER, 2006). A germinação dos conídios e o crescimento das hifas do *A. fumigatus* são ainda significativamente facilitados pela presença da albumina, indicando que em hospedeiros com alta concentração desta proteína no soro, seja pela administração exógena ou pelo desequilíbrio de proteínas plasmáticas, o fungo consegue se desenvolver mais rapidamente facilitando o desencadeamento de uma forma invasiva mais grave (RODRIGUES; ARAUJO; PINA-VAZ, 2005).

2.2.1 Resposta imune do hospedeiro

A primeira linha de defesa do hospedeiro ao fungo *Aspergillus* spp. são as barreiras mecânicas, caracterizadas no trato respiratório pelo sistema mucociliar e o reflexo de tosse (LATGÉ, 2001). Muitas proteínas e peptídeos secretados pelo epitélio do trato respiratório, ou pelas células fagocíticas, possuem atividade antimicrobiana além de imunomoduladora e participam da defesa inata contra esses agentes pulmonares agressores, como lactoferrina, lisozima, defensina e proteínas do surfactante (SHOHAM; LEVITZ, 2005; ROGAN et al., 2006).

Sob um ponto de vista geral, a resposta imune do hospedeiro contra *Aspergillus* spp. é basicamente celular. Assim, os conídios que não são eliminados pelas barreiras mecânicas e conseguem atingir o trato respiratório inferior, ativam uma resposta inflamatória inespecífica, sendo eliminados pelas células fagocíticas do trato respiratório, principalmente através de mecanismos não-oxidativos. Os conídios que conseguem resistir à fagocitose germinam formando hifas, as quais são destruídas através de mecanismos oxidativos, provenientes da degranulação de neutrófilos com a liberação de enzimas líticas na superfície da estrutura fúngica (LATGÉ, 1999; GAFA et al., 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005; SINGH; PATERSON, 2005).

As células dendríticas possuem um papel fundamental na modulação da resposta imune contra a aspergilose. Esse efeito imunomodulatório está determinado pela liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 no sítio inicial da infecção, pela apresentação de antígenos aos linfócitos locais, e pela

internalização do agente, carreando-o até o baço e aos linfonodos regionais, para apresentá-lo e transmitir a informação aos linfócitos T (LATGÉ, 2001; GAFA et al., 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005; RIVERA; HOHL; PAMER, 2006). Estas células de defesa específica (linfócitos T) por sua vez, são direcionados à uma resposta Th1 (imunidade celular), com produção de quimiocinas e citocinas, como IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-1, MIP-2 e MCP-1, para recrutar e ativar as células inflamatórias, auxiliando na eliminação do agente (LATGÉ, 2001; GAFA et al., 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005; RIVERA; HOHL; PAMER, 2006). Esse estímulo a Th1 ocorre na resposta contra conídios, no entanto, ao germinar e formar hifas há uma mudança no padrão de resposta ao agente, que passa a Th2, com produção de IL-4 e IL-10, as quais inibem a resposta celular facilitando a progressão da doença (SINGH; PATERSON, 2005).

A resposta humoral também é ativada. As imunoglobulinas participam da eliminação fúngica através da ativação do sistema complemento, o que resulta em deposição de seus componentes na superfície do microrganismo, desencadeando quimiotaxia e opsonização. No entanto esta linha de defesa não é a mais importante na resposta contra aspergilose, tendo em vista que defeitos na imunidade humoral, não aumentam a suscetibilidade do indivíduo à infecção por *Aspergillus* spp. (SHOHAM; LEVITZ, 2005).

Desordens qualitativas e quantitativas da função fagocítica, são os fatores de risco mais importantes na predisposição de indivíduos a aspergilose, sendo esta suscetibilidade diretamente proporcional à severidade e duração da neutropenia. As principais causas destas desordens nas células de defesa são neoplasias (leucemias), quimioterapia e altas doses ou uso continuado de corticosteróides. Este último acarreta redução da atividade de macrófagos e neutrófilos, com diminuição da produção de oxidantes reativos e óxido nítrico, assim como supressão da produção de citocinas da resposta Th1, como TNF- α e IL-1, que auxiliam na proteção contra a aspergilose, e estimulam a produção de citocinas da resposta Th2 (HO; YUEN, 2000; SHOHAM; LEVITZ, 2005; SINGH; PATERSON, 2005).

A maior suscetibilidade das aves à aspergilose em comparação com os mamíferos se dá inicialmente por características anatômicas como a falta de epiglote, que facilita a passagem de partículas para o trato respiratório inferior, falta de diafragma que resulta em ausência do reflexo da tosse, distribuição limitada de

epitélio ciliar ao longo do trato respiratório e presença de sacos aéreos, estruturas ricas em oxigênio e pouco vascularizadas (BAUCK, 1994; TELL, 2005).

Em relação à resposta celular, alguns fatores também contribuem para maior predisposição das aves à aspergilose respiratória, como a falta de macrófagos de superfície para fagocitose de conídios de *Aspergillus* spp., e a substituição de neutrófilos por heterófilos, que utilizam proteínas catiônicas, hidrolases e lisozimas ao invés de mieloperoxidase e mecanismos oxidativos para destruição das hifas fúngicas (TELL, 2005).

Outros fatores como transporte, superlotação, má nutrição, ventilação pobre, antibioticoterapia, administração de corticosteróides, doenças concomitantes e irritantes respiratórios (ex.: amônia, fumaça, desinfetantes voláteis) são considerados importantes e aumentam a suscetibilidade das aves à aspergilose (BAUCK, 1994; TELL, 2005). A hipovitaminose A tem sua importância estabelecida à medida que modifica o epitélio escamoso estratificado da região da siringe, causando hipertrofia e hiperqueratose, que facilitam a colonização por conídios de *Aspergillus* spp. (BAUCK, 1994).

2.2.2 Formas e Sinais Clínicos

Em humanos, a aspergilose respiratória pode determinar um processo alérgico conhecido como aspergilose broncopulmonar alérgica, um processo fixo caracterizado por granulomas intracavitários conhecidos como “bola fúngica”, e/ou um quadro de aspergilose invasiva que geralmente é fatal (LATGÉ, 1999; STEVENS et al., 2000; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em pequenos animais ocorre principalmente em cães, e acomete a cavidade e seios nasais, determinando descarga nasal seropurulenta e destruição dos cornetos nasais, que pode levar à despigmentação e erosão do focinho (GARCIA; BLANCO, 2000; TELL, 2005). Os exemplares desta espécie acometidos geralmente não apresentam uma imunossupressão sistêmica e, na maioria das vezes, as hifas não invadem a mucosa, permanecendo uma infecção local (sino-nasal) sem disseminação (PEETERS et al., 2006).

Abortos em eqüinos, ovinos e bovinos podem ser decorrentes de infecção por *Aspergillus* spp., bem como mamite, ceratomicose, sinusite e comprometimento de bolsa gutural (ANDREATTI FILHO, 2000, GANCEDO; GRANDES; DÍEZ, 2000;

GARCIA; BLANCO, 2000; CORBELLINI et al., 2003; MACHADO et al., 2005; TELL, 2005).

Em se tratando especificamente da aspergilose em aves, a apresentação clínica pode ser diversa, dependendo do sítio anatômico inicial da infecção. A doença pode ocorrer no cérebro levando à sinais clínicos neurológicos como ataxia e torcicolo, na pele causando dermatite necrótica granulomatosa, e nos olhos desencadeando ceratite geralmente unilateral. No entanto, o trato respiratório inferior é o principal sítio anatômico da micose, levando à sinais como apatia, dispnéia, ruídos respiratórios, alteração na vocalização e emaciação (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ANDREATTI FILHO, 2000; MARTINÉZ; CERECERO; CERVANTES, 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003, TELL, 2005).

Nesta espécie, a doença pode ser classificada como aguda ou crônica e localizada ou sistêmica. A forma aguda ocorre principalmente em aves domésticas jovens, aves silvestres e marinhas, a partir da germinação de conídios em um órgão vital, ou da formação de múltiplas lesões simultaneamente. Esta forma causa uma rápida e massiva colonização fúngica, com formação de granulomas miliares e curso clínico geralmente menor que uma semana, podendo ocorrer morte aguda em 48h. Já a forma crônica acomete principalmente aves adultas e se caracteriza por granulomas no trato respiratório que tendem a disseminação para órgãos adjacentes, apresentando um curso clínico de semanas a meses de duração (BAUCK, 1994; MARTINÉZ; CERECERO; CERVANTES, 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

A siringe ou bifurcação da traquéia é um local freqüentemente acometido pelo fungo, devido ao estreitamento do lúmen e ao padrão de turbulência do ar que permite que os conídios escapem do fluxo expiratório (BAUCK, 1994). Esta forma traqueal da aspergilose é caracterizada por lesão localizada (granulomas) ou pelo acúmulo de secreção e restos necróticos na região da siringe levando à obstrução parcial ou total da via aérea, com dispnéia evidente e morte aguda (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

Em casos de aspergilose sistêmica, a disseminação fúngica geralmente ocorre via sacos aéreos ou via hematógena, com a formação de trombos vasculares contendo hifas fúngicas, e as lesões são comumente encontradas em trato respiratório, fígado, serosa do trato gastrointestinal e vísceras abdominais, podendo ou não ter sinais clínicos aparentes, como redução gradual da função respiratória,

plumagem eriçada, apatia e anorexia (REDIG, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004).

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da aspergilose respiratória é de difícil realização “in vivo” devido à rápida evolução da doença. Muitas vezes não há sinais clínicos aparentes, sendo frequentemente realizado diagnóstico pós-morte, através da necropsia e colheita de amostras de tecidos para exame direto, cultura micológica e exame histopatológico (REDIG, 1993; BLANCO et al., 1998; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; TESSARI et al., 2004).

No exame pós-morte, macroscopicamente as lesões da aspergilose são caracterizadas por nódulos branco-amarelados, isolados ou agrupados variando de um milímetro a mais de sete centímetros de diâmetro. Junto a estas lesões podem ser observados exsudato amarelado caseoso, fibrose, colônias fúngicas brancas a verde-azuladas, hiperemia e congestão pulmonar, espessamento de sacos aéreos e hepatomegalia (BAUCK, 1994; ANDREATTI FILHO, 2000; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004; TESSARI et al., 2004; TELL, 2005).

O exame histopatológico pode ser realizado pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), Gomori-Grocott (Prata) ou Ácido Periódico de Schiff (PAS), e os achados histopatológicos de aspergilose em aves correspondem principalmente à pneumonia granulomatosa, seguida de aerosaculite fúngica, broncopneumonia, micetomas traqueobrônquicos, e trombose com necrose aguda (BAUCK, 1994; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Nos cortes histológicos dos tecidos acometidos pelo fungo observam-se granulomas com foco necrótico circundado de macrófagos e heterófilos, e em casos crônicos há presença de células gigantes e cápsula de tecido conjuntivo (BAUCK, 1994; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004). Hifas hialinas, septadas e dicotômicas com bifurcações em ângulo agudo (45°) podem ser visualizadas nos tecidos. No lúmen das cavidades aeradas observa-se a presença de estruturas de frutificação aspergilar completa, com conidióforos e numerosos conídios produzidos pelas fiálides (BAUCK, 1994; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004). A presença da fase reprodutiva anamórfica do fungo nos tecidos é um achado comum da aspergilose em aves, devido à

presença dos sacos aéreos cavernosos, a temperatura corporal e a sensibilidade das aves à gliotoxina. Estes fatores promovem um ambiente ideal para germinação fúngica, caracterizado por pouca vascularização, poucas células de defesa, e ainda condições ideais de temperatura, oxigênio e nutrientes (TELL, 2005).

Os métodos mais utilizados para diagnóstico “in vivo” de aspergilose respiratória em aves compreendem, juntamente com histórico e sinais clínicos, exame direto, cultura fúngica, endoscopia e/ou sorologia, além dos exames complementares como radiologia e hematologia (REDIG, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; TELL, 2005).

A colheita de amostra do trato respiratório de aves, para exame direto, cultivo e isolamento fúngico deve ser realizada sob anestesia, através de aspirado transtraqueal, lavado traqueal ou bronco-alveolar (0,5 a 1ml/Kg de salina estéril), sendo este último de grande valor para diagnóstico laboratorial devido a alta especificidade da amostra (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

O exame direto deve ser realizado com adição de hidróxido de potássio (KOH) e/ou coloração de lactofenol azul de algodão dependendo da natureza da amostra, para visualização das estruturas fúngicas. Já o cultivo micológico pode ser realizado em meio ágar Sabouraud dextrose, acrescido de cloranfenicol, sem cicloheximida, incubado por até sete dias com observação diária (BAUCK, 1994; LACAZ, et al., 2002). A temperatura de incubação deve se assemelhar à temperatura corporal do hospedeiro, mimetizando o ambiente em que o fungo estava habitando, visto que este microrganismo se adapta às condições do hospedeiro para garantir sua sobrevivência (TARRAND et al., 2005).

Contudo, a interpretação de um resultado positivo para *Aspergillus* spp. no cultivo micológico deve ser realizada com muita cautela, à medida que este é um fungo ubíquo considerado um dos principais contaminantes de laboratório, e que pode estar presente na pele e no trato respiratório superior de todos animais sadios. Portanto, exames complementares, como histopatologia, hematologia ou sorologia, devem ser realizados concomitantemente, sempre que possível, para confirmação do diagnóstico desta enfermidade (BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

O hemograma das aves com aspergilose revela leucocitose, com heterofilia em estágio inicial, monocitose com heterófilos tóxicos em estágios mais avançados da doença, e linfopenia (REDIG, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS;

LOUDIS, 2003). Em infecções crônicas, anemia não regenerativa pode estar presente, e a eletroforese das proteínas do soro pode detectar a presença de inflamação crônica compatível com a enfermidade, caracterizada por hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia (BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

Dentre os exames de imagem mais utilizados no auxílio ao diagnóstico de aspergilose destacam-se a endoscopia, a radiologia e a tomografia computadorizada. A endoscopia permite examinar, de imediato, a traquéia e os sacos aéreos torácicos, sendo a presença de manchas esbranquiçadas de elementos fúngicos nos tecidos, e a visualização de granulomas na siringe bastante característica na doença. O exame endoscópico também é útil para monitoramento da evolução da doença na ave após início do tratamento, assim como para colheita de amostra clínica para exame direto e cultura (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

Os achados radiológicos podem ser negativos, bem como demonstrar aumento da radiopacidade assimétrica no trato respiratório e perda da definição da parede dos sacos aéreos. Estas lesões são sugestivas de aspergilose, e nestes casos em que há alteração radiológica, o prognóstico da doença é desfavorável e geralmente não há tratamento eficiente (REDIG, 1993; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

Na medicina humana, a tomografia computadorizada é muito utilizada e caracteriza um excelente método complementar de diagnóstico, demonstrando sinais sugestivos de aspergilose tanto em estágios iniciais como em estágios tardios da doença. No entanto, este exame apresenta um alto custo não sendo atualmente viável para utilização de rotina em aves (WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000).

Sorologicamente o teste de ELISA é indicado e muito utilizado para diagnóstico da aspergilose em aves silvestres e marinhas, detectando anticorpos uma semana pós-infecção pelos conídios, e semanas antes da presença de qualquer sinal clínico da micose. Os títulos de anticorpos começam a declinar conforme ocorre a remissão da doença, de duas a três semanas de tratamento, contudo amostras seriadas podem determinar a duração do tratamento e monitorar a evolução deste. A desvantagem deste teste é que o resultado pode demorar até uma semana, e que a grave imunossupressão do paciente pode determinar

resultados falso-negativos (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de estabelecer o diagnóstico precoce desta enfermidade, com testes baseados na identificação de antígenos ou metabólitos fúngicos em amostras clínicas (SINGH; PATERSON, 2005; TELL, 2005). Um dos antígenos mais estudados é a galactomanana, componente da parede celular de fungos do gênero *Aspergillus*, liberado na circulação sanguínea durante o crescimento fúngico nos tecidos do hospedeiro. Este antígeno pode ser detectado em diferentes amostras clínicas, como soro, fluido cérebro-espinhal, lavado bronco-alveolar e urina, apresentando alta sensibilidade e especificidade. A desvantagem é a sua rápida eliminação do sangue circulante pela formação de complexos imunes e ainda por endocitose pelas células de kupffer no fígado (BLANCO et al., 1998; SINGH; PATERSON, 2005).

As técnicas moleculares também têm sido estudadas na tentativa de estabelecer o diagnóstico precoce da aspergilose, através da amplificação de seqüências específicas de DNA ou de RNA do fungo a partir de diferentes amostras clínicas, como sangue, urina, lavado bronco-alveolar, entre outros. No entanto, algumas desvantagens são descritas como contaminação da amostra devido à característica anemófila deste gênero fúngico e reação cruzada com outros fungos filamentosos, resultando em falso-positivos (BLANCO et al., 1998; LOEFFLER et al., 2001).

Recentemente, Beytu, Özcan e Erginsoy (2004) comprovaram a eficácia da imuno-histoquímica com o uso de anticorpo monoclonal para diagnóstico de aspergilose em casos atípicos desta micose em aves, diferenciando-a de outras doenças causadas por fungos filamentosos como as zigomicoses ou fusariomicoses. E ainda, Lewis et al. (2005) comprovaram a presença da gliotoxina em soro de animais experimentalmente infectados com *A. fumigatus*, e em 80% dos humanos com aspergilose invasiva estudados, sugerindo que esta pode vir a ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da micose.

Apesar de muitos métodos em estudo, ainda não existe um teste que realize o diagnóstico de aspergilose precocemente, com alta especificidade e alta sensibilidade. Este teste seria extremamente útil, à medida que eliminaria tratamentos desnecessários e aumentaria a eficácia dos tratamentos realizados (BLANCO et al., 1998).

2.2.4 Tratamento e Prevenção

O tratamento eficaz da aspergilose é difícil de ser efetuado, devido ao estágio avançado em que a doença normalmente é diagnosticada e à característica progressiva da enfermidade. A terapia deve ser feita a partir da remoção cirúrgica da lesão, quando possível, associada ao emprego de fármacos antifúngicos, sendo geralmente efetiva para a forma localizada e ineficaz em casos de aspergilose disseminada (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Em aves de produção, o tratamento individual não é realizado devido à relação custo-benefício não compensatória, porém em algumas aves marinhas e silvestres em cativeiro a terapia é viável, sendo preconizada a remoção cirúrgica do aspergiloma e/ou de administração de antifúngicos (BAUCK, 1994; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003).

Os fármacos antifúngicos para aves podem ser administrados por nebulização, via oral, intratraqueal, e/ou endovenosa, podendo ser utilizados diversas substâncias ativas isoladamente, ou de preferência associadas. A nebulização com antifúngicos é indicada no tratamento da aspergilose respiratória, de três a quatro vezes por dias durante 10-15 minutos por sessão, e deve ser continuada por no mínimo três dias após a cura clínica (BAUCK, 1994).

Esta terapia inalatória é realizada principalmente com anfotericina B ou ainda com enilconazol. Ambos os fármacos possuem também uma excelente atividade antifúngica por contato direto via intratraqueal, e a anfotericina B ainda pode ser administrada por via endovenosa ou diretamente no saco aéreo infectado. Esta droga em aves é eliminada mais rapidamente e apresenta menor toxicidade quando comparada com os mamíferos (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003, ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003). Por via oral, o itraconazol é o antifúngico mais utilizado e considerado o medicamento de eleição para terapia da aspergilose em aves, demonstrando bons resultados e raramente apresentando efeitos colaterais e reações adversas (BAUCK, 199; KEARNS; LOUDIS, 2003)

Apesar dos fármacos antifúngicos estarem padronizados para aves tanto quanto à dosagem, como quanto à duração do tratamento e via de administração, na maioria dos casos a terapia não é eficaz, devido a inúmeros fatores, especialmente àqueles ligados à suscetibilidade do hospedeiro, sendo a prevenção a melhor forma

de controle da aspergilose nesta espécie (ANDREATTI FILHO, 2000; FOWLER; FOWLER, 2001).

Em hospitais humanos, a prevenção da aspergilose é realizada nas áreas críticas, ou seja, áreas de internação de pacientes de alto-risco, através do controle da temperatura, umidade e higiene, sendo ainda preconizado o uso de filtros de ar de alta-eficiência (HEPA), ambientes selados, ventilação com pressão positiva, e freqüente trocas de ar. Estas medidas são realizadas para que seja mantida uma contagem de no máximo 5 UFC/m³ de *Aspergillus*, com a quantidade desejável de 0,1 UFC/m³ nestes locais (MORRIS et al., 2000; AFONSO et al., 2004).

Nos mais distintos locais de cativeiro de animais, principalmente de aves, desde aviários a zoológicos e centros de recuperação, a presença de matéria orgânica é inevitável, sendo crucial para a prevenção da aspergilose nestes ambientes, um programa disciplinado e específico de limpeza, higiene e desinfecção constantes das instalações e equipamentos, visando a manutenção da qualidade do ar que minimiza a proliferação fúngica e o número de conídios aos quais o animal está sendo exposto (BAUCK, 1994; CORK et al., 1999; KEARNS; LOUDIS, 2003; TESSARI et al., 2004).

Dentre as substâncias químicas eficazes mais utilizadas na desinfecção de ambientes avícolas está o enilconazol, sob a forma de aerossóis e fumigação, e os produtos a base de fenol e amônia quaternária por fricção mecânica ou pulverização (ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; SANCHEZ; GARRET; SANCHEZ, 2006).

O monitoramento do ambiente quanto à presença de *Aspergillus* deve ser realizado rotineiramente, com exames da qualidade do ar através de aerobiocoletores ou pela técnica de sedimentação, com periodicidade mínima quinzenal (ANDREATTI FILHO, 2000). As técnicas de colheita de ar por métodos volumétricos, apesar de requererem aparelhos de alto custo e pouca praticidade, conferem resultados mais fidedignos que permitem a contagem de UFC/m³, enquanto que os métodos não-volumétricos, como a técnica de sedimentação, são práticos e de baixo custo, porém resultam em análise somente qualitativa do ar, e cujo resultado sofre interferência de diversos fatores ambientais, como turbulência e velocidade do vento (MORRIS et al., 2000; AFONSO et al., 2004).

O resultado dos exames da qualidade do ar serve como indício da contaminação ambiental, porém, mesmo que apresentem valores dentro dos

parâmetros desejados não descartam nunca a necessidade de medidas de controle do fungo, visto que fornecem dados microbiológicos momentâneos que facilmente se modificam caso não haja uma vigilância constante, devido a característica anemófila e ubíqua de alguns microrganismos como os fungos do gênero *Aspergillus* (MORRIS et al., 2000).

Além da manutenção da qualidade do ar, alguns autores sinalizam ainda, a possibilidade da imunoprofilaxia nos indivíduos suscetíveis, assim, diversos estudos têm sido realizados na elaboração de vacinas contra a aspergilose, com inúmeros antígenos de *Aspergillus* spp. administrados por diferentes vias, desde intranasais a endovenosas. Apesar de alguns resultados serem insatisfatórios, muitos são promissores na estimulação da resposta imune para prevenção da micose (RICHARD et al., 1982; RICHARD et al., 1984; RICHARD; PEDEN; SACKS, 1991; BAUCK, 1994; GRACZYK et al., 1998; CENCI et al., 2000; STEVENS, 2004).

2.3 Pingüins

Os pingüins pertencem a Ordem *Sphenisciformes* que contem uma única família, *Spheniscidae*, dividida em seis gêneros com 17 espécies. Essas aves marinhas habitam o hemisfério Sul, mas apesar de serem consideradas um símbolo Antártico, a maioria das espécies se distribui nas ilhas subantárticas e costa sul da América do Sul (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). São aves adaptadas ao mergulho, com corpo fusiforme, sem ossos pneumáticos e com asas diferenciadas em nadadeiras, chamadas de aletas. Para termorregulação, além de uma camada espessa de tecido adiposo no subcutâneo, apresentam peculiaridades do sistema circulatório que auxiliam nas trocas de calor (FOWLER; FOWLER, 2001).

Atualmente, 10 das 17 espécies encontram-se na lista vermelha da União Internacional de Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), classificadas como vulnerável ou até mesmo ameaçadas de extinção (IUCN, 2006).

Em especial o pingüim-de-magalhães (*S. magellanicus*) se destaca em nosso contexto, pela sua distribuição e rota migratória, que permitem o freqüente aparecimento de exemplares desta espécie durante o inverno no litoral do Rio Grande do Sul (PETRY; FONSECA, 2002, SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

Os pingüins-de-magalhães se reproduzem na costa da Argentina, Chile e Ilhas Malvinas durante os meses de setembro a março, e posteriormente migram em

direção ao Brasil seguindo uma corrente de água fria vinda das ilhas em busca de alimento, percorrendo áreas de intenso tráfego de petróleo (Fig.1) (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). Durante este período de migração de aproximadamente sete meses, muitos exemplares são contaminados ao cruzar com manchas de óleo nos mares, o que lhes confere a perda da impermeabilidade das penas e consequentemente uma hipotermia, levando-os para o litoral. Em terra firme estes animais não obtém alimento ocorrendo um agravamento do quadro geral que cursa com desnutrição (hipoglicemia e hipoproteïnemia) e desidratação (MAZET et al., 2002).

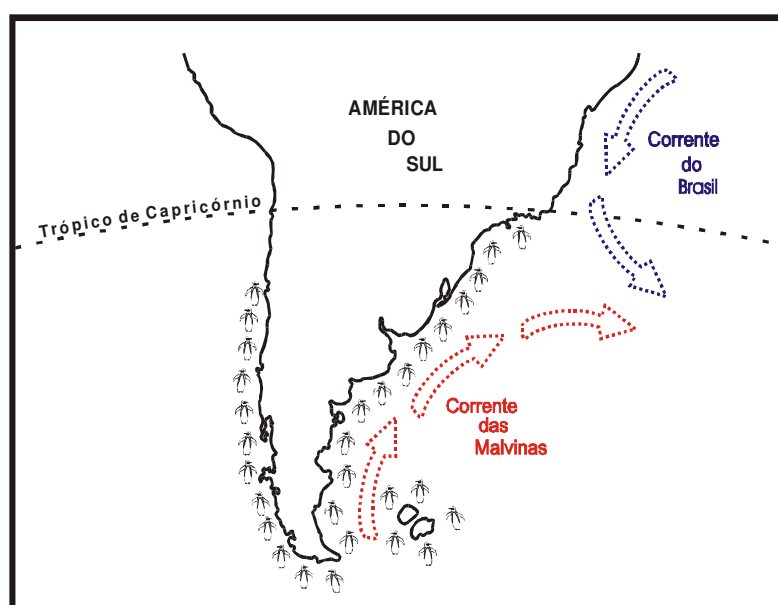


Figura 1 – Distribuição das colônias reprodutivas de Pingüins-de-magalhães e correntes marítimas que auxiliam sua rota migratória.

Fonte: CRAM

Esta espécie de pingüins não está ameaçada de extinção nem classificada como vulnerável, no entanto, em função da poluição dos mares e da pesca comercial que acarreta escassez de alimento, está atualmente considerada como “quase ameaçada” pela IUCN. Isto porque sua população tem diminuído drasticamente nas últimas décadas, demonstrando um declínio de 76% da população total nas Ilhas Malvinas desde o período de 1989-1990 a 2001-2002, e ainda um declínio anual de 1,1% da população de pingüins adultos e 6% da população de juvenis na costa Argentina (GANDINI et al., 1994; BINGHAM, 2002; IUCN, 2006), comprovando que este cenário pode mudar em alguns anos.

Nas praias brasileiras, desde o Rio de Janeiro ao litoral gaúcho, também são encontradas anualmente dezenas a centenas de exemplares de pingüins-de-

magalhães contaminados por petróleo e debilitados (Fig.2) (PETRY; FONSECA, 2002; GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). Em estudos realizados no período de 1985 a 1989 e no ano de 1998, a quantidade de pingüins oleados correspondeu a 29% (82/282) e 55% (77/140), respectivamente, dos exemplares de *S. magellanicus* encontrados na praia do Cassino, costa do Rio Grande do Sul (BARBIERI; VOOREN, 1993; SILVA-FILHO *comunicação pessoal*¹).



Figura 2 – Pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) juvenil contaminado por petróleo encontrado na praia do Cassino, RS, Brasil.

Na tentativa de frear as conseqüências destes danos causados pelos homens, diversas organizações têm sido formadas no sentido de auxiliar a reabilitação dos animais. Reabilitar significa restituir a um indivíduo sua capacidade perdida, e proporcionar sua liberação e reintegração satisfatória ao ambiente natural. Esta tarefa começou a ser realizada na América do Sul no ano de 1980, com um grupo formado na Argentina (Mar del Plata), e hoje em dia é realizada por Centros de Reabilitação que desempenham um papel importante na conservação e preservação de diferentes espécies animais, atuando com infra-estrutura específica e profissionais capacitados na área (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006).

¹ Informação recebida por Rodolfo Pinho da Silva Filho, médico veterinário responsável pelo CRAM e membro da International Fund for Animal Welfare (IFAW), em Rio Grande, em dezembro de 2006.

2.3.1 Centros de Reabilitação

Entre as cidades de Salvador no Brasil ($12^{\circ}58'S$, $38^{\circ}29'W$) e Santo Antônio do Oeste na Argentina ($40^{\circ}43'S$, $64^{\circ}55'W$) existem 6.800km de costa que contam atualmente com 25 grupos desempenhando a tarefa de reabilitação de pingüins (Fig.3). Destes, dois estão situados ao norte do Rio de Janeiro, 11 entre o Rio de Janeiro e Santos, apenas cinco entre Santos (Brasil) e Uruguai, e sete entre Uruguai e Argentina (Mar del Plata) (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006).



Figura 3 – Localização de alguns centros de reabilitação de animais marinhos na América do Sul.

Fonte: IBRRC, 2006. http://www.ibrrc.org/penguin_network.html.

Na cidade de Rio Grande ($32^{\circ}03'S$, $52^{\circ}08'W$) foi projetado e estruturado o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) para ser referência no sul do Brasil em atividades de reabilitação da fauna marinha com ênfase para a despetrolização. Desde a sua construção em 1996, o CRAM já recebeu mais de 500 pingüins-de-magalhães, além de dois exemplares de pingüim-rei (*Aptenodytes patagonica*) e dois pingüins de penacho amarelo (*Eudyptes chrysocome*) (Fig.4). Nos últimos dois derrames registrados na costa do Rio Grande do Sul, em 1998 e 2002, aproximadamente 140 e 115 aves marinhas, respectivamente, foram encaminhadas ao CRAM, que atingiu um percentual de reabilitação superior a 70% (RUOPPOLO et al., 2004; SILVA-FILHO *comunicação pessoal*¹).

¹ Informação recebida por Rodolfo Pinho da Silva Filho, médico veterinário responsável pelo CRAM e membro da International Fund for Animal Welfare (IFAW), em Rio Grande, em dezembro de 2006.

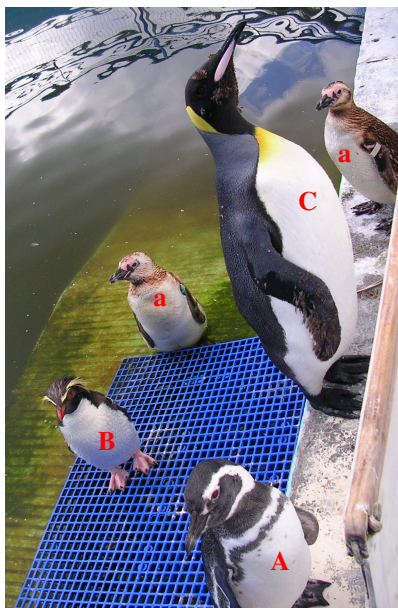


Figura 4 – Exemplares de três diferentes espécies de pingüins no CRAM. (A) pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) adulto e (a) juvenil; (B) pingüim de penacho amarelo (*Eudytes chrysocome*); (C) pingüim-rei (*Aptenodytes patagonica*).

As instalações do CRAM (Fig. 5) estão localizadas à beira da Lagoa dos Patos, e compreendem uma área de 308m² que abrange um prédio com ambulatório e unidade de despetrolização, e uma área externa onde estão localizados dois tanques com 2,5 metros de profundidade e capacidade para 180.000 litros de água, além de quatro áreas secas de piso de cimento, duas com 36m² e outras duas com 52m². Os tanques são equipados com um sistema de circulação de água através de bombas que permitem a renovação de até 100% da água em 24 horas retirando-a do estuário para os tanques e drenando-a no sentido inverso.



Figura 5 – Vista aérea das instalações do CRAM, à beira da Lagoa dos Patos – Rio Grande, RS, Brasil.

O protocolo utilizado pelo CRAM para reabilitação de pingüins, bem como outros protocolos estabelecidos para utilização pelos profissionais que atuam nesta área, detêm um item de grande importância relacionado à prevenção da aspergilose. Este foi estruturado com base nos requisitos para manutenção de aves marinhas em zoológicos e aquários, e após comprovação da importância desta doença através dos resultados de necropsias de aves em centros de reabilitação (DIEBOLD; BRANCH; HENRY, 1999; CARRASCO et al., 2001; MAZET et al., 2002; SANCHEZ; GARRET; SANCHEZ, 2006; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

2.3.2 Aspergilose em pingüins

A aspergilose é uma enfermidade rara em pingüins de vida livre, que apresenta pouca relevância nas colônias reprodutivas conhecidas como pingüineiras. Em um estudo realizado por Hocken (2000) na Nova Zelândia, esta micose foi relatada como responsável por sete mortes de um total de 213 pingüins-azul (*Eudyptula minor*) analisados, correspondendo a uma pequena taxa de 3,3% dos animais.

No entanto, esta doença caracteriza uma situação bem distinta quando relacionada a locais de cativeiro destas aves marinhas. Nestes estabelecimentos, a aspergilose já foi descrita em diversas espécies de pingüins, e geralmente ocorre em decorrência de fatores estressantes, como mudança de ambiente e manejo, injúria ou outras doenças concomitantes, que conferem a estas aves uma alta suscetibilidade à infecção primária por *Aspergillus* spp. (REDIG, 1993; GRACZYK; COCKREM, 1995; ROCHETTE; ENGELN; BOSSCHE, 2003; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

A predisposição dos pingüins a aspergilose é ainda agravada pelo esforço físico proveniente da sua migração que desencadeia um significativo grau de imunossupressão, além das peculiaridades pertencentes às aves, como anatomia e fisiologia do trato respiratório e resposta imune celular. Outras situações frequentemente encontradas em centros de reabilitação que aumentam a imunossupressão dos pingüins e conseqüentemente aumentam a chance de infecção por *Aspergillus* spp. é o acometimento por petróleo e o uso de corticosteróides e antibióticos (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; TELL, 2005).

Assim, nos pingüins mantidos em zoológicos, aquários ou centros de reabilitação a aspergilose é comumente associada a altas taxas de mortalidade, acarretando sérios prejuízos ecológicos e econômicos para os estabelecimentos (REDIG, 1993; GRACZYK; CRANFIELD, 1995; FOWLER; FOWLER, 2001; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003; SANCHEZ; GARRET; SANCHEZ, 2006; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). Esta situação é documentada desde a década de 40 em zoológicos (AINSWORTH; REWELL, 1949), e teve sua importância reconhecida a partir dos anos 70 em centros de reabilitação, após o primeiro grande acidente ecológico com derramamento de petróleo registrado (“Oregon Standard”, São Francisco, Califórnia, EUA), que acometeu aproximadamente 7.000 aves das quais 6.700 morreram, sendo a maioria por aspergilose (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; IBRRC, 2006).

A Figura 6 demonstra dados referentes a estudos realizados em zoológicos na Inglaterra (Londres e Escócia), Índia (Nova Delhi) e nos EUA (Michigan) publicados respectivamente, nos anos de 1949, 1990, 1977 e 2003, que descrevem a mortalidade por aspergilose em distintas espécies, como pingüins-de-magalhães (*S. magellanicus*), pingüins Gentoo (*Pygoscelis papua*), pingüim de barbicha (*Pygoscelis antarctica*) e pingüim-rei (*Aptenodytes patagonica*) (AINSWORTH; REWELL, 1949; KHAN et al., 1977; FLACH; STEVENSON; HENDERSON, 1990; KITTLE, 2003). Ainda nesta mesma figura está representada a taxa de mortalidade de aves marinhas por aspergilose, em um centro de reabilitação (International Bird Rescue Research Center - IBRRC), após desastre ecológico com derramamento de petróleo na costa de Washington (EUA) no ano de 1991 (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003).

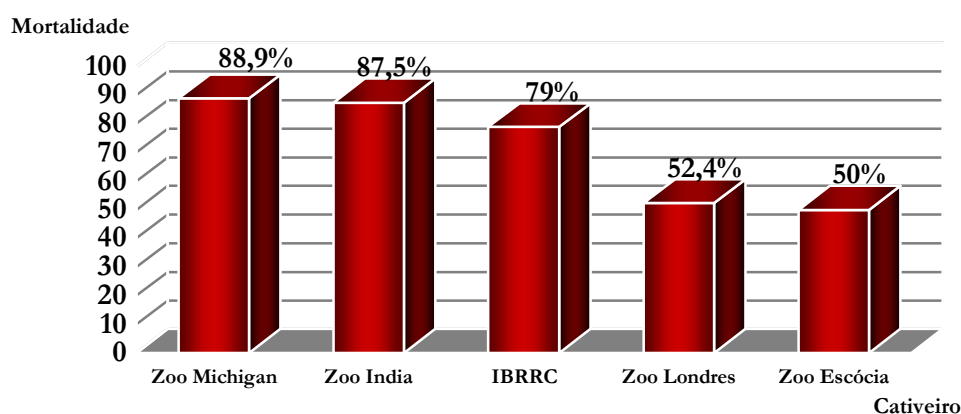


Figura 6- Taxas de mortalidade relacionadas à infecção por fungos do gênero *Aspergillus* em pingüins em distintos locais de cativeiro.

A principal forma clínica da aspergilose em pingüins é caracterizada por uma enfermidade difusa do trato respiratório inferior, com comprometimento de sacos aéreos e pulmões. A forma traqueal, bem como a disseminação para órgãos como fígado, serosa do trato digestório e rins é comum, e o animal apresenta sinais clínicos como dispnéia, emaciação, letargia, anorexia e/ou morte aguda (AINSWORTH; REWELL, 1949; KHAN et al., 1977; CARRASCO et al., 2001; KEARNS; LOUDIS, 2003).

O conhecimento da alta suscetibilidade desta espécie, e de sua predisposição em adquirir a enfermidade frente a fatores estressantes deve ser levado em consideração para realização do diagnóstico presuntivo precocemente (REDIG, 1993; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003).

Apesar do tratamento eficaz da aspergilose em pingüins já ter sido descrito por Kummerfeld e Temme (1985 apud REDIG, 1993) com o uso de cetoconazol, e por Shannon (1992) com a utilização do itraconazol, sua aplicabilidade é questionável tendo em vista que apresenta muitos insucessos terapêuticos, e que muitos animais apresentam morte súbita sem sinais clínicos aparentes.

Em vista desta realidade, medidas de prevenção da aspergilose são fundamentais para manutenção de pingüins em cativeiro. Dentre estas medidas destaca-se o controle da temperatura e da ventilação adequada (aproximadamente 15 trocas de ar por hora), da limpeza e higiene do local com retirada da matéria orgânica, e da desinfecção do ambiente (REDIG, 1993; ANDREATTI FILHO, 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003; MAZET et al., 2002; RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; SANCHEZ; GARRET; SANCHEZ, 2006; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

Estas medidas utilizadas para minimizar a proliferação fúngica e o número de conídios aos quais os animais estão sendo expostos, são freqüentemente adotadas em zoológicos, porém em relação a centros de reabilitação são difíceis de serem realizadas. Isto porque em muitos casos o número de animais enfermos excede a capacidade das instalações existentes, o que acaba acarretando um maior acúmulo de matéria orgânica e uma maior dificuldade no controle das condições ambientais (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003).

Para facilitar o controle do microrganismo, o piso das instalações do cativeiro de pingüins, e o fundo das gaiolas de contenção não devem ser porosos, e sim de material de fácil limpeza e desinfecção. E ainda, esta desinfecção deve ser realizada

semanalmente em todas as superfícies das instalações com rotatividade periódica de agentes químicos, evitando o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelo fungo (SANCHEZ; GARRET; SANCHEZ, 2006).

Concomitantemente, é preconizada a redução máxima do estresse através da mínima manipulação da ave, manutenção do ambiente tranquilo, e colocação de barreira visual ao redor das gaiolas de contenção (REDIG, 1993; ANDREATTI FILHO, 2000; FOWLER; FOWLER, 2001; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003). Além disso, a nutrição adequada dos animais é de extrema importância, a fim de evitar alterações no trato respiratório que podem predispor a infecção por *Aspergillus* spp. (FOWLER; FOWLER, 2001).

Devido à suscetibilidade desta espécie à aspergilose, os protocolos de reabilitação preconizam também o uso de antifúngico profilático, principalmente em pingüins juvenis, e/ou muito debilitados (abaixo do peso de referência para espécie ou petrolizado), com administração de itraconazol (15-25mg/Kg VO, SID) por aproximadamente uma semana (MAZET et al., 2002; RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; RUOPPOLO et al., 2004; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). Este mesmo procedimento está descrito nos protocolos de manutenção de pingüins em zoológicos, porém nestes locais a administração do antifúngico profilático é recomendada em períodos de pré e pós-transferência de animais (DIEBOLD; BRANCH; HENRY, 1999).

Em zoológicos é indicada ainda, a realização de um programa de monitoramento sorológico trimestral, pelo teste de ELISA para as diferentes espécies de pingüins, com a finalidade de detectar potenciais problemas de aspergilose precocemente, e assim obter uma maior chance de sucesso terapêutico (REDIG, 1993; DIEBOLD; BRANCH; HENRY, 1999).

3.1 ARTIGO

“Contaminação do ar quanto ao gênero *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos”

Artigo sob as normas da revista “Ciência Animal Brasileira”

Contaminação do ar quanto ao gênero *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos*

Melissa Orzechowski Xavier¹, Isabel Martins Madrid¹, Lorena Leonardo de Souza¹, Marlete Brum Cleff², Ângela Leitzke Cabana¹, Luiza da Gama Osório¹, Rodolfo Pinho da Silva Filho³, Mário Carlos Araújo Meireles¹.

¹ Depto. de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, s/nº, CEP: 96010-900.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Médico Veterinário, Centro de Recuperação de Animais Marinhos de Rio Grande, Fundação Universidade Federal de Rio Grande.

Resumo

Espécies fúngicas do gênero *Aspergillus* são frequentemente associadas com alta mortalidade de aves marinhas em cativeiro. Tendo em vista que a aspergilose geralmente é adquirida pela inalação dos propágulos fúngicos presentes no ar, o estudo objetivou avaliar a qualidade do ar quanto às espécies de *Aspergillus*, das instalações internas de um centro de reabilitação de animais marinhos que frequentemente recebe pingüins, gaivotas, albatrozes e petréis acometidos por alguma moléstia. Oitenta e um dias de colheitas foram realizados distribuídos em um período de aproximadamente dois anos, através da exposição de placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol no ambiente, as quais foram posteriormente incubadas a 25°C. As colônias identificadas como pertencentes ao gênero *Aspergillus*, foram classificadas quanto à espécie através da avaliação macro e micro morfológica associada a uma chave de identificação. Foram obtidos 43 isolados classificados em sete espécies distintas, sendo *A. fumigatus* a predominante correspondendo a 27,9%, seguida de *A. niger*, *A. flavus* e outras quatro espécies de *Aspergillus* sp., demonstrando que as aves marinhas estão expostas a espécies fúngicas com potencial patogênico, o que enfatiza a necessidade de um controle microbiológico no ambiente onde são mantidos os animais em cativeiro.

Palavras-chave

Aspergillus, espécies, ambiente interno, aves marinhas.

Summary

Aspergillus species are often associated with high rates of seabirds mortality in captivity. Showing that aspergillosis is frequently acquired by inhalation of fungal conidia presents in the air, this study evaluated the air quality associated to *Aspergillus* species, on the indoor environment of a rehabilitation center of marine animals that continuous receive injured's penguin, seagull, albatross and petrel.

* Parte integrante da Dissertação de Mestrado da primeira autora

Eighty one samples were collected in around two years, by the exposition of Petri dishes with Agar Sabouraud dextrose added cloranphenicol that were incubated in 25°C. The fungal colonies identified as *Aspergillus* were classified in species by the evaluation of the macro and micro morphology associated to a classification key. It was obtained seven different species totalizing 43 isolates, and the *A. fumigatus* was the predominant corresponding to 27,9% followed by *A. niger*, *A. flavus* and four other *Aspergillus* sp., demonstrating that the seabirds are exposed to pathogenic species of *Aspergillus*, what emphasize the necessity of a microbiology control of the indoor captivity environment.

Keywords

Aspergillus, species, indoor, seabirds.

Introdução

Os microrganismos do gênero *Aspergillus* estão distribuídos mundialmente e são considerados os fungos filamentosos anemófilos de maior importância quanto à contaminação do ar de recintos fechados. Este gênero na forma anamorfa pertence à divisão Eucomycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e apresenta mais de cem espécies, as quais são identificadas conforme características morfológicas, sendo atualmente divididas em seis subgêneros, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes* e *Circumdati*, com uma ou mais seções (ABARCA, 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002).

Todas as espécies de *Aspergillus* formam colônias filamentosas de diferentes características que microscopicamente apresentam hifas septadas de aproximadamente 4µm de diâmetro, e estruturas de frutificação típica formada por célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide que promovem a reprodução assexuada do fungo através da produção de fialoconídios. Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam a forma sexuada caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos. Nestes casos, o fungo é classificado como teleomorfo e pertencente a um dos oito gêneros *Emericella*, *Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Hemicarpenales*, *Sclerocleista* ou *Fennellia* (RAPER & FENNELL, 1965; ABARCA, 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002).

Cerca de 20 espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas patogênicas, com capacidade de causar a aspergilose, doença freqüentemente associada à alta mortalidade de pingüins e outras aves marinhas em cativeiro. Esta micose geralmente é adquirida por inalação dos propágulos fúngicos presentes no

ambiente, podendo caracterizar uma infecção nosocomial (AINSWORTH & REWELL, 1949; KHAN et al., 1977; FLACH et al., 1990; BRETAGNE et al., 1997; CORK et al., 1999; MARTÍNEZ, et al., 2000; LAIR-FULLERINGER, et al., 2003). A suscetibilidade das aves a esta micose é determinada, principalmente, por peculiaridades do seu trato respiratório, como ausência de diafragma e presença de sacos aéreos que proporcionam um excelente local de colonização fúngica, com ótimas condições de temperatura e oxigênio e pouca vascularização (TELL, 2005).

Em centros de recuperação de animais marinhos os quais recebem constantemente aves para reabilitação, como gaivotas, pingüins, albatrozes e petréis, a predisposição à aspergilose é ainda maior, à medida que frequentemente estas aves são recebidas com alguma injúria primária, e submetidas ao stress do cativeiro, o que agrava sua imunossupressão (REDIG, 1993; CORK et al., 1999; CARRASCO et al., 2001; RUSSEL et al., 2003). Em vista desta realidade, o trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade do ar quanto à presença de espécies de *Aspergillus* no ambiente interno de reabilitação de um centro de recuperação de animais marinhos, localizado na cidade de Rio Grande, RS, Brasil.

Material e Métodos

A avaliação da presença de espécies de *Aspergillus* foi realizada por um período de aproximadamente dois anos, onde foram colhidas amostras das instalações internas do Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) da Fundação Universidade Federal de Rio Grande e realizadas as identificações taxonômicas dos microrganismos no Setor de Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (FV-UFPe), com confirmação no Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz.

As colheitas das amostras foram realizadas a cada 10 dias através da técnica de sedimentação. As placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol foram abertas por 15 minutos em três pontos distintos do ambiente de cativeiro interno a uma distância de aproximadamente 1,5m do solo, sendo posteriormente encaminhadas ao Setor de Micologia (FV-UFPe).

As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 25°C por até sete dias com observação diária do crescimento fúngico. Depois de decorrido este período todas as colônias filamentosas foram submetidas a exame direto com Lactofenol azul de algodão, e observadas ao microscópio ótico em um aumento de

100 a 400X. Das colônias identificadas como pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram realizados repiques em tubos de ensaio contendo Agar Batata (PDA) para obtenção da cultura pura.

Todas as amostras foram armazenadas na micoteca em tubos de ensaio contendo PDA acrescido de óleo mineral estéril, e sob refrigeração (4 °C) em frascos fechados contendo 10ml de solução salina 0,9% tamponada estéril (PBS).

A classificação das espécies de *Aspergillus* foi realizada conforme protocolo e chave de identificação propostos por Klich (2002), e confirmada pela descrição de Rapper e Fennel (1965). Para isso, foram utilizados quatro meios de cultivo diferentes (Agar Malte, Agar Czapek, Agar Czapek acrescido de extrato de levedura, Agar Czapek acrescido de extrato de levedura e 20% de sacarose), e sete dias de incubação em temperaturas de 37 °C e/ou 25 °C. Após este período foram avaliadas características macro morfológicas como coloração do anverso e reverso, diâmetro, presença de esclerócios, exsudato e/ou pigmento solúvel das colônias nos quatro meios semeados. O cultivo em lâmina foi realizado para avaliação da micro morfologia do fungo observando características do conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide, conídios, presença de aleuroconídios, cleistotécios, ascos, ascósporos e/ou células estéreis (células de Hülle) circundando os cleistotécios.

Resultados e Discussão

Durante o experimento foram efetuados 81 dias de colheitas, dos quais 27 (33,3%) foram positivos para o isolamento de uma ou mais espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, obtendo-se um total de 43 isolados de *Aspergillus* spp..

Dos 43 isolados, vinte e dois pertenciam ao subgênero *Circumdati*, apresentando características como vesícula globosa e fértil em toda superfície, disposta de forma radiada, com métula frequentemente presente (Fig.1A). Doze isolados apresentaram conidióforos lisos, vesículas piriformes a clavadas, ausência de métula e conídios verde-acizentados a azul-acizentados, características referentes ao subgênero *Fumigati* (Fig.1B). Seis isolados do subgênero *Nidulantes* se caracterizaram por conidióforo liso, vesícula subglobosa a clavadas férteis na metade superior, com a presença de métulas de distribuição colunar ou radiada e alguns com aleuroconídios (Fig.1C). E três isolados foram identificados como pertencentes ao subgênero *Aspergillus*, caracterizado por conidióforo de paredes lisas, vesículas subglobosas com fiálides na porção superior, ausência de métula,

conídios geralmente em tons de verde, e presença de cleistotécios com ascos e ascósporos (Fig.1D).

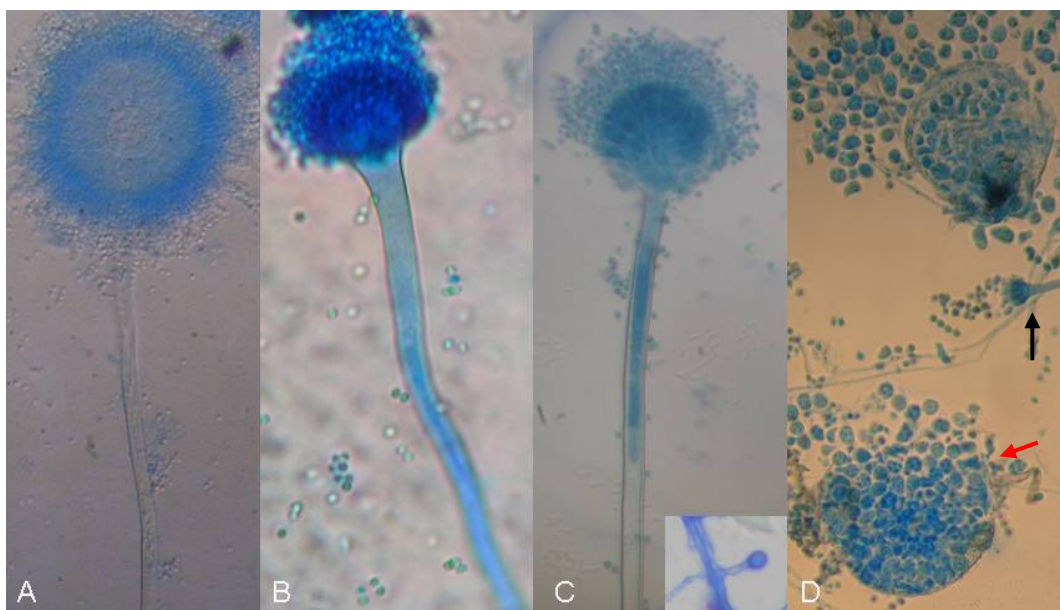


Figura 1 – Estruturas de reprodução de diferentes subgêneros de fungos *Aspergillus*. [A] Subgênero *Circumdati*; [B] Subgênero *Fumigati*; [C] Subgênero *Nidulantes*, detalhe dos aleuroconídios encontrados na espécie *A. terreus*; [D] Subgênero *Aspergillus*, seta preta e vermelha demonstrando, respectivamente, estrutura de reprodução assexuada e sexuada.

Quanto à classificação por espécies, do total de isolados de *Aspergillus* spp., 12 (27,9%) foram identificados como pertencentes ao subgênero *Fumigati*, seção *Fumigati*, espécie *A. fumigatus*; 11 (25,6%) ao subgênero *Circumdati*, seção *Nigri*, espécie *A. niger*; sete (16,3%) ao subgênero *Circumdati*, seção *Flavi*, espécie *A. flavus*; quatro (9,3%) ao subgênero *Circumdati*, seção *Circumdati*, espécie *A. candidus*; três (6,9%) ao subgênero *Nidulantes*, seção *Terrei*, espécie *A. terreus*; três (6,9%) ao subgênero *Nidulantes*, seção *Versicolores*, espécie *A. versicolor*, e três (6,9%) ao subgênero *Aspergillus*, seção *Aspergillus*, espécie teleomorfa *Eurotium chevalieri* (Fig.2).

Diversos estudos da qualidade do ar de ambientes internos têm sido realizados, porém muitos enfocam a classificação taxonômica dos microrganismos somente até gênero fúngico, sem identificação de espécie. Nestes trabalhos o gênero *Aspergillus* se destaca como um dos principais fungos anemófilos presentes em ambientes internos, o qual foi encontrado em 33,3% das amostras do presente estudo (REN et al., 2001, GIGLI et al., 2005; WU et al., 2005; LEE et al., 2006).

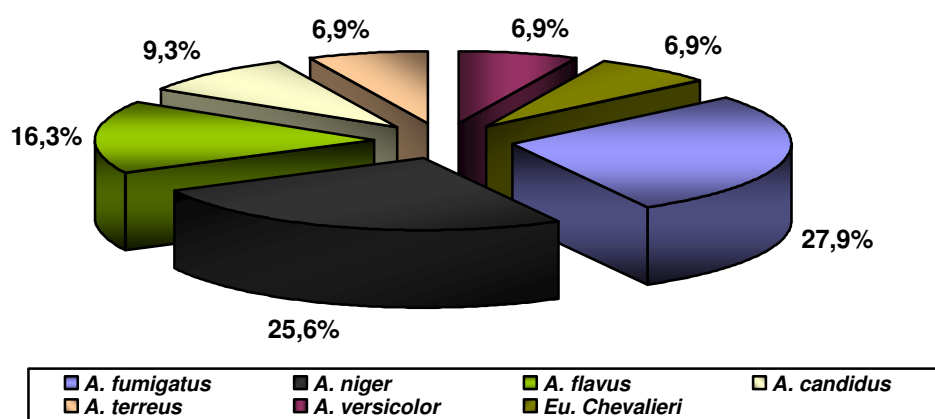


Figura 2 – Espécies de *Aspergillus* isoladas do ar das instalações de um Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM, RS, Brasil).

Quanto às espécies de *Aspergillus*, as três principais isoladas foram previamente documentadas como as mais freqüentes em ambientes hospitalares por Leenders et al. (1999) na Holanda, e Panagopoulou et al. (2002) na Grécia. Neste último trabalho, a espécie mais prevalente foi o *A. niger* (39,2%) seguido do *A. flavus* (17,5%) e *A. fumigatus* (7,7%), sendo que os autores isolaram também em menor quantidade (6,6%) *A. nidulans* e *A. terreus* (PANAGOPOULOU et al., 2002).

Já nos EUA, Cooley et al. (1998) em estudo da qualidade do ar de escolas encontraram somente três espécies de *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. glaucus* e *A. versicolor*, diferindo consideravelmente do ambiente avaliado no CRAM, onde foram isoladas sete diferentes espécies com predominância de *A. fumigatus* que não foi isolada em nenhuma colheita realizada nas escolas pelos referidos autores. E em um amplo trabalho de Shelton et al. (2002) quanto à presença de fungos anemófilos em 1.717 prédios, incluindo escolas, hospitais, residências e indústrias, resultados similares foram encontrados em relação a algumas espécies como *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*, porém os autores encontraram *A. versicolor* como espécie predominante, isolada em alta freqüência, distinguindo das colheitas realizadas no CRAM.

Estas diferenças podem ser explicadas pelo tipo de ambiente estudado, bem como pelas variações geográficas e regionais que estão diretamente relacionadas à concentração fúngica nos ambientes internos (SHELTON et al., 2002), a qual pode ainda ser influenciada por fatores climáticos e sazonais (REN et al., 2001; LEE et al., 2006).

Outros trabalhos semelhantes, de fungos anemófilos em centros de reabilitação, zoológicos ou aviários não foram encontrados, por isso os dados do presente estudo foram confrontadas com resultados descritos em distintos ambientes internos, apesar da grande diferença entre estes locais, principalmente no que se refere a presença de matéria orgânica.

A espécie com maior percentual de isolamento foi *A. fumigatus*, cuja importância está relacionada à sua alta patogenicidade. Esta espécie é considerada o principal agente etiológico da aspergilose, responsável por 90 a 95% dos casos clínicos, e frequentemente relacionada à alta mortalidade de pingüins e outras aves marinhas em cativeiro (AINSWORTH & REWELL, 1949; KHAN et al., 1977; LATGÉ, 1999; MARTINÉZ et al., 2000; CARRASCO et al., 2001; XAVIER et al., 2006). Dentre os fatores de patogenicidade do *A. fumigatus* pode-se destacar a termotolerância, a velocidade de crescimento, o pequeno diâmetro de seus conídios, e a produção de enzimas e toxinas. Todas estas características facilitam a penetração e o desenvolvimento fúngico no organismo do hospedeiro, que desencadeiam a aspergilose (LATGÉ, 1999).

Os estudos da qualidade do ar vêm sendo realizados com o intuito de contribuir com a saúde dos indivíduos à medida que fornecem dados sobre comportamento, sobrevivência e distribuição dos microrganismos fúngicos no ambiente. Tendo em vista que estes microrganismos anemófilos são constantemente inalados e podem causar danos à saúde, desde uma leve alergia respiratória a uma doença grave e invasiva, os resultados colaboram para elaboração de medidas de prevenção por fornecer dados sobre as possíveis fontes de contaminação e a presença de determinados fungos nas instalações.

Conclusões

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* no local de reabilitação de animais marinhos, com predominância de *A. fumigatus*, a qual é a principal espécie relacionada com quadros clínicos geralmente fatais, em aves marinhas em cativeiro, fundamenta a necessidade de um controle microbiológico no ambiente à medida que grande parte dos animais em reabilitação encontra-se imunossuprimida, podendo desenvolver a aspergilose pela inalação dos conídios anemófilos.

Referências Bibliográficas

- ABARCA, M.L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.17, p.79-84, 2000.
- AINSWORTH, G.C.; REWELL, R.E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 59:213-224, 1949.
- BRETAGNE, S.; BART-DELABESSE, E.; WECHSLER, J.; KUENTZ, M.; DHÉDIN N.; CORDONNIER, C. Fatal primary coetaneous aspergillus's in a boné marrow transplant recipient: nosocomial acquisition in a laminar-air flow room. *Journal of Hospital Infection*, v.36, n.3, p.235-239, 1997.
- CARRASCO, L.; LIMA Jr., J.S.; HALFEN, D.C.; SALGUERO, F.J.; SANCHEZ-CORDÓN, P.; BECKER, G. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Veterinary Medicine*, v.48, p.551-554, 2001.
- COOLEY, J.D.; WONG, W.C.; JUMPER, C.A.; STRAUS, D.C. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, v.55, p.579-584, 1998.
- CORK, S.C.; ALLEY, M.R.; JOHNSTONE, A.C.; STOCKDALE, P.H.G. Aspergillosis and other causes of mortality in the Stitchbird in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases*, v.35, n.3, p.481-486, 1999.
- FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. *Veterinary Record*, v.126, n.4, p.81-85, 1990.
- GIGLI, A.C.S; BARACHO, M.S.; NÄÄS, I.A.; SILVA, R.A.; ZAGO, R.; DALL'ANESE, F.P. Diagnosis and Evaluation of Fungi Presence in the Air of Two Different Ventilation Systems for Broiler Houses. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.7, n.4, p.205-208, 2005.
- KHAN, Z.U.; PAL, M.; PALIWAL, D.K.; DAMODARAM, V.N. Aspergillosis in imported penguins. *Sabouraudia*, v.15, p.43-45, 1977.
- KLICH, M.A. *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2002, 116p.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9^o ed. Sarvier, São Paulo – SP, 2002, 1104p.
- LAIR-FULLERINGER, S.; GUILLOT, J.; DESTERKE, C.; SEGUIN, D.; WARIN, S.; BEZILLE, A.; CHERMETTE, R.; BRETAGNE, S. Differentiation between Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Breeding Turkeys and Their Environment by Genotyping with Microsatellite Markers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.4, p.1798-1800, 2003.
- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- LEE, T.; GRINSHUPUN, S.A.; MARTUZEVICIUS, D.; ADHIKARI, A.; CRAWFORD, A.M.; LUO, J.; REPONEN, T.. Relationship between indoor and outdoor bioaerosols collected with a button inhalable aerosol sampler in urban homes. *Indoor air*, v.16, p.37-47, 2006.
- LEENDERS, A.C.A.P.; BELKUM, A.V.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A.; VERBRUGH, H.A.. Density and Molecular Epidemiology of *Aspergillus* in Air and Relationship to Outbreaks of *Aspergillus* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.6, p.1752-1757, 1999.
- MARTÍNEZ, R.R.; CERECERO, J.; CERVANTES, J. Brote de aspergilosis em gaviotas. *Veterinaria Mexico*, v.31, n.3, p.259-260, 2000.
- PANAGOPOULOU, P.; FILIOTI, J.; PETRIKKOS, G.; GIAKOUPI, P.; ANATOLIOTAKI, M.; FARMAKI, E.; KANTA, A.; APOSTOLAKOU, H.; AVLAMI, A.;

- SAMONIS, G.; ROILIDES, E.. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *Journal of Hospital Infection*, v.52, p.185-191, 2002.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. *The genus Aspergillus*. Baltimore. Williams and Wilkins. p. 686, 1965
- REDIG. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. In: Fowler, M.E.: *Zoo & Wild Animal Medicine: current therapy 3*. W B Saunders Inc., Denver, Colorado, 1993, cap.23, p.178-181.
- REN, P.; JANKUN, T.M.; BELANGER, K.; BRACKEN, M.B.; LEADERER, B.P. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy*, v.56, p.419-424, 2001.
- RUSSEL, M.; HOLCOMB, J.; BERKNER, A. *30-Years of Oiled Wildlife Responses Statistics*. Proceedings of the 7th International Effects of Oil and Wildlife Conference Hamburg, Germany, 2003, p.1-18.
- SHELTON, B.G.; KIRKLAND, K.H.; FLANDERS, W.D.; MORRIS, G.K. Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.4, p.1743-1753, 2002.
- TELL, L.A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*, Supplement 1, v.43, p.71-73, 2005.
- XAVIER, M.O.; LEITE, A.T.M.; SOARES, M.P. et al. Aspergilose em Pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) – Relato de Caso. *Veterinária e Zootecnia*, v.13, n.1, p.28-32, 2006.
- WU, P.C.; LI, Y.Y.; CHIANG, C.M. et al. Changing microbial concentrations are associated with ventilation performance in Taiwan's air-conditioned office buildings. *Indoor air*, v.15, p.19-26, 2005.

Agradecimentos:

À Dra. Aurea Maria Lage de Moraes, Pesquisadora do Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz (Instituto Oswaldo Cruz), pelo auxílio na identificação das espécies de *Aspergillus*.

3.2 ARTIGO

“Aspergilose em Pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) Relato de Caso”

Artigo publicado na revista “Veterinária e Zootecnia”, v.13, n.1, p.28-32, 2006.

Aspergilose em Pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*)

Relato de Caso*

Melissa Orzechowski Xavier^{1}, Alice Teixeira Meirelles Leite², Mauro Pereira Soares³, Luiza da Gama Osório⁴, Anelise Martins⁴, Ana Paula Albano⁴, Luiz Paiva Carapeto⁵, Márcia de Oliveira Nobre³, Rodolfo Pinho da Silva Filho², Mário Carlos Araújo Meireles³.**

Resumo

A aspergilose é causada por fungos do gênero *Aspergillus*, acometendo principalmente o trato respiratório. O trabalho relata um caso de aspergilose em um pingüim-de-magalhães em reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) de Rio Grande (RS, Brasil). A ave foi encaminhada ao CRAM debilitada, permanecendo em cativeiro durante 28 dias. Devido à gravidade do quadro clínico, o animal foi submetido à eutanásia e necropsia, onde foram observados nódulos branco-amarelados nos pulmões e siringe, e colônias fúngicas nos sacos aéreos, fígado e rins. O diagnóstico de aspergilose por *Aspergillus fumigatus* foi confirmado por exame micológico e histopatológico. Este relato alerta para a importância da aspergilose como fator limitante na reabilitação de pingüins.

Palavras-chave: Aspergilose; *Aspergillus fumigatus*; reabilitação; pingüins; cativeiro;

Aspergillosis in a Magellan's Penguin (*Spheniscus magellanicus*) Case Report

Abstract

Aspergillosis is caused by *Aspergillus* spp., attacking mainly the respiratory system. This paper reports a case of aspergillosis in a Magellan's penguin in the Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) of Rio Grande (RS, Brazil). The seabird was directed to CRAM weakened, staying in captivity for 28 days. Due to gravity of the clinical signs, the animal was submitted to euthanasia and necropsy, where white-yellowish nodules were observed in the lungs and in the windpipe, and fungal colonies in the air sacs, liver and kidneys. The diagnosis of aspergillosis for *Aspergillus fumigatus* were confirmed for mycology and histopathology. This case alert to the importance of the aspergillosis in the penguins rehabilitation.

Key words: Aspergillosis; *Aspergillus fumigatus*; rehabilitation; penguins; captivity;

* Parte integrante da dissertação de mestrado do primeiro autor.

^{1**} Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Setor de Micologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas, RS, Brasil, Campus Universitário s/nº, Cep 96.010.900. Telefone: (53) 32757496 / (53) 32230993 / (53) 91229266. E-mail: melissa@ufpel.edu.br.

² Centro de Recuperação de Animais Marinhos, Museu Oceanográfico “Prof. Eliézer de C. Rios”, Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio grande, RS, Brasil.

³ Laboratório Regional de Diagnósticos, Faculdade de Veterinária, UFPel.

⁴ Graduação em Medicina Veterinária, UFPel.

⁵ Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel.

Aspergilosis en Pingüino Patagónico (*Spheniscus magellanicus*) Relato de un Caso

Resumen

La aspergilosis es causada por hongos del género *Aspergillus*, atacando principalmente el tracto respiratorio. El trabajo relata un caso de aspergilosis en un pingüino patagónico en rehabilitación en el Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) de Rio Grande (RS, Brasil). El ave fue conducida al CRAM debilitada, permaneciendo en cautiverio durante 28 días. Debido a la gravedad del cuadro clínico, el animal fue sometido a eutanasia y necropsia, donde fueron observados nódulos blanco-amarillentos en los pulmones y siringe, y colonias fúngicas en los sacos aéreos, hígado y riñones. El diagnóstico de aspergilosis por *Aspergillus fumigatus* fue confirmado por examen micológico e histopatológico. Este relato alerta para la importancia de la aspergilosis como factor limitante en la rehabilitación de los pingüinos.

Palabras-clave: Aspergilosis; *Aspergillus fumigatus*; rehabilitación; pingüinos; cautiverio;

A aspergilose, micose oportunista causada principalmente pelo *Aspergillus fumigatus*, se destaca por ser a principal causa de mortalidade de pingüins mantidos em cativeiro, tanto em zoológicos quanto em centros de recuperação. A doença geralmente é secundária a condições de estresse, traumatismos, ingestão de óleo proveniente da poluição dos mares, má nutrição, deficiência de vitamina A e/ou outras enfermidades (KHAN et al., 1977; FLACH et al., 1990; REDIG, 1993; GRACZYK e CRANFIELD, 1995; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Os pingüins pertencem à ordem *Sphenisciformes*, família *Spheniscidae*, a qual contém 17 espécies divididas em seis gêneros, destacando-se, no Brasil, o pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) cujos exemplares são freqüentemente encontrados nas praias apresentando sintomas de intoxicação por petróleo, desnutrição, alterações músculo-esqueléticas, desidratação e imunossupressão (WILLIAMS, 1995; RUOPPOLO et al., 2004).

No inverno do ano de 2004 foi encaminhado ao CRAM um pingüim-de-magalhães macho, juvenil, apresentando alteração no membro pélvico direito, manifestada por posicionamento incorreto, claudicação e aumento de volume na região lombo-sacra. A ave foi identificada com anilha provisória nº.1081, e no 28º dia de cativeiro foi encaminhada para exame radiográfico da lesão músculo-esquelética. O exame demonstrou luxação na articulação coxofemoral direita. Durante o procedimento, o animal apresentou dispnéia evidenciada por respiração com o bico aberto, pescoço esticado e ruídos inspiratórios, sendo submetido de imediato, à

avaliação radiográfica do trato respiratório, que revelou aumento da radiopacidade na região da siringe e lesão multifocal nos sacos aéreos torácicos (Figura 1).

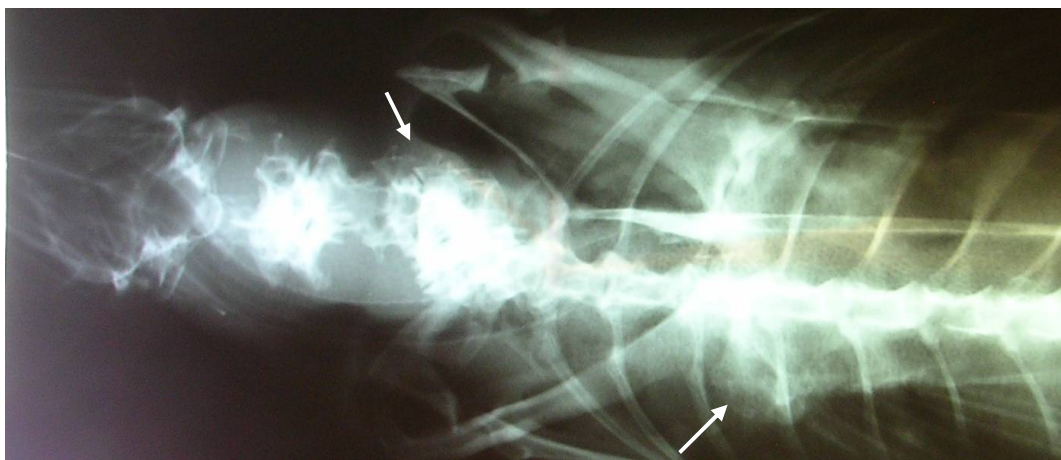


Figura 1. Radiografia do trato respiratório do pingüim-de-magalhães, demonstrando aumento da radiopacidade na região da siringe e lesão multifocal nos sacos aéreos torácicos.

Devido à gravidade do quadro clínico, o pingüim foi encaminhado ao Laboratório Regional de Diagnósticos (FV-UFPel) para eutanásia, realizada através da administração de lidocaína 1% por via intracelomática, e posterior necropsia onde foi observada a presença de um nódulo de dois centímetros de diâmetro com consistência firme na região da siringe (Figura 2A) e nódulos de aproximadamente 0,5cm de diâmetro, com coloração branco-amarelada sobre a superfície pulmonar. Colônias fúngicas filamentosas, de coloração branca com centro esverdeado, foram observadas nos sacos aéreos torácicos (Figura 2B) e abdominais, no fígado (Figura 2C) e rins. Para confirmação do diagnóstico, foram colhidos fragmentos dos órgãos alterados, encaminhados para exame micológico e histopatológico.

No Setor de Micologia do Laboratório de Doenças Infecciosas (FV-UFPel) foi realizado exame direto de pequenos fragmentos das amostras, utilizando hidróxido de potássio a 20%, e, posteriormente, o material foi cultivado em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e Ágar Czapek. A incubação foi realizada a 30°C com observação diária durante sete dias.

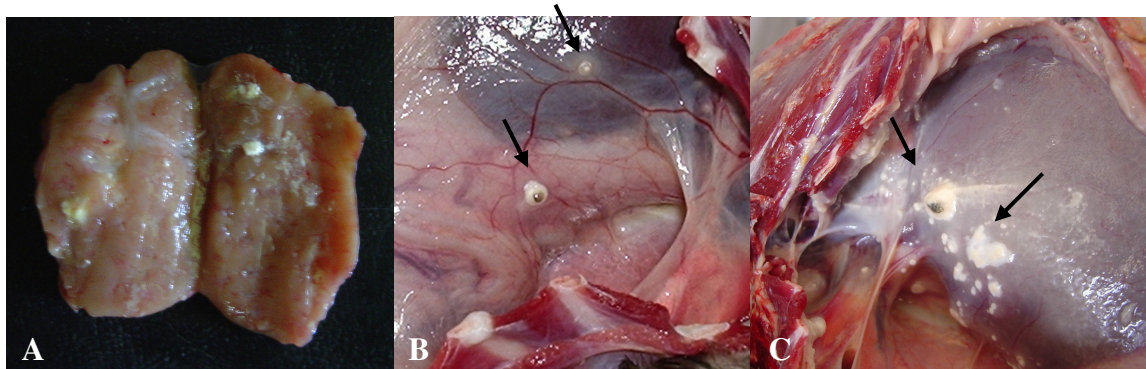


Figura 2. Lesões macroscópicas em pingüim-de-magalhães. (A) Nódulo de aproximadamente dois centímetros na região da siringe. (B) Colônias fúngicas de coloração branca com centro esverdeado no saco aéreo torácico esquerdo. (C) Colônias fúngicas de coloração branca com centro esverdeado no lobo direito do fígado.

No exame direto foram encontradas hifas septadas e bifurcadas no fígado, pulmão e siringe. Os cultivos apresentaram colônias fúngicas filamentosas com crescimento rápido (48 horas), superfície de cor azul-esverdeada a cinzenta, reverso não-pigmentado e textura pulverulenta. Microscopicamente as colônias caracterizavam-se por hifas septadas, conidióforos curtos com vesículas de extremidade piriforme, fiálides unisseriadas dispostas de forma colunar cobrindo dois terços da superfície da cabeça aspergilar e conídios equinulados. O exame direto, a macroscopia e microscopia dos cultivos permitiram o diagnóstico de aspergilose, com a classificação do agente como sendo *A. fumigatus*.

No Setor de Patologia (FV-UFPel) foi realizado o exame histopatológico dos tecidos pela fixação em formol a 10%, inclusão em parafina, e coloração de Hematoxilina-eosina, Periodic Acid-Schiff e Grocott. Foram encontradas hifas septadas e ramificadas com bifurcação em ângulo agudo (Figura 3A) nos pulmões e fígado, áreas de necrose caseosa delimitadas por infiltrado granulomatoso nos pulmões e sacos aéreos, e estruturas completas de esporulação do *Aspergillus* (Figura 3B) na siringe, caracterizadas por conidióforos, vesículas, fiálides e conídios, confirmando o diagnóstico de aspergilose disseminada invasiva.

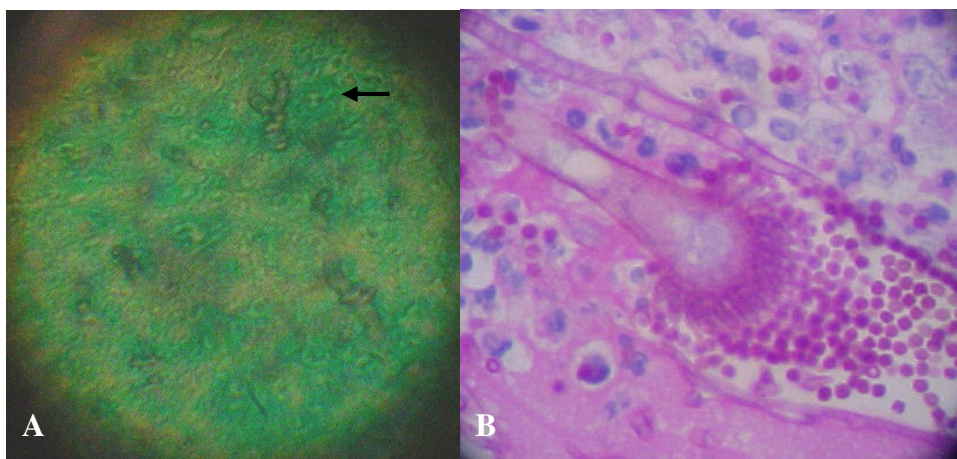


Figura 3. (A) Hifas septadas, ramificadas e bifurcadas em ângulo agudo, visualizadas no exame histopatológico (Grocott, 400X) do pulmão do pingüim-de-magalhães. (B) Estrutura de frutificação completa do *Aspergillus fumigatus* visualizada no exame histopatológico (PAS, 400X) da siringe do pingüim-de-magalhães.

O sexo e a idade do pingüim acometido neste caso estão de acordo com Flach et al. (1990) ao relatarem que os pingüins machos e juvenis foram significativamente mais acometidos por aspergilose que as fêmeas e os adultos. As alterações clínicas e patológicas, além da identificação do agente etiológico estão de acordo com aquelas descritas por Khan et al. (1977), Martínez et al. (2000) e Carrasco et al. (2001), que relataram casos de aspergilose com lesões difusas, causadas por *A. fumigatus*, em pingüins e gaivotas, embora não tenha sido observado espessamento dos sacos aéreos, provavelmente pela característica aguda da infecção deste caso.

As alterações radiológicas sugestivas de aspergilose, descritas por Redig (1993) e Kearns e Loudis (2003) são compatíveis com as observadas no exame do trato respiratório do pingüim-de-magalhães. Entretanto, a radiologia não é um método auxiliar de diagnóstico comumente utilizado para aspergilose em aves, não havendo outros relatos, na literatura consultada, de exames radiológicos em pingüins acometidos por aspergilose.

A aspergilose no pingüim-de-magalhães em reabilitação confirma a predisposição destas aves, principalmente quando se encontram debilitadas e/ou quando é necessário um período prolongado de permanência do animal em cativeiro.

Referências Bibliográficas

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*, 2003. Disponível em <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>>. Acesso em: 23 março 2005.
- CARRASCO, L.; LIMA Jr., J.S.; HALFEN, D.C.; SALGUERO, F.J.; SANCHEZ-CORDÓN, P.; BECKER, G. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.551-554, 2001.
- FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. **Veterinary Record**, v.126, n.4, p.81-85, 1990.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R. Maternal transfer of anti-*Aspergillus* spp. Immunoglobulins in African Black-footed Penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, n.4, p.545-549, 1995.
- KHAN, Z.U.; PAL, M.; PALIWAL, D.K.; DAMODARAM, V.N. Aspergillosis in imported penguins. **Sabouraudia**, v.15, p.43-45, 1977.
- KEARNS, K. S.; LOUDIS B. Aspergillosis aviar, in Recent Advances in Avian Infectious Diseases, **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, 2003;
- MARTÍNEZ, R.R.; CERECERO, J.; CERVANTES, J. Brote de aspergilosis em gaviotas. **Vet. Méx.**, v.31, n.3, p.259-260, 2000.
- REDIG, P.T. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. In: **Zoo & Wild Animal Medicine - current therapy 3**. Denver, Colorado, 1993, cap.23, p.178-181.
- RUOPPOLO V.; ADORNES, A.C.; NASCIMENTO, A.C.; SILVA-FILHO, R.P. Reabilitação de pingüins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, n.51, p.78-83, jul/ago, 2004.
- WILLIAMS, T. D. **The Penguins, Spheniscidae**, Oxford University Press, 1995.

3.3 ARTIGO

“Atividade “in vitro” de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*”

Artigo submetido para publicação na revista “Arquivos do Instituto Biológico”,
registrado como Arq.063/06

**Atividade “in vitro” de três agentes químicos frente a diferentes espécies de
Aspergillus^{*}**

**Melissa Orzechowski Xavier¹, Isabel Martins Madrid², Ana Raquel Mano
Meinerz³, Marlete Brum Cleff³, Luiz Filipe Damé Schuch², Márcia de Oliveira
Nobre², Mário Carlos Araújo Meireles².**

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Infecciosas, Setor de Micologia. Campus Universitário s/nº, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: melissaxavier@bol.com.br

RESUMO

A aspergilose é causada por fungos ubíquos e oportunistas do gênero *Aspergillus*, que liberam milhares de conídios no ar, contaminando o ambiente, sendo de extrema importância a utilização de filtros de ar e programas corretos de anti-sepsia e desinfecção para prevenção da enfermidade. Este estudo avaliou a eficácia “in vitro” dos agentes químicos, iodóforo, amônia quaternária e clorexidina, frente a isolados de *A. fumigatus* (8), *A. niger* (8), *A. flavus* (6) e *A. terreus* (1). Para o teste foram preparadas diluições sucessivas dos desinfetantes/anti-sépticos (log₂) em caldo RPMI, e os inóculos foram ajustados até uma concentração final de 5x10⁴UFC/ml. Foi realizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com NCCLS M-38, adaptada para agentes químicos, com incubação das microplacas a 35°C em agitação constante. A leitura visual dos resultados foi realizada após 96 horas, e os isolados de *Aspergillus* spp. utilizados foram resistentes ao iodóforo nas concentrações testadas. A amônia quaternária e a clorexidina mostraram-se eficazes contra os isolados de *Aspergillus* spp., com exceção de um *A. fumigatus* e um *A. terreus*. Com estes resultados indica-se a utilização da amônia quaternária e da clorexidina na prevenção da aspergilose, questionando-se o uso de iodóforos para este fim.

PALAVRAS-CHAVE: Aspergilose; *Aspergillus* spp.; Desinfetantes e Anti-sépticos;

ABSTRACT

“IN VITRO” ACTIVITY OF THREE CHEMICAL AGENTS AGAINST DIFFERENT SPECIES OF *ASPERGILLUS*. The aspergillosis caused by ubiquitous and opportunists moulds of genus *Aspergillus*, that liberate thousands of conidia's in the air contaminating the atmosphere, being of extreme importance use of air filters

^{*} Parte integrante da dissertação de mestrado do primeiro autor

² Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

³ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

and correct programs of antisepsis and disinfection for the disease prevention. This study evaluated “in vitro” effectiveness of the chemical agents, iodophor, quaternary ammonia and chlorhexidine, against *A. fumigatus* (8), *A. niger* (8), *A. flavus* (6) and *A. terreus* (1). Successive dilutions of disinfectants/antiseptics (log2) were prepared in RPMI for the test and the suspension was adjusted until a final concentration of 5×10^4 UFC /ml. The microdilution test was done in agreement with NCCLS M-38 adapted for chemical agents, with microplates incubation at 35°C in constant agitation. The visual results were evaluated after 96 hours, and all *Aspergillus* spp isolated used were resistant to iodophor in all concentrations tested. The quaternary ammonia and chlorhexidine showed effectiveness against *Aspergillus* spp. isolated, except for one *A. fumigatus* and one *A. terreus*. With these results the use of the quaternary ammonia and chlorhexidine is indicated to aspergillosis prevention and iodophor use is questionable.

KEYWORDS: Aspergillosis; *Aspergillus* spp.; Disinfectants and Antiseptics;

As micoses oportunistas, como a aspergilose, adquiriram uma grande importância em saúde pública nas últimas décadas, devido à incidência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o desenvolvimento de novas terapias para pacientes oncológicos, e os avanços nas técnicas cirúrgicas de transplantes de órgãos, que culminaram com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos (BRETAGNE *et al.*, 1997; LATGÉ, 1999; STEVENS *et al.*, 1999; MARTINS-DINIZ *et al.*, 2005). Em medicina veterinária, esta micose se destaca por causar sérios prejuízos à produção avícola, acometendo principalmente aves jovens e ovos embrionados, e por determinar altas taxas de mortalidade em pingüins e outras aves silvestres mantidas em cativeiro, em zoológicos e/ou centros de reabilitação (FLACH *et al.*, 1990; ANDREATTI, 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; LAIR-FULLERINGER, 2003).

As espécies comumente envolvidas com quadros clínicos tanto em humanos quanto em animais são principalmente o *A. fumigatus*, seguido do *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (LATGÉ, 1999; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Como o *Aspergillus* spp. é um fungo ubíquo, milhares de conídios são desprendidos das fiálides diariamente e dispersos no ar, contaminando o ambiente (LATGÉ, 1999). Neste contexto, é de extrema importância, além da utilização de filtros de ar, o emprego correto de programas de anti-sepsia e desinfecção, à medida que auxilia na prevenção da enfermidade através da redução do nível de contaminação por microrganismos fúngicos em tecidos vivos, superfícies e objetos inanimados (LATGÉ, 1999; McDONNEL; RUSSEL, 1999; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; TESSARI *et al.*, 2004).

A escolha de um agente químico desinfetante não é uma tarefa fácil frente a grande variedade de produtos existentes no mercado, devendo ser levado em consideração fatores como espectro de atividade desejada, toxicidade, poder residual, custo, estabilidade, e natureza do material a ser tratado. Os principais desinfetantes utilizados são álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro ativo (como hipoclorito de sódio), compostos quaternários de amônia (como cloreto de benzalcônio), iodóforos e biguaninas (como clorexidina). Dentre esta gama de opções, não existe um produto que apresente todas as características desejadas, cada um possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (BRASIL, 1994; McDONNEL; RUSSEL, 1999).

A ação de desinfetantes e anti-sépticos tem sido testada contra bactérias e leveduras, no entanto poucos estudos foram encontrados na literatura consultada confrontando estes agentes com fungos filamentosos. Visto que os fungos filamentosos em geral são mais resistentes que leveduras e bactérias não esporuladas, testes realizados com microrganismos unicelulares não servem de parâmetro ou indício para sua utilização contra fungos chamados “bolores” de importância médica e veterinária, como *Aspergillus* spp (TERLECKYJ; AXLER, 1987; BRASIL, 1994; McDONNEL; RUSSEL, 1999). Assim, este estudo objetivou testar a eficácia “in vitro” de três agentes químicos de baixa toxicidade contra diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus*.

A atividade dos desinfetantes e anti-sépticos, iodóforo, cloreto de benzalcônio (amônia quaternária) e digluconato de clorexidina, foi testada frente a 23 amostras de *Aspergillus* spp. isoladas do ambiente e de casos clínicos, sendo oito *A. fumigatus*, oito *A. niger*, seis *A. flavus*, e um *A. terreus*.

A técnica de microdiluição em caldo utilizada para testes “in vitro” de antifúngicos foi realizada de acordo com NCCLS M-38, porém com adaptação para agentes químicos. Foram utilizadas 12 placas de microdiluição (96 orifícios) estéreis, as quais foram preenchidas com o inóculo fúngico e com os desinfetantes/anti-sépticos previamente diluídos e ajustados em meio RPMI líquido. Todas as amostras de *Aspergillus* spp. foram testadas em duplicata frente aos três desinfetantes/anti-sépticos.

Para preparação dos inóculos fúngicos as amostras foram previamente semeadas em placa de Petri contendo Agar Batata (Potato Dextrose Agar – PDA) e

incubadas à 35°C por sete dias, obtendo-se culturas jovens e puras. Após o crescimento fúngico foi adicionado às culturas, 1ml de salina estéril com 1% de Tween 20, e em seguida os conídios e hifas foram coletados da superfície da colônia com auxílio de pipeta estéril e transferidos para um tubo de ensaio estéril. Decorrido o tempo de sedimentação de cinco minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio estéril, e então homogeneizado em agitador de tubos vortex por 15 segundos, e sua concentração final foi ajustada a 5×10^4 UFC/ml. Esta suspensão foi diluída a 1:50 em caldo RPMI, alcançando duas vezes a concentração necessária, para ser adicionada a cada orifício da microplaca em volume igual ao do agente químico, conforme o protocolo padrão. Para confirmação da concentração do inóculo foi realizada a técnica de Pour-plate em Agar Sabouraud Dextrose, e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Foram preparadas seis diluições sucessivas dos três agentes químicos em $\log_2$, utilizando-se caldo RPMI como diluente, os quais foram identificados como: IF (iodóforo), CB (cloreto de benzalcônio) e DC (digluconato de clorexidina). As concentrações finais dos desinfetantes IF e CB referiram-se a 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 vezes a concentração de uso recomendada pelo fabricante do produto, e do desinfetante DC variaram de 2 a 0,05 vezes a concentração de uso indicada.

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

As microplacas foram incubadas em uma estufa “shaker” (Certomat® BS-1) regulada a uma temperatura de 35°C e constante agitação (40ciclos/min), e a leitura visual dos resultados foi realizada após 96 horas, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada pela maior diluição do agente químico capaz de inibir o crescimento fúngico.

Das 23 amostras de *Aspergillus* spp., os oito isolados de *A. niger* e os seis de *A. flavus* foram sensíveis ao DC e CB, e resistentes ao IF. O *A. terreus* foi sensível ao CB e resistente ao IF e DC, e os oito isolados de *A. fumigatus* foram sensíveis ao DC e resistentes ao IF, sendo que destes, sete foram sensíveis ao CB. Os resultados estão descritos na tabela 1.

Todos os isolados de *Aspergillus* spp. foram resistentes ao iodóforo nas diluições testadas (Fig.1). O cloreto de benzalcônio mostrou atividade “in vitro” no controle das quatro espécies de *Aspergillus*, com exceção de uma amostra de *A. fumigatus*, que apresentou resistência a este agente químico mesmo em uma concentração duas vezes a recomendada. O digluconato de clorexidina apresentou eficácia frente a todos os isolados de *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*, no entanto, a amostra de *A. terreus* foi considerada resistente a todas as diluições testadas.

Não foram detectadas diferenças na sensibilidade em relação à origem dos isolados, caso clínico ou ambiente, porém, o número de isolados de casos clínicos correspondeu a apenas 17% das amostras.

A toxicidade é um dos principais fatores a ser levado em consideração no momento da escolha de um agente químico para uso na presença de humanos e/ou animais. Isto se deve ao fato de que o processo de desinfecção pode acarretar desde irritação de mucosas e pele, até intoxicações, e com isso embora diminua a concentração de microrganismos, aumenta a predisposição do indivíduo à enfermidades (BRASIL, 1994; McDONNEL; RUSSEL, 1999). Tendo em vista isto, foram selecionados para o teste “in vitro” digluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e iodóforo, que apresentam baixa toxicidade.

NELLY; ORLOFF (2001) realizaram um estudo sobre a sobrevivência de microrganismos em materiais hospitalares e encontraram uma maior sobrevivência de cepas de *Aspergillus* spp. isoladas de casos clínicos que isoladas de ambientes, o que não foi observado neste trabalho em relação à resistência dos isolados aos diferentes agentes químicos.

A resistência de *A. fumigatus* e *A. niger* encontrada frente ao iodóforo já foi descrita previamente por TERLECKYJ; AXLER (1987), no experimento sobre a atividade de diferentes agentes químicos contra diversos gêneros e espécies fúngicas. Os autores obtiveram resultados diferentes dos descritos neste trabalho, em relação à ação da amônia quaternária que se apresentou ineficaz na inibição do crescimento de ambas as espécies.

A atividade da amônia quaternária e do digluconato de clorexidina “in vitro” em diluições quatro vezes e dezesseis vezes maiores que a recomendada, respectivamente, sugere a ação efetiva destes produtos no ambiente, os quais devem ser utilizados em concentrações maiores que a CIM “in vitro” por sofrerem

influência dos fatores externos, como temperatura, pH e presença de matéria orgânica (BRASIL, 1994; McDONNEL; RUSSEL, 1999).

Segundo McDONNELL; RUSSEL (1999), o *A. niger* é sensível à concentração de 200µg/ml de clorexidina e 100-200µg/ml de cloreto de benzalcônio. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os autores em relação à amônia quaternária, porém demonstram que 40µg/ml de digluconato de clorexidina podem inibir o crescimento deste microrganismo.

A resistência do *A. terreus* à clorexidina, deve ser considerada com cautela, visto que somente foi utilizado um isolado desta espécie, podendo a resistência ser um fator intrínseco e individual do isolado testado (McDONNEL; RUSSEL, 1999; NELLY; ORLOFF, 2001). No entanto, é sabido que a maioria dos isolados de *A. terreus* são resistentes à Anfotericina B (STEINBACH *et al.*, 2004), o que geralmente não ocorre com as outras espécies de *Aspergillus* associadas a quadros clínicos. Este dado é importante à medida que a sensibilidade fúngica à Anfotericina B está relacionada com as glucanas da parede celular, as quais também desempenham um papel importante na suscetibilidade do microrganismo à clorexidina (McDONNEL; RUSSEL, 1999).

Não foram encontrados na literatura consultada estudos “in vitro” de agentes químicos desinfetantes e anti-sépticos frente a isolados de *A. flavus*, no entanto esta espécie não apresentou característica peculiar em relação às outras três espécies testadas em nosso estudo.

Como a atividade antimicrobiana dos desinfetantes depende de vários fatores, como temperatura, pH, diluição, presença de matéria-orgânica, entre outros, os testes “in vitro” não determinam necessariamente a real capacidade de desinfecção de um ambiente, porém resultados favoráveis e desfavoráveis nestes testes devem ser levados em consideração, sendo um indício da atividade destes produtos contra microrganismos específicos (TIMENETSKY, 1990).

Os resultados obtidos após a condução deste experimento permitem concluir que a amônia quaternária e o digluconato de clorexidina foram eficazes contra as diferentes espécies de *Aspergillus*. Em contrapartida, a ineficácia “in vitro” do iodóforo neste estudo torna questionável seu uso em superfícies e tecidos vivos para controle de fungos do gênero *Aspergillus*.

Tabela 1: Resultados do teste de suscetibilidade “in vitro” de diferentes espécies de *Aspergillus* a três desinfetantes/anti-sépticos comerciais.

Espécie	Isolado	Origem	Produto IF (CI: 0,05µg/ml)	Ação do IF	Produto CB (CI: 0,6mg/ml)	Ação do CB	Produto DC (CI: 0,67mg/ml)	Ação do DC
<i>A. fumigatus</i>	1	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	2	CC	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: 1,2mg/ml	I	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	3	CC	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	4	CC	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	5	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	6	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	7	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. fumigatus</i>	8	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	9	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	10	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	11	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	12	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	13	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	14	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	15	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. niger</i>	16	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. flavus</i>	17	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. flavus</i>	18	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. flavus</i>	19	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. flavus</i>	20	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: <0,04mg/ml	E
<i>A. flavus</i>	21	CC	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: 0,16mg/ml	E
<i>A. flavus</i>	22	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: 0,08mg/ml	E
<i>A. terreus</i>	23	A	CIM: >0,4µg/ml	I	CIM: <0,15mg/ml	E	CIM: >1,33mg/ml	I
Eficácia (%)			0		96		96	

IF: iodóforo;

A: ambiente

CI: concentração de uso do produto indicada pelo fabricante;

E: eficaz;

CB: cloreto de benzalcônio;

CC: caso clínico

I: ineficaz;

DC: digluconato de clorexidina

Referências

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillois in birds of prey*, 2003. Disponível em <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>>. Acesso em: 23 março 2005.
- ANDREATTI FILHO, R.L. Enfermidades Micóticas, In: Berchieri Júnior, A., Macari, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.369-375.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. *Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde*. 2.ed, Brasília, 1994, 50p.
- BRETAGNE S.; BART-DELABESSE, E.; WECHSLER, J.; KUENTZ, M. DHÉDIN N.; CORDONNIER C. Fatal primary coetaneous aspergillus's in a boné marrow transplant recipient: nosocomial acquisition in a laminar-air flow room. *Journal of Hospital Infection*, v.36, n.3, p.235-239, 1997.
- FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. *Veterinary Record*, v.126, n.4, p.81-85, 1990.
- LAIR-FULLERINGER, S.; GUILLOT, J.; DETERKE, C.; SEGUIN, D.; WARIN, S.; BEZILLE, A.; CHERMETTE, R.; BRETAGNE, S. Differentiation between Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Breeding Turkeys and Their Environment by Genotyping with Microsatellite Markers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.4, p.1798-1800, 2003.
- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- MARTINS-DINIZ, J.N.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. *Revista de Saúde Pública*, v.39, n.3, p.398-405, 2005.
- MCDONNELL, G. & RUSSEL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Review*, v.12, n.1, p.147-179, 1999.
- NELLY, A.N. & ORLOFF, M.M. Survival of Some Medically Important Fungi on Hospital Fabrics and Plastics. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.9, p.3360-3361, 2001.
- NCCLS-M38A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard. NCCLS document M38-A. 2002. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- STEINBACH, W.J.; PERFECT, J.R.; SCHELL, W.A.; WALSH, T.J.; BENJAMIN JR., D.K. In Vitro Analyses, Animal Models, and 60 Clinical Cases of Invasive *Aspergillus terreus* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n.9, p.3217-3225, 2004.
- STEVENS, D.A.; KAN, V.L.; JUDSON, M.A.; MORRISON, V.A.; DUMMER, S.; DENNING, D.W.; BENNETT, J.E.; WALSH, T.J.; PATTERSON, T.F.; PANKEY, G.A. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases*, v.30, p.696-709, 2000.
- TERLECKYJ B.; AXLER, D.A. Quantitative Neutralization Assay of Fungicidal Activity of Disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.31, n.5, p.794-798, 1987.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; ZANATTA, G.F. Prevalência de Aspergilose Pulmonar em pintos de um dia de idade. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v.71, n.1, p.75-77, 2004.
- TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. *Revista de Saúde Pública*, v.24, n.1, p.47-50, 1990.

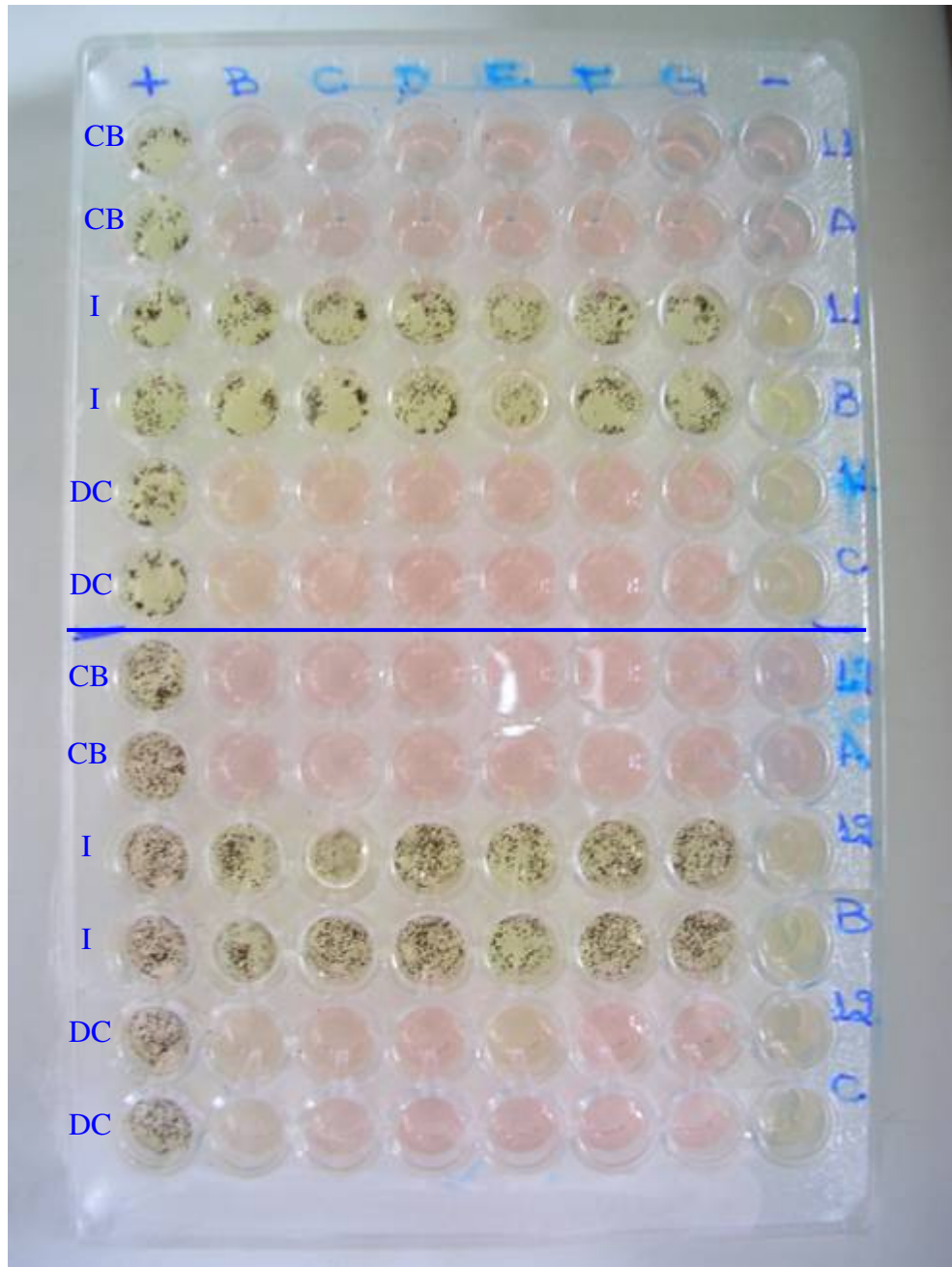


Figura 1 – Resultado do teste de microdiluição em caldo demonstrando isolados de *A. niger* resistentes a todas as concentrações do iodóforo (linhas 3, 4, 9 e 10), e sensíveis a todas as concentrações de amônia quaternária (linhas 1, 2, 7 e 8) e digluconato de clorexidina (linhas 5, 6, 11 e 12).

3.4 ARTIGO

“Eficácia da Clorexidina-Cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp.”

Artigo submetido para publicação na Revista “Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia” registrado como REG.: 2275/06.

Eficácia da Clorexidina-Cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp.

Clorexidina-Cetrimida efficacy in ambient disinfection against *Aspergillus* spp.

Melissa Orzechowski Xavier^{*1}, Ana Raquel Mano Meinerz², Marlete Brum Cleff²; Luiza da Gama Osório¹; Luiz Filipe Damé Schuch²; Márcia de Oliveira Nobre¹, Rodolfo Pinho da Silva Filho³, Mário Carlos Araújo Meireles¹.

¹ Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas (UFPeL);

² Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

³ Centro de Recuperação de Animais Marinhos – Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

* Endereço: R. Paul Harris, 537, Bairro: Areal, CEP.: 96077-200, Pelotas/RS, Brasil.

Tel.: (53) 91229266, (53)32289620. E-mail: melissaxavier@bol.com.br

RESUMO

A aspergilose é uma das maiores causas de morte de pingüins em cativeiro, e requer diversas medidas de prevenção. Dentre estas medidas, a desinfecção de instalações é essencial no controle de *Aspergillus* spp., reduzindo os conídios inalados pelas aves suscetíveis. A clorexidina como agente químico se destaca pela baixa toxicidade, o que permite sua utilização em presença de animais. Neste sentido, o trabalho testou a ação *in loco* da Clorexidina-Cetrimida® no controle de *Aspergillus* spp., avaliando a influência de fatores climáticos e populacionais, em um centro de recuperação de animais marinhos. Para isso foram realizadas por um período de dois anos, colheitas de amostras de ar através da técnica de sedimentação, sendo implantado no segundo ano um programa de desinfecção com Clorexidina-Cetrimida®. Os resultados foram comparados estatisticamente pelo programa Epinfo 8.0., demonstrando que o isolamento fúngico não apresentou relação significativa com fatores climáticos e populacionais, e que a diminuição da concentração de conídios de *Aspergillus* spp. do ambiente ocorreu devido ao programa eficaz de desinfecção com a Clorexidina-Cetrimida®, sendo este agente químico indicado para desinfecção de ambientes internos, auxiliando na prevenção da aspergilose em aves em cativeiro.

PALAVRAS-CHAVES

Clorexidina, desinfetante, prevenção, aspergilose.

ABSTRACT

Aspergillosis is one of the major causes of deaths in captivity penguins, and requires a diversity of precautions to prevent. The indoor disinfection is essential to *Aspergillus* air concentration control, reducing the number of inhalant conidia to susceptible penguins. The clorexidine is a extremely safety chemical agent to use in the indoor disinfection on the presence of animals because have low toxicity. In this context, this work tested *in loco* activity of Clorexidina-Cetrimida® in the *Aspergillus* spp. control considering the climatic influence and population variations, on the recuperation center of marine animals. Samples of the air were collected for two years, by the sediment method, and the disinfection program were established in the second year. The dates of the two years were statistically compared, and demonstrate that population and climate had no significance on the fungal isolation, and that the disinfection program with Clorexidina-Cetrimida® was considered effective in the reduction of conidia *Aspergillus* concentration indoor, and recommended to indoor disinfection contributing to the aspergillosis prevention in susceptible captivity animals.

KEYWORDS

Chlorexidine, disinfectant, prevention, aspergillosis.

INTRODUÇÃO

Os programas de higiene e desinfecção são essenciais no controle ambiental de microrganismos potencialmente patogênicos aos animais. Dentre estes patógenos, em relação à aves em cativeiro, destacam-se os fungos anemófilos e ubíquos do gênero *Aspergillus*, que causam uma micose respiratória geralmente fatal chamada de aspergilose (Redig et al., 1993; Bauck, 1994; Garcia e Blanco, 2000; Lagneau e Houtain, 2001; Tessari et al., 2004).

Os fungos do gênero *Aspergillus* se reproduzem através de fialoconídios pequenos e leves, facilmente veiculados pelo ar, que se depositam em qualquer objeto ou superfície contaminando todo o ambiente (Latgé, 1999; Lacaz et al., 2002; Warris e Verweij, 2005). Assim, para o controle da aspergilose, é preconizada a manutenção correta da ventilação, temperatura e umidade do local, assim como a higiene e a desinfecção ambiental rotineira (Bauck, 1994; Kearns e Loudis, 2003; Warris e Verweij, 2005).

A desinfecção ambiental deve ser realizada com rodízio periódico de agentes químicos capazes de inibir o crescimento fúngico ou eliminar estes microrganismos, visando à redução na concentração de conídios inalados pelas aves (Bauck, 1994; Kearns e Loudis, 2003). Dentro dos agentes desinfetantes as biguanidas, como a clorexidina, se destacam principalmente pela baixa toxicidade,

amplo espectro e suas propriedades inodoras, incolores e não corrosivas (McDonnell e Russell, 1999).

Tendo em vista que a aspergilose é uma das principais causas de mortalidade de pingüins em cativeiro (Ainsworth e Rewell, 1949; Khan et al., 1977; Flach et al., 1990; Redig et al., 1993; Kittle, 2003; Xavier et al., 2006) e considerando a presença destas aves marinhas no local da desinfecção, assim como a importância na prevenção da micose em centros de reabilitação, o trabalho teve por objetivo testar a ação da Clorexidina-Cetrimida®¹, no controle de fungos do gênero *Aspergillus* das instalações de um Centro de Recuperação de Animais Marinhos, avaliando a influência dos fatores climáticos e populacionais no isolamento fúngico.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante um período de dois anos foi avaliada a qualidade do ar, quanto à presença de *Aspergillus* spp., das instalações internas utilizadas para reabilitação de pingüins no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM) localizado no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul. Estas instalações eram caracterizadas por dois ambientes de 12m de comprimento, 4m de largura e 4m de altura, com paredes azulejadas, e portões grandes (2x2m) nas duas extremidades que permaneciam abertos durante os turnos de trabalho permitindo o fluxo de ar, para manutenção da ventilação do local.

As amostras do ar foram colhidas pela técnica de sedimentação, realizada a partir da exposição por 15 minutos de placas de Petri contendo agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. A colheita foi realizada em intervalos de 10 dias no primeiro ano e semanalmente no segundo ano do experimento, coletando-se uma amostra referente ao horário de abertura do CRAM (08h00min) e uma segunda amostra no final do expediente matinal (11h30min) após higienização e ventilação natural do local, totalizando 160 amostras.

As placas foram imediatamente incubadas em estufa à 25°C durante um período de sete dias com observação diária. As colônias fúngicas filamentosas foram avaliadas macro e micromorfologicamente para identificação taxonômica, sendo realizada sub-cultura em agar Czapek para obtenção da cultura pura dos isolados de *Aspergillus* spp.

¹ Clorexidina – Cetrimida Chemitec ®. Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo, SP.

Durante o segundo ano do experimento foi realizado um programa de desinfecção das instalações a partir do emprego da Clorexidina-Cetrimida® diariamente nos locais de contaminação por matéria orgânica, e semanalmente em todos os objetos e superfícies, incluindo paredes e teto. A desinfecção era realizada ao encerramento das atividades diárias, após limpeza prévia e retirada da matéria orgânica, através da utilização por fricção mecânica do produto comercial, em diluição indicada pelo fabricante (100mL/L de água), e posterior enxágüe com água corrente. Logo em seguida o ambiente era mantido fechado por um período de aproximadamente 14 horas, até a manhã do dia seguinte.

A densidade populacional do local no momento das colheitas das amostras foi obtida junto ao CRAM, e os dados meteorológicos da cidade de Rio Grande, RS, como temperatura média mensal, umidade relativa do ar média mensal e precipitação total mensal, foram gentilmente cedidos pelo 8º Distrito de Meteorologia (DISME).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de qui-quadrado através do programa Epinfo 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do experimento o número total de amostras colhidas foi 160, sendo 64 provenientes do primeiro ano e 96 relativas ao segundo ano do estudo, com resultado positivo para *Aspergillus* spp. em 22,5% (36) das amostras, sendo 17 amostras positivas no ano inicial e 19 no ano final do estudo (Tab. 1).

Tabela 1 – Resultados das amostras de ar colhidas durante dois anos, quanto ao isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* de instalações utilizadas para reabilitação de pingüins.

Amostras	Positivas 08h00min	Positivas 11h30min	Negativas	Total de amostras
1º Ano	14 (21,9%)	3 (4,7%)	47 (73,4%)	64
2º Ano	10 (10,4%)	9 (9,4%)	77 (80,2%)	96
Total	24 (15,0%)	12 (7,5%)	124 (77,5%)	160

O pequeno número de isolados de *Aspergillus* spp. observado no experimento é devido ao método utilizado para colheita das amostras, cujo princípio se baseia na ação da gravidade do ar, sofrendo influência da velocidade e

turbulência do vento que podem carrear os propágulos fúngicos dificultando que se depositem na placa (Morris et al., 2000).

Durante os dois anos do estudo, a temperatura média mensal variou entre 13°C e 24,2°C, a umidade relativa do ar média entre 68 e 91% e a precipitação média mensal entre 17,2 e 355,1mm (Fig. 1, 2). Apesar da grande variação dos dados, os três fatores climáticos não apresentaram relação significativa com o isolamento de *Aspergillus* spp. das instalações, obtendo-se valores estatísticos de $p=0,996$ para temperatura, $p=0,794$ para umidade e $p=0,224$ para precipitação.

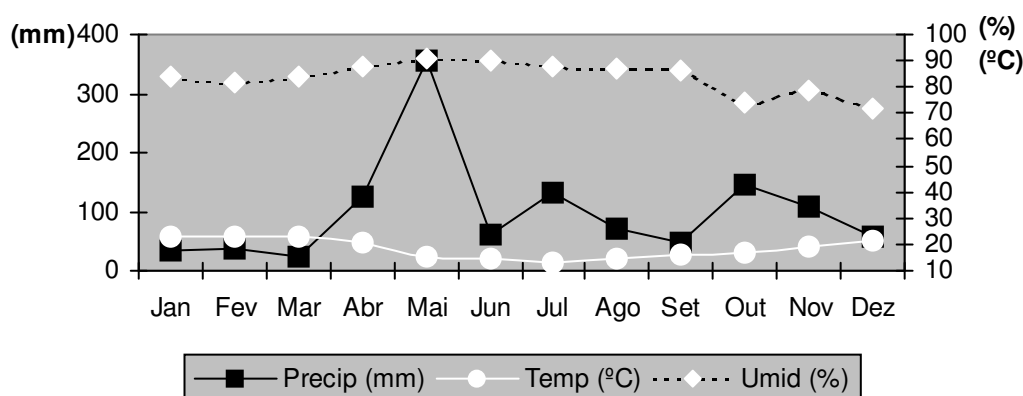


Fig.1 – Variação climática de temperatura (°C), umidade (%) e precipitação (mm) da cidade de Rio Grande no primeiro ano do experimento.

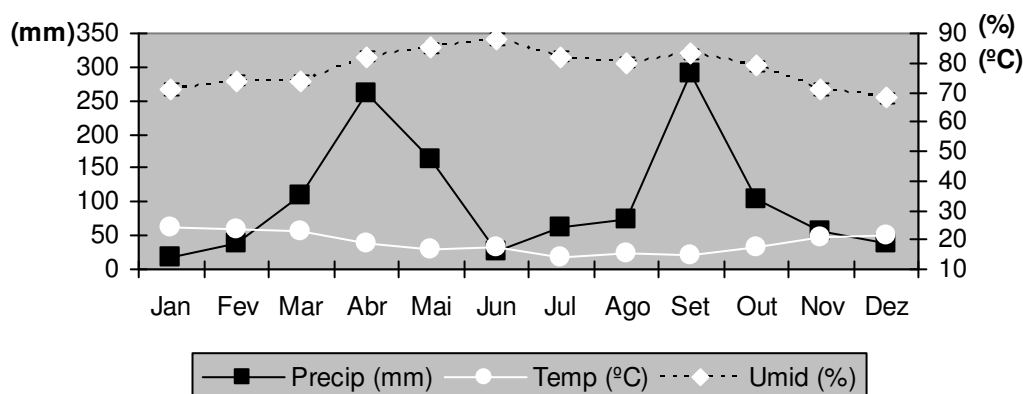


Fig.2 – Variação climática, de temperatura (°C), umidade (%) e precipitação (mm) da cidade de Rio Grande no segundo ano do experimento.

A relação não significativa entre temperatura e isolamento fúngico já foi descrita previamente por diversos autores (Ren et al., 2001; Panagopoulou et al., 2002; Wu et al., 2005; Lee et al., 2006), assim como a não significância da precipitação em amostras positivas (Lee et al., 2006). Já a influência da umidade no

isolamento fúngico tem tido resultados contraditórios entre os estudos sendo que alguns autores acreditam que exista uma relação (Lee et al., 2006), enquanto outros estudos demonstram que este fator não é determinante para o isolamento fúngico (Ren et al., 2001; Panagopoulou et al., 2002; Wu et al., 2005).

A densidade populacional do CRAM no momento das colheitas variou de zero a 17 animais entre aves, mamíferos e répteis, e não apresentou relação significativa com o isolamento de *Aspergillus* spp.. De acordo com estudo realizado por Wu et al. (2005), o número de ocupantes nas instalações está relacionado com o aumento na concentração de fungos leveduriformes, não apresentando relação com a concentração de fungos filamentosos no ambiente, o que confirma os resultados obtidos no presente estudo.

O isolamento de *Aspergillus* spp. no segundo ano foi significativamente menor ($p=0,025$; $p<0,05$) nas colheitas das 08h00min em relação ao ano inicial, enquanto que nas amostras das 11h30min não houve diferença significativa ($p=0,168$) entre os dois anos.

Tendo em vista que fatores climáticos e densidade populacional não interferiram no isolamento de *Aspergillus* spp. do ambiente, a diminuição significativa dos isolados na primeira colheita da manhã foi atribuída ao programa de desinfecção empregado, que conseguiu minimizar a proliferação fúngica durante o período crítico, em que o CRAM permanecia fechado, após expediente de trabalho interno diário. Outros estudos da ação *in loco* deste agente químico frente a fungos anemófilos, como o *Aspergillus* spp. não foram encontrados na literatura, no entanto, testes *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorexidina demonstraram resultados positivos contra fungos do gênero *Aspergillus* (dados em publicação¹).

Agentes químicos a base de digluconato de clorexidina são amplamente utilizados na prática odontológica e anti-sepsia, porém sua aplicação como desinfetante ambiental é limitada. No presente experimento, este agente químico foi escolhido principalmente devido a necessidade de aplicação em instalações com a presença de animais, tendo em vista que os produtos mais frequentemente utilizados para desinfecção de ambientes internos, como hipoclorito de sódio e amônia quaternária, são irritantes para mucosas e pele, e a amônia quaternária

¹ Artigo “Atividade *in vitro* de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*”, submetido e devidamente adequado às correções dos revisores científicos da Revista “Arquivos do Instituto Biológico”.

ainda é passível de contaminação, podendo carrear e disseminar microrganismos para o ambiente (McDonnell e Russell, 1999).

Em contrapartida, nas colheitas das 11h30min não ocorreu redução do isolamento fúngico entre os dois anos estudados, provavelmente devido à ventilação natural utilizada no CRAM, que permite a veiculação de propágulos fúngicos do ar externo para o interior das instalações, re-contaminando o ambiente. Esse fato também foi observado em estudos envolvendo ambientes hospitalares, residências e prédios comerciais (Leenders et al., 1999; Shelton et al., 2002; Martins-Diniz et al., 2005; Wu et al., 2005; Lee et al., 2006), os quais comprovaram que o ar externo é a maior fonte de contaminação fúngica para as instalações internas.

CONCLUSÃO

Os fatores climáticos e populacionais não desempenharam influência significativa no isolamento de *Aspergillus* spp. das instalações internas do CRAM. No entanto, o uso da Clorexidina-Cetrimida® em programas de desinfecção ambiental demonstrou eficácia no controle de fungos do gênero *Aspergillus*, podendo ser utilizado “in loco” no rodízio de substâncias ativas, para desinfecção de instalações de cativeiro de pingüins, auxiliando na prevenção da aspergilose nestas aves marinhas suscetíveis mantidas em ambientes fechados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, G.C.; REWELL, R.E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 59:213-224, 1949.
- BAUCK, L. Mycoses. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R.. **Avian Medicine: Principles and Application**, Wingers Publishing, Florida, 1994, cap.35, p.997-1006.
- FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. *Veterinary Record*, v.126, n.4, p.81-85, 1990.
- GARCÍA, M.E. & BLANCO, J.L.. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Revista Iberoamericana de Micología*; v.17, p.2-7, Madrid, 2000.
- KEARNS, K. S.; LOUDIS B. Avian Aspergillosis. In: Recent Advances in Avian Infectious Diseases, *International Veterinary Information Service*, Ithaca NY, 2003.
- KHAN, Z.U.; PAL, M.; PALIWAL, D.K. et al. Aspergillosis in imported penguins. *Sabouraudia*, v.15, p.43-45, 1977.
- KITTLE, D. *Zoo without penguins after fatal 02 illness*, 06/02/2003. Disponível em <<http://www.potterparkzoo.org>>. Acessado em: 23 março 2004.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9ª ed. Sarvier, São Paulo – SP, 2002, 1104p.

- LAGNEAU, P.E. ; HOUTAIN, J.Y. Aspergillose invasive chez des psittacidés. *Ann. Méd. Vet*, v.145, p.307-310, 2001.
- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- LEE, T.; GRINSHUPUN, S.A.; MARTUZEVICIUS, D. et al. Relationship between indoor and outdoor bioaerosols collected with a button inhalable aerosol sampler in urban homes. *Indoor air*, v.16, p.37-47, 2006.
- LEENDERS, A.C.A.P.; BELKUM, A.V.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A.; VERBRUGH, H.A.. Density and Molecular Epidemiology of *Aspergillus* in Air and Relationship to Outbreaks of *Aspergillus* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.6, p.1752-1757, 1999.
- MARTINS-DINIZ, J.N.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T. et al. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. *Revista de Saúde Pública*, v.39, n.3, p.398-405, 2005.
- MCDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Review*, v.12, n.1, p.147-179, 1999.
- MORRIS, G.; KOKKI, M.H.; ANDERSON, K. et al. Sampling of *Aspergillus* spores in air. *Journal of Hospital Infection*, v.44, p.81-92, 2000.
- PANAGOPOULOU, P.; FILIOTI, J.; PETRIKKOS, G. et al. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *Journal of Hospital Infection*, v.52, p.185-191, 2002.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. Baltimore. Williams and Wilkins. p. 686, 1965
- REDIG, P.T. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. In: *Zoo & Wild Animal Medicine - current therapy 3*. Denver, Colorado, 1993, cap.23, p.178-181.
- REN, P.; JANKUN, T.M.; BELANGER, K. et al. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy*, v.56, p.419-424, 2001.
- SHELTON, B.G.; KIRKLAND, K.H.; FLANDERS, W.D. et al. Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.4, p.1743-1753, 2002.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M. et al. Prevalência de aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.71, n.1, p.75-77, 2004.
- XAVIER, M.O.; LEITE, A.T.M.; SOARES, M.P. et al. Aspergilose em Pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) – Relato de Caso. *Veterinária e Zootecnia*, v.13, n.1, p.28-32, 2006.
- WARRIS, A.; VERWEIJ, P.E.. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Medical Mycology*, s.1, v.43, p.59-65, 2005.
- WU, P.C.; LI, Y.Y.; CHIANG, C.M. et al. Changing microbial concentrations are associated with ventilation performance in Taiwan's air-conditioned office buildings. *Indoor air*, v.15, p.19-26, 2005.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Chemitec Agro-Veterinária pela gentileza no fornecimento do produto Clorexidina-Cetrimida® para uso neste experimento.

3.5 ARTIGO

“Aspergillosis: a limiting factor during the recovery of captive Magellanic penguins”

Artigo submetido para publicação na revista “Brazilian Journal of Microbiology” registrado como 241/06

ASPERGILLOSIS: A LIMITING FACTOR DURING RECOVERY OF CAPTIVE MAGELLANIC PENGUINS*

Melissa O. Xavier^{1*}, Mauro P. Soares², Ana Raquel M. Meinerz³, Márcia O. Nobre⁴,
Luiza G. Osório⁵, Rodolfo P. da Silva Filho⁶, Mário Carlos A. Meireles¹.

¹ Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (FAVET, UFPel), Campus Universitário, s/nº, CEP: 96010-900.

² Laboratório Regional de Diagnóstico – FAVET, UFPel.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

⁴ Depto. de Clínicas Veterinária – FAVET, UFPel.

⁵ Graduação em Veterinária (FAVET, UFPel).

⁶ Centro de Recuperação de Animais Marinhos de Rio Grande – CRAM, MO-FURG.

* Parte integrante da dissertação de mestrado da primeira autora. E-mail: melissa@ufpel.edu.br, tel: (53) 32757496.

ASPERGILLOSIS: A LIMITING FACTOR DURING RECOVERY OF CAPTIVE MAGELLANIC PENGUINS

ABSTRACT

The article describes the epidemiology, macroscopic and histological lesions as well as the isolation of *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* from Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) during recovery in the Center for Recovery of Marine Animals (CRAM - 32°S/52°W), over a period of two years. From January 2004 to December 2005 the Center received 52 Magellanic penguins, and 23% (12/52) died. Necropsies were performed and tissue samples were collected for histological and microbiological examination. From 12 dead animals, aspergillosis was confirmed in five animals, corresponding to 42% of the mortality. Granulomatous nodules were observed mainly on air sacs and lungs. Histologically, septate and branching hyphae, measuring 3-5 µm and PAS positive were found. Two of these cases were caused by *A. fumigatus*, two other by *A. flavus*, and in one the diagnostic was established by macroscopic lesions observed in the necropsy without sample collection for fungal isolation and identification. The five aspergillosis cases occurred in the first year of the study, when a disinfection program was not yet established in the CRAM. This paper points out the importance of aspergillosis in the rehabilitation process of captive penguins, and emphasize the necessity of an environmental disinfection on the aspergillosis prevention, mycosis that caused a high rate of mortality of the seabirds found on the Brazilian coast and admitted in the CRAM.

KEYWORDS: aspergillosis, rehabilitation, penguins, captivity.

ASPERGILOSE: UM FATOR LIMITANTE NA REABILITAÇÃO DE PINGÜINS-DE-MAGALHÃES

RESUMO

O trabalho descreve fatores epidemiológicos, achados de necropsia, histológicos e o isolamento de *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* em pingüins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM - 32°S/52°W), durante um período de dois anos. De janeiro de 2004 a dezembro de 2005 foram recebidos no Centro, 52 pingüins-de-Magalhães, dos quais 23% (12/52) morreram. Esses animais foram necropsiados e amostras de tecidos foram coletadas para exame histológico e microbiológico. De 12 animais necropsiados, aspergilose foi diagnosticada em 42% (5/12). Granulomas foram observados principalmente em sacos aéreos e pulmões e hifas septadas, hialinas e dicotômicas em ângulo agudo foram encontradas na histologia. Dois casos foram ocasionados por *A. fumigatus*, outros dois por *A. flavus* e em um caso o diagnóstico foi estabelecido pelas lesões macroscópicas observadas na necropsia, sem a coleta de amostra para isolamento e identificação fúngica. Os cinco casos da micose ocorreram no primeiro ano, período em que não havia um programa de desinfecção no Centro. Este trabalho ressalta a importância da aspergilose interferindo no processo de reabilitação de pingüins em cativeiro no CRAM, e enfatiza a necessidade da desinfecção ambiental na prevenção da micose, doença que causa uma alta taxa de mortalidade de aves marinhas encontradas na costa brasileira e encaminhadas ao CRAM.

PALAVRAS-CHAVE: aspergilose, reabilitação, pingüins, cativeiro

INTRODUCTION

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) live on the southern coasts of South America, in the Pacific and Atlantic Oceans, in the Falkland Islands and in Tierra del Fuego [18]. Usually they migrate in the direction of Argentina and Brazil to feed on fish. During this migratory route many of these birds are exposed to adverse environmental conditions and some of them are found on beaches, generally showing poor body conditions with dehydration, hypothermia, skin lesions, traumatic process or oiled and then, they are sent to rehabilitation [5; 6; 7; 14; 16; 18].

In Brazil, there are 14 institutions, distributed in different states of the country that promote rehabilitation of marine animals [6]. The unique specific center for the rehabilitation of marine fauna in Brazil, with emphasis on oiled animals is situated in the South of Brazil in the city of Rio Grande, RS (32°S/52°W). In this center, named 'Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM)', all the necessary procedures for the animals to acquire good conditions to be reintroduced in the environment are carried out [16].

During the period that penguins stay in captivity, many of them are affected by diseases that cause death hindering the process of rehabilitation and reintroduction to the environment. Among these diseases aspergillosis stands out, an opportunist mycosis caused by the *Aspergillus* genus, which affects mainly the respiratory system and is considered one of the most important causes of mortality in captive penguins [1; 4; 8; 11; 15].

Avian aspergillosis could be classified into acute or chronic disease. The acute presentation is usually a flock problem with juveniles that are exposed to high spore levels, progressing rapidly and causing death within 48 hours. In many cases it is severe and includes dyspnea, with high morbidity and mortality rates. The main route of dissemination of the fungi is through the respiratory system with only minor spread by blood circulation. The chronic presentation usually appears in individual adults that have been exposed to low spore levels but are immunosuppressed due to stress, disease, antibiotic or steroidal therapy. The bird becomes unable to effectively eliminate a normal inhalation of *Aspergillus* spores, which colonize local tissue and can cause focal and/or disseminated form of aspergillosis. The most frequent site of chronic focal form of the disease on marine avian is the trachea while the disseminated form generally starts in the lungs and air sacs and spreads to other

tissues like bones, liver, spleen and kidney. The chronic presentation progresses slowly for weeks or months, with low rates of morbidity and mortality [1; 10; 13].

Several preventive measures are used against the disease, nevertheless in some occasions these preventive measures can not avoid outbreaks of aspergillosis. Among several preventive measures we can highlight the administration of antifungal therapy to susceptible penguins [9; 16], the control of air quality with laminar flow, the use of air filters and programs for disinfection of the surroundings [1; 3; 10].

This report describes some epidemiologic factors of the aspergillosis in Magellanic penguins received on CRAM over a two-year period.

MATERIALS AND METHODS

During the period of January 2004 to December 2005 the routine of recovering penguins at CRAM was attended. In this center, all admitted penguins were identified, weighted, and evaluated for the amount of oil and the hematocrit value (Ht), according to the protocol described by Ruoppolo et al. [16]. With the aim of evaluating the clinical evolution of the recovering penguins, all birds were weighted weekly, clinically examined and blood sample was collected to determine the hematocrit level.

The preventive measure used against aspergillosis in CRAM is the administration of oral itraconazole¹ (15 mg/kg/day, during 15 days), for newly-arrived penguins with body weight less than 2.5 kg. This preventive therapy was made during the two years, and started in the arrival after the clinical examination of the birds.

Since January 2005, a disinfection program was established in the CRAM to increase the air quality, reducing airborne conidia concentration in the facilities of the captive penguins. This disinfection program consisted of cleaning daily the indoor equipments and objects with the use of a chemical agent (chlorhexidine-cetrimida²).

The penguins that died were sent to necropsy to determine the cause of death. In the necropsy macroscopic alteration was evaluated and fragment of tissues were collected for histology and mycology.

¹ Sporanox® - Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. – São Paulo, SP.

² Clorexidina-Cetrimida Chemitec® - Chemitec Agro-Veterinária, São Paulo, SP.

Samples collected for histology were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (3-4 μm) were stained with haematoxylin and eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS) and Grocott's methanamine silver (GMS).

For mycology, the samples were submitted to direct examination with KOH 20%, and to culture in triplicate in Sabouraud dextrose agar with cloranfenicol, incubated at 37°C for seven days with daily observation of the culture.

RESULTS

During the period of study 52 Magellanic penguins, 47 juveniles and 5 adults were received. The birds had body weight ranging from 1.8 to 3.2 kg, values situated below the normal reference for the species (approximately 4 kg). A total of 18 penguins had oiled feathers and 11 had low Ht value (<35%). Over the two-year period 40 birds (77%) were recovered and 12 (23%) died. Among these dead penguins, two died with less than 24 hours after the arrival, three with less than seven days, four with approximately 20 days in captivity, two after 30 days of the arrival and one after 90 days.

The necropsy, histological and mycological examination established the aspergillosis diagnostic in 42% (5/12) of the dead animals during the two years of the study. However, all the deaths were registered in the first year, resulting in a rate of 83% of death caused by aspergillosis in 2004 and 0% in 2005. Seven other penguins died from other causes as cachexia or pododermatitis with secondary septicemia.

All the animals that had aspergillosis were juveniles and had poor body conditions, the hematocrit value was low and only one was oiled. All the deaths occurred as isolated cases, causing penguins deaths in distinct months, June, July, September and October.

Macroscopic alterations in five birds with aspergillosis were varied. Although all penguins showed lesions in the respiratory system, the acute aspergillosis presentation, characterized by miliary white-yellowish granulomatous nodules in the lung, was found in three penguins that had sudden death, and the chronic presentation, with the wall of air sacs thickened and disseminated to the other organs was observed in two penguins that had respiratory clinical signs such as dyspnea and pulmonary stertors, loss of appetite and lethargy preceding the death.

The necropsy of the three penguins with the acute presentation revealed lungs with congestion and small white-yellowish nodules with 1-3 mm. Two penguins

with chronic presentation (Fig. 1) presented thickened air sacs with abundant caseous and necrotic debris and grayish-green fungal colonies and nodules with 1 mm to 1 cm in the air sacs and lungs. One penguin had white-yellowish nodules with approximately 0.5 cm, disseminated throughout the thoracic cavity and externally in the esophagus. Another penguin showed also nodules and fungal colonies in the kidneys and liver and the syrinx had a nodule measuring approximately 7 cm, with caseous material in the center and recovered with whitish plaques.

One bird with a chronic presentation did not have material sent to the fungal culture, but the macroscopic and histological lesions were typical of aspergillosis.

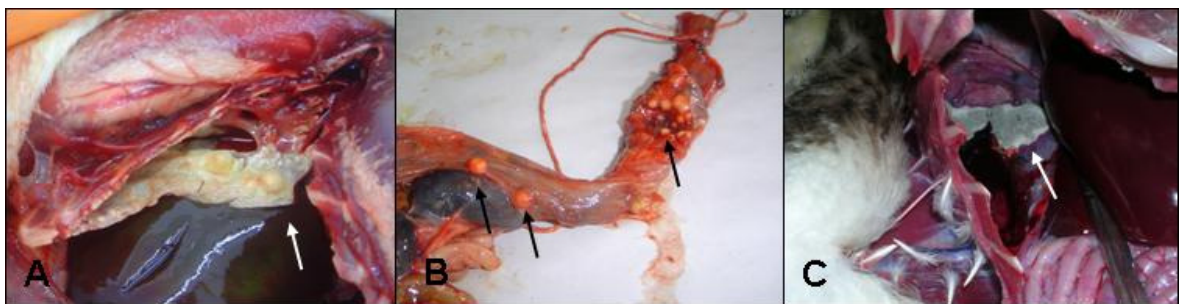


Figure 1- Macroscopic lesions of aspergillosis in Magellanic penguins: (A) air sacs thickness with abundant caseous and nodules; (B) nodules white-yellowish externally on esophagus; (C) fungal colonies in the air sacs;

Histologically, penguins with acute presentation had lungs with necrotic areas with septate and branching hyphae, measuring 3-5 μm and PAS positive growing in a radial pattern rimmed by cell debris, hemorrhage and infiltrates of heterophilic, mononuclear and multinuclear cells. In the chronic presentation it was observed in the lungs, liver, kidneys and syrinx a necrotic foci surrounded by macrophages, heterophils and giant cells, sometimes within a fibrous tissue proliferation at the periphery. The air sacs presented thickness and abundant caseous material. Septate and branching hyphae, giant cells, mononuclear and multinuclear cells and the characteristic conidial head of *Aspergillus* were also present (Fig.2).

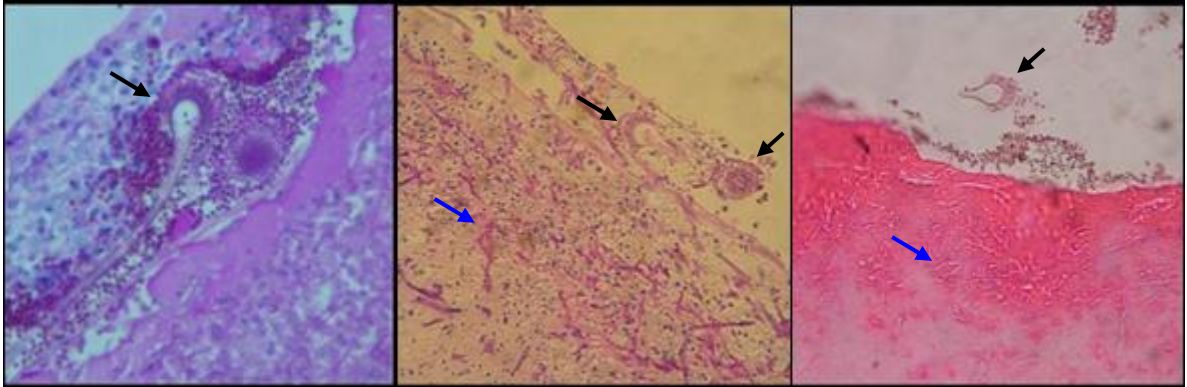


Figure 2 – Conidial heads of *Aspergillus* spp. (black arrows) and septate and branching hyphae (blue arrows), in air sacs of the Magellanic penguins at histological examination with HE (100X).

Direct examination with KOH of the samples in mycology revealed septate and branching hyphae in tissues and conidial heads in air sacs. Culture allowed to identify the etiologic agent as *A. fumigatus* in two cases and as *A. flavus* in two other animals, represented, respectively, by grayish turquoise colonies with rapidly growing and uniseriate phialides over upper half to two-thirds of the pyriform vesicle, and by yellow-green colonies with rough-walled stipes, spherical vesicles and metulae covering three quarters of the entire surface of the vesicle.

DISCUSSION

The importance of aspergillosis in different species of captive penguins is reported since the 40s, causing mortality rates between 50-100% in marine birds in different regions of the world [2; 4; 9; 11; 12; 17]. In our work the high frequency of aspergillosis was reaffirmed and it corresponded to approximately 50% of the mortality in recovering penguins. This numbers can be explained by the difficulty in prophylaxis and early diagnosis of this disease and consequent inefficacious treatment, which results in death of the majority of the affected birds.

The acute presentation of aspergillosis was observed in 60% of the Magellanic penguins affected, differing from the values found by Hocken [9], who observed only 14% of acute presentation in *Eudyptula m. minor* species. However the work of Hocken was carried out with wild penguins that had only nutritional stress as an immunosuppressant factor, while the recovering penguins at CRAM went through stress factors like: manipulation, transport, habitat changing, among others, increasing even further the immunosuppression which predisposes to this mycosis with more serious injuries and more rapidly [9].

The corporal debilitation, characterized by malnutrition, dehydration and hypothermia, captivity stress, antibiotic or steroidal therapy and the oil toxicity are factors that predispose recovering penguins to aspergillosis [1; 17]. In spite of the oil being considered an important factor to induce a serious immunosuppression, in our work this factor was not characterized as an important factor to predispose the penguins to aspergillosis, because from 18 oiled penguins treated during this period only one had aspergillosis.

Young birds have immature immune system that increases the avian susceptibility to aspergillosis [1, 4]. In our cases all penguins that died with this mycosis were juveniles, but with our results we can not affirm that this category is more susceptible, because in this study juvenile penguins represented 90% of the total birds received in CRAM.

In spite of *A. fumigatus* being the fungal specie more frequently involved on penguins aspergillosis [2; 11], in our work, this specie was found at the same frequency as *A. flavus*, that is also considered a pathogenic species associated to clinical cases of aspergillosis in marine and domestic birds [2; 3]. Therefore it has to be consider that the values obtained could be different if the number of animals was increased.

The aspergillosis in captive penguins does not have a constant annual prevalence, occurring frequently as outbreaks that cause high mortality rates in some years and in others the mortality tend to nullity [4]. In CRAM the occurrence of aspergillosis was not an outbreak, but occurred as isolated cases. This fact is justified by the opportunistic characteristic of this mycosis, that usually occur when there is host immunossuppression associated or not with the increase inhalation of spores [1; 3; 15].

The mortality decrease in the second year of the study was attributed to the establishment of a disinfection program in CRAM. The cleaning and disinfection program is the basis of a good sanitary program because it decreases the quantity of spores in the environment and increases the air quality [1; 3; 10].

CONCLUSION

This work shows that the aspergillosis is an important disease that causes mortality during the recovering process of rehabilitation of penguins in captivity. To the best of our knowledge this is the first report of epidemiology of aspergillosis in

penguins found on Brazilian beaches and sent to CRAM, showing high levels of mortality, and emphasize the necessity of an environmental disinfection on this mycosis prevention.

REFERENCES

- [1] Abundis-Santamaria, E. 2005. Aspergillosis in birds of prey, 2003. Available at: <http://www.aspergillus.man.ac.uk>. Accessed 23 March 2005.
- [2] Ainsworth, G.C.; Rewell, R.E. (1949). The incidence of aspergillosis in captive wild birds. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 59, 213-224.
- [3] Andreatti Filho, R.L. (2000). Enfermidades micóticas, *In*: Berchieri Júnior, A. & Macari, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.369-375.
- [4] Flach, E.J.; Stevenson, M.F.; Henderson, G.M. (1990). Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. *Veterinary Record*. 126 (4), 81-85.
- [5] Fowler, G.S.; Fowler, M.E. Order Sphenisciformes (Penguins). (2001). *In*: Fowler, M.E. & Cubas, Z.S. *Biology, medicine and surgery of South American wild animals*. Iowa State University Press, USA, p.53-64.
- [6] García-Borboroglu, P.; Boersma, P.D.; Ruoppolo, V.; Reyes, L.; Rebstock, G.A.; Griot, K.; Heredia, S.R.; Adornes, A.C.; Silva, R.P. (2006). Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*. 52, 193-198.
- [7] Gandini, P.; Boersma, P.D.; Frere, E.; Gandini, M.; Holik, T.; Lichtschein, V.. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina. (1994). *The Auk*. 111 (1) 20-27.
- [8] Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R. (1995). Maternal transfer of anti-*Aspergillus* spp. Immunoglobulins in African Black-footed Penguins (*Spheniscus demersus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 31 (4), 545-549.
- [9] Hocken, A.G. (2000). Cause of death in blue penguins (*Eudyptula m. minor*) in North Otago, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*. 27, 305-309.
- [10] Kearns, K. S.; Loudis B. (2003). Avian aspergillosis. *In*: Recent Advances in Avian Infectious Diseases, *International Veterinary Information Service*, Ithaca NY.
- [11] Khan, Z.U.; Pal, M.; Paliwal, D.K.; Damodaram, V.N. (1977). Aspergillosis in imported penguins. *Sabouraudia*. 15, 43-45.
- [12] Kittle, D. 2004. Zoo without penguins after fatal 02 illness, 06/02/2003. Available at: <http://www.potterparkzoo.org>. Accessed 23 March 2004.
- [13] Martínéz, R.R.; Cerecero, J.; Cervantes, J. (2000). Brote de aspergilosis em gaviotas. *Veterinaria México*. 31 (3), 259-260.
- [14] Petry, M.V.; Fonseca, V.S.S. (2002). Effects of human activities in the marine environment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ornitologia Neotropical*. 13, 137-142.
- [15] Redig, P.T. (1993). General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. *In*: Fowler, M.E. *Zoo & Wild Animal Medicine - current therapy* 3. Denver, Colorado, p.178-181.
- [16] Ruoppolo V.; Adornes, A.C.; Nascimento, A.C.; Silva-Filho, R.P. (2004). Reabilitação de pingüins afetados por petróleo. *Clínica Veterinária*. 51, 78-83.
- [17] Russel, M.; Holcomb, J.; Berkner, A. (2003). *30-Years of Oiled Wildlife Responses Statistics*. Proceedings of the 7th International Effects of Oil and Wildlife Conference Hamburg, Germany, p.1-18.
- [18] Willians, T. D. (1995). *The Penguins, Spheniscidae*, Oxford University Press.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- A freqüência da aspergilose em pingüins no CRAM foi relevante, demonstrando a interferência da micose no processo de reabilitação destes animais que geralmente encontram-se imunossuprimidos;
- Os casos de aspergilose em pingüins durante o período do estudo apresentaram uma redução significativa entre os dois anos, com taxas de mortalidade passando de 83% no primeiro ano (5/6) para 0% no segundo (0/6).
- Fungos do gênero *Aspergillus* estão presentes no ambiente de reabilitação do CRAM;
- *A. fumigatus* foi a espécie predominante nas amostras obtidas das instalações de cativeiro do CRAM, seguido de *A. niger* e *A. flavus*, todas com potencial patogênico;
- Os casos de aspergilose em pingüins no CRAM foram causados por *A. fumigatus* e *A. flavus*;
- Os agentes químicos que obtiveram melhor resultado “in vitro” frente a espécies patogênicas de *Aspergillus* foram o digluconato de clorexidina e a amônia quaternária;
- A contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* no ambiente interno do CRAM pôde ser parcialmente controlada pelo programa de desinfecção ambiental estabelecido com o uso rotineiro da Clorexidina-Cetrimida®;

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final do experimento sugere-se que a melhora na qualidade do ar em relação à concentração de *Aspergillus* spp. beneficiou a reabilitação de pingüins no CRAM, sem o aparecimento de nenhum caso de aspergilose durante o período de controle microbiológico do ambiente. Isto comprova a importância da desinfecção ambiental como uma medida eficaz dentro de um conjunto de ações necessárias para a prevenção da enfermidade.

Deve-se ter em mente que todas as ações que objetivam o controle fúngico nos ambientes são benéficas, e que apesar de não anularem a possibilidade de ocorrência de casos isolados e esporádicos de aspergilose em pingüins no CRAM, devem ser adotadas no sentido de reduzir ao máximo os casos da micose, garantindo que na difícil tarefa de reabilitação de pingüins, um fator importante seja amenizado, sendo um a menos a interferir neste processo.

A redução significativa do isolamento fúngico que ocorreu de forma parcial, demonstra que além da desinfecção, a alteração da ventilação natural para ventilação controlada com emprego de filtros de ar, que reduziriam a recontaminação das instalações pelo ar externo, são outras medidas de prevenção que devem ser estudadas no CRAM. Assim como métodos para diagnóstico precoce da enfermidade, uso de novos fármacos antifúngicos tanto para prevenção como para tratamento, ou ainda uso de substâncias imunoestimulantes e imunomoduladoras que auxiliariam a resposta imune dos pingüins. Este último se destaca à medida que a maioria dos animais recebidos pelo CRAM apresenta imunossupressão o que agrava sua predisposição à aspergilose.

Todos os pontos devem ser estudados considerando a relação custo - benefício assim como a aplicabilidade a nível populacional e não individual. Isto porque a grande maioria dos estabelecimentos que trabalham com reabilitação de pingüins atua como organizações não-governamentais, com poucos recursos financeiros, e em muitos casos recebem centenas de animais enfermos em um

mesmo período, o que torna difícil e inviável a clínica individual destes animais que geralmente necessitam de cuidados imediatos e emergenciais, sendo tratados como uma população.

Este período de trabalho proporcionou a integração interinstitucional, e a inter-relação da micologia laboratorial com a micologia prática aplicada, na área de clínica e reabilitação de animais, bem como a participação efetiva diária na área da pesquisa com desenvolvimento de projetos, rotina laboratorial e orientação de alunos em diferentes níveis da graduação, fatores fundamentais para crescimento e aperfeiçoamento profissional.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M.L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la Aspergilosis nosocomial. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.79-84, 2000.

ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*, 2003. Disponível em <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>>. Acesso em: 23 março 2005.

AFONSO, M.S.M.; TIPPLE, A.F.V.; SOUZA, A.C.S.; PRADO, M.A.; ANDERS, P.S. A qualidade do ar em ambientes hospitalares climatizados e sua influência na ocorrência de infecções. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.6, n.2, p.181-188, 2004.

AINSWORTH, G.C.; REWELL, R.E. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.59, p.213-224, 1949.

ANDREATTI FILHO, R.L. Enfermidades micóticas, In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.369-375.

BAUCK, L. Mycoses. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R.. **Avian Medicine: Principles and Application**, Florida: Wingers Publishing, 1994. p.997-1006.

BARBIERI, E.; VOOREN, C. M.. Técnicas de recuperação de pingüins oleados. **Revista CETESB de Tecnologia - Ambiente**, v.7, n.1, p.18-22, 1993.

BEYTUT, E.; ÖZCAN, K.; ERGINSOY, S. Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.52, n.1, p.71-84, 2004.

BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRÓN, J.; CABALLERO, J.; GARCÍA, M.E. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.10-15, 1998.

BINGHAM, M. The decline of Falkland Islands penguins in the presence of a commercial fishing industry. **Revista Chilena de Historia Natural**, v.75, p.805-818, 2002.

CARRASCO, L.; LIMA Jr., J.S.; HALFEN, D.C.; SALGUERO, F.J.; SANCHEZ-CORDÓN, P.; BECKER, G. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.551-554, 2001.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; BACCI, A.; BISTONI, F.; KURUP, V.P.; ROMANI, L.. T Cell Vaccination in Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis. **The Journal of Immunology**, v.165, p.381-388, 2000.

CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.J.; LIMA, M.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* em bovinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.2, p.82-86, 2003.

CORK, S.C.; ALLEY, M.R.; JOHNSTONE, A.C.; STOCKDALE, P.H.G. Aspergillosis and other causes of mortality in the Stitchbird in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, v.35, n.3, p.481-486, 1999.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 1354 p.

DIEBOLD, E.N.; BRANCH, S.; HENRY, L. Management of penguin population in North American zoos and aquariums. **Marine Ornithology**, v.27, p.171-176, 1999.

FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. **Veterinary Record**, v.126, n.4, p.81-85, 1990.

FOWLER, G.S.; FOWLER, M.E. Order Sphenisciformes (Penguins), In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**, 1 ed. USA: 2001. p.53-64.

GAFI, V.; LANDE, R.; GAGLIARDI, M.C.; SEVERA, M.; GIACOMINI, E.; REMOLI, M.E.; NISINI, R.; RAMONI, C.; FRANCESCO, P.D.; ALDEBERT, D.; GRILLOT, R.; COCCIA, E.M.. Human Dendritic Cells following *Aspergillus fumigatus* Infection Express the CCR7 Receptor and a Differential Pattern of Interleukin-12 (IL-12), IL-23 and IL-27 Cytokines, Which Lead to a Th1 Response. **Infection and Immunity**, v.74, n.23, p.1480-1489, 2006.

GANCEDO, J.M.A.; GRANDES, J.M.F.; DÍEZ, M.F. Mastitis por *Aspergillus fumigatus* en ganado ovino. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.13-17, 1999.

GANDINI, P.; BOERSMA, P.D.; FRERE, E.; GANDINI, M.; HOLIK, T.; LICHTSCHEIN, V.. Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along coast of Chubut, Argentina. **The Auk**, v.111, n.1, p.20-27, 1994.

GARCÍA, M.E.; BLANCO, J.L.. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. **Revista Iberoamericana de Micología**; v.17, p.2-7, Madrid, 2000.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P.D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G.A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S.R.; ADORNES, A.C.; SILVA, R.P.. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v.52, p.193-198, 2006.

GEORGE, R. H. Health problems and diseases of sea turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. **The biology of sea turtles**, Boca Raton: CRC Press, 1991. 363 p.

GRACZYK, T.K.; COCKREM, J.F. *Aspergillus* spp. seropositivity in New Zealand penguins. **Mycopathologia**, v.131, p.179-184, 1995.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R. Maternal transfer of anti-*Aspergillus* spp. Immunoglobulins in African Black-footed Penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, n.4, p.545-549, 1995.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; KLEIN, P.N. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive Aspergillosis. **Mycopathologia**, v.140, p.121-127, 1998.

HO, P.L.; YUEN, K.Y.. Aspergillosis in bone marrow transplant recipients. **Clinical Reviews in Oncology/Hematology**, v.34, p.55-69, 2000.

HOCKEN, A.G. Cause of death in blue penguins (*Eudyptula m. minor*) in North Otago, New Zealand. **New Zealand Journal of Zoology**, v.27, p.305-309, 2000.

IBRRC. Oil spill history. Disponível em: <http://www.ibrrc.org/spill_history.html> Acesso em: 20 Dez. 2006.

IUCN 2006. *2006 IUCN Red List of Threatened Species*. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 21 Jan. 2007.

KEARNS, K. S.; LOUDIS B. Avian Aspergillosis. In: Recent Advances in Avian Infectious Diseases, Ithaca NY: **International Veterinary Information Service**, Disponível em <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 23 março 2003.

KHAN, Z.U.; PAL, M.; PALIWAL, D.K.; DAMODARAM, V.N. Aspergillosis in imported penguins. **Sabouraudia**, v.15, p.43-45, 1977.

KITTLE, D. *Zoo without penguins after fatal 02 illness*, 06/02/2003. Disponível em <<http://www.potterparkzoo.org>>. Acesso em: 23 março 2004.

KLICH, M.A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9 ed. São Paulo – SP: Sarvier, 2002, 1104p.

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

LATGÉ, J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **TRENDS in Microbiology**, v.9, n.8, p. 382-389, 2001.

LEWIS, R.E.; WIEDERHOLD, N.P.; CHI, J.; HAN, X.Y.; KOMANDURI, K.V.; KONTOYIANNIS, D.P.; PRINCE, R.A.. Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.635-637, 2005.

LOEFFLER, J.; HEBART, H.; COX, P.; FLUES, N.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Nucleid Acid Sequence-Based Amplification of *Aspergillus* RNA in Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.4, p.1626-1629, 2001.

MACHADO, M.L.S; OLIVEIRA, L.O.; BECK, C.A.C.; CONCEIÇÃO, M.S.N.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Ceratomicose eqüina causada por *Aspergillus flavus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.2, p.219-223, 2005.

MARTÍNEZ, R.R.; CERECERO, J.; CERVANTES, J. Brote de aspergilosis em gaviotas. **Veterinaria México**, v.31, n.3, p.259-260, 2000.

MAZET, J.A.K.; NEWMAN, S.H.; GILARDI, K.V.K.; TSENG, F.S.; HOLCOMB, J.B.; JESSUP, D.A.; ZICCARDI, M.H. Advances in Oiled Bird Emergency Medicine and Management. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.16, n.2, p.146-149, 2002.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; SOARES, C.P.; SILVA, J.L.M.; ANDREOTTI, P.F.. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.45, p.383-394, 2005.

MORRIS, G.; KOKKI, M.H.; ANDERSON, K.; RICHARDSON, M.D. Sampling of *Aspergillus* spores in air. **Journal of Hospital Infection**, v.44, p.81-92, 2000.

PEETERS, D.; PETERS, I.R.; CLERCX, C.; DAY, M.J. Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in nasal biopsies from dogs with sino-nasal aspergillosis. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.318-326, 2006.

PETRY, M.V.; FONSECA, V.S.S. Effects of human activities in the marine environment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v.13, p.137-142, 2002.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965. 686p.

REDIG. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. In: FOWLER, M.E.: **Zoo & Wild Animal Medicine: current therapy 3**. Denver, Colorado: W B Saunders Inc., 1993. p.178-181.

RICHARD, J.L.; PEDEN, W.M.; SACKS, J.M. Effects of adjuvant-augmented germing vaccines in turkey poults challenged with *Aspergillus fumigatus*. **Avian Diseases**, v.35, p.93-99, 1991.

RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R; CUTLIP, R.C.; PIER, A.C. Vaccination studies of aspergillosis in turkeys: subcutaneous inoculation with several vaccine preparations followed by aerosol challenge exposure. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.3, p.488-492, 1982.

RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R.; PEDEN, W.M.; PINELLO, C.. Recent studies on Aspergillosis in turkey poults. **Mycopathologia**, v.87, p.3-11, 1984.

RIVERA, A.; HOHL, T.; PAMER, E.G.. Immune Responses to *Aspergillus fumigatus* Infections. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.12, p.47-49, 2006.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; BOSSCHE, H.V. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics**, v.26, p.31-53, 2003.

RODRIGUES, A.G.; ARAUJO, R.; PINA-VAZ, C.. Human albumin promotes germination, hyphal growth and antifungal resistance by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v.42, p.711-717, 2005.

ROGAN, M.P.; GERAGHTY, P.; GREENE, C.M.; O'NEILL, S.J.; TAGGART, C.C.; McELVANEY, N.G.. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defense. **Respiratory Research**, v.29, n.7, p.1-11, 2006.

RUOPPOLO V.; ADORNES, A.C.; NASCIMENTO, A.C.; SILVA-FILHO, R.P. Reabilitação de pingüins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária**, ano IX, n.51, p.78-83, 2004.

RUSSEL, M.; HOLCOMB, J.; BERKNER, A. *30-Years of Oiled Wildlife Responses Statistics*. **Proceedings of the 7th International Effects of Oil and Wildlife Conference** Hamburg, Germany, p.1-18, 2003.

SANCHEZ, S.L.; GARRET, T.D.; SANCHEZ, C. Exhibit Modifications to Reduce the Incidence of Aspergillosis and Increase Breeding in Two Penguin Species at the Denver Zoo. Disponível em <<http://www.aza.org/AZAPublications/2005ProceedingsReg>>. Acesso em: 11 setembro 2006.

SEVERO, L.C.; GEYER, G.R.; PORTO, N.S.; WAGNER, M.B.; LONDERO, A.T.. Pulmonary *Aspergillus niger* intracavitary colonization. Report of 23 cases and review of the literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.14, p.104-110, 1997.

SHANNON, D. Treatment with itraconazole of penguins suffering from aspergillosis. **Veterinary Record**, v.130, n.21, p.479, 1992.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M.. The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**, v.129, p.569-582, 2005.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA-FILHO, R.P.; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (Pingüim). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; ATÃO-DIAS, J.L. : **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. São Paulo, SP: Roca, 2006. p.309-323.

SINGH, N.; PATERSON, D.L.. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.1, p.44-69, 2005.

STEVENS, D.A.. Vaccinate Against Aspergillosis! A Call to Arms of the Immune System. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.1131-1136, 2004.

STEVENS, D.A.; KAN, V.L.; JUDSON, M.A.; MORRISON, V.A.; DUMMER, S.; DENNING, D.W.; BENNETT, J.E.; WALSH, T.J.; PATTERSON, T.F.; PANKEY, G.A. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. **Clinical Infectious Diseases**. v.30, p.696-709, 2000.

STONE, W.B.; OKONIEWSKI, J.C. Necropsy Findings and Environmental Contaminants in Common Loons from New York. **Journal of Wildlife Disease**, v.37, n.1, p.178-184, 2001.

TARRAND, J.J.; HAN, X.Y.; KONTOYIANNIS, D.P.; MAY, G.S.. *Aspergillus* Hyphae in Infected Tissue: Evidence of Physiologic Adaptation and Effect on Culture Recovery. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p.382-386, 2005.

TELL, L.A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**, v.43, suppl 1, p.71-73, 2005.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M; KANASHIRO, A.M.I.; ZANATTA, G.F. Prevalência de aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.1, p.75-77, 2004.

WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M.. Fungal Infections in the Immunocompromised Host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, supl.1, p.153-158, 2000.

WARD, O.P.; QIN, W.M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v.58, 75p, 2006.