

## DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DE ASPERGILOSE POR *Aspergillus fumigatus* EM AVES

**FORESTI, Laís T.<sup>1</sup>, OSÓRIO, Luiza da Gama<sup>2</sup>; CABANA, Ângela Leitzke<sup>3</sup>;  
CLEFF, Marlete Brum<sup>4</sup>; MELLO João Roberto Braga de<sup>5</sup>, MEIRELES, Mário  
Carlos Araújo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq - Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária UFPel; <sup>2</sup>Doutoranda PPGCV-UFRGS / Instituto de Biologia-UFPel; <sup>3</sup>Mestranda PPG em Veterinária-UFPel; <sup>4</sup>Faculdade de Veterinária-UFPel; <sup>5</sup>Departamento de Ciências Farmacológicas-UFRGS  
[Laís\\_foresti@hotmail.com](mailto:Laís_foresti@hotmail.com)

### INTRODUÇÃO

Aves são particularmente suscetíveis à aspergilose, doença fúngica de maior morbimortalidade nestes animais em cativeiro, causando grandes perdas econômicas na avicultura de produção e comportando-se como fator limitante à criação e reabilitação de aves silvestres (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; XAVIER et al., 2007; KUBITSCHEK-BARREIRA et al., 2010).

Dentro do gênero *Aspergillus*, 16 espécies e uma variedade são agentes da aspergilose, destes, o *A. fumigatus* é responsável por cerca de 95% dos casos. Da mesma forma que as demais espécies do gênero, a principal via de infecção pelo *A. fumigatus* é a respiratória. Porém, sua penetração e colonização no tecido hospedeiro são facilitadas, uma vez que a espécie produz conídios menores e mais numerosos (FRAN-FISHER, 2001; TELL, 2005; ARNÉ et al., 2011).

Estudos relacionados ao diagnóstico precoce da aspergilose vem sendo realizados em aves naturalmente infectadas (CRAY et al., 2009; CABANA et al., 2010). Contudo, grande parte dos diagnósticos ainda é realizada *post mortem*, ou quando ocorrem *ante mortem* a terapia utilizada costuma ser ineficaz devido ao estágio avançado em que a doença é diagnosticada e ao seu caráter progressivo (FOWLER, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Em função da importância da aspergilose por *A. fumigatus* em aves, são necessários estudos que busquem profilaxia, diagnóstico e tratamento da micose. Para tanto é necessário que sejam estabelecidas formas de infecção experimental eficazes nesses animais. Em vista desta realidade o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração e volume dos inóculos de *A. fumigatus* administrados aos animais experimentais para desenvolvimento da aspergilose e definir o tempo decorrido entre a inoculação e o início do desenvolvimento da doença.

### MATERIAS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), utilizando 60 frangos de 15 dias obtidos de distribuidor comercial criados com controle de umidade e temperatura e administração de água e ração *ad libitum*. As aves foram submetidas à eutanásia com a administração intraperitoneal de tiopental (13,2 mg/kg) conforme Oliveira et al., 2002, cumprindo exigência do CFMV nº 714/2002. Em todos os exames necroscópicos observou-se macroscopia dos tecidos, e coletou-se *swabs* de sacos aéreos e traquéia, e fragmentos de pulmões, fígado, rins e baço. O material foi encaminhado ao Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária da UFPel, e semeado em ágar Sadouraud dextrose. Após sete dias a 25°C, as colônias foram identificadas quanto à macro e

micromorfologia, em exame direto com lactofenol azul de algodão entre lâmina e lamínula em aumento de 400x.

A cepa de *A. fumigatus* utilizada foi proveniente de um caso de aspergilose em pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Utilizou-se cultura de sete dias em PDA (Ágar batata) incubada a 37°C. As colônias foram cobertas com 1,0ml de solução salina estéril e uma gota de *tween* 80, conforme descrito por Tell et al. (2010). A solução foi transferida para tubo de ensaio estéril, e após 5 minutos, a suspensão homogênea superior foi transferida para outro tubo estéril e homogeneizada em um agitador de tubos durante 15 segundos (CLSI M38-A2).

Em um primeiro momento, para retroisolar a cepa de *A. fumigatus*, quatro animais foram inoculados por via intratraqueal com inóculo na concentração  $24 \times 10^8$  UFC/mL. Ao longo de duas semanas as aves foram observados quanto à presença de sinais clínicos, sendo realizadas necropsias ao final de cada semana.

Em um segundo momento, a partir do retroisolamento da cepa de *A. fumigatus* foram produzidos inóculos em duas concentrações:  $5 \times 10^6$  e  $24 \times 10^8$ , administrados aos animais por via intratraqueal em dois volumes diferentes. Para estes testes foram utilizados quatro grupos com 14 animais cada, conforme demonstrado em Tab. 1. Foram realizadas necropsias diárias em dois animais de cada grupo, iniciando pelo dia um (24 horas pós-inoculação), até o dia sete.

O tempo decorrido entre a inoculação e a primeira necropsia com retroisolamento do agente inoculado em ambos os animais determinou o primeiro dia de desenvolvimento da doença.

Tab. 1: Volume e concentração dos inóculos de *Aspergillus fumigatus* administrados por via intratraqueal a quatro grupos de frangos com 15 dias

Grupo	Volume inoculado	Concentração do inóculo
1	0,5 ml	$5 \times 10^6$
2	1,0 ml	$5 \times 10^6$
3	0,5 ml	$24 \times 10^8$
4	1,0 ml	$24 \times 10^8$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro animais inoculados com *A. fumigatus* na primeira etapa do estudo não apresentaram sinais clínicos, bem como não houve mortalidade durante as semanas em que foram avaliados. Segundo Armé et al. (2011), a infecção experimental por *Aspergillus* sp. geralmente causa manifestação superaguda da micose, com morte súbita entre o primeiro e o sétimo dia pós inoculação. Diferente do encontrado no presente estudo. Porém, o autor relata ainda que a sobrevivência dos animais em período posterior ao dia sete corresponde ao desenvolvimento de aspergilose crônica.

A via intratraqueal escolhida para administração do inóculo, simula a principal forma de infecção por *Aspergillus* sp., através da inalação dos conídios presentes no ambiente (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Esta via de inoculação é particularmente eficaz em aves pelas suas características anatômicas como ausência de epiglote e de diafragma, além da distribuição limitada de epitélio ciliado através do trato respiratório (TELL, 2005). Portanto, sinais correspondentes à infecção respiratória são esperados durante exames necroscópicos de aves com aspergilose.

Na necropsia da primeira ave, ao final da primeira semana, pode-se constatar sacos aéreos espessados e opacos e presença de um nódulo de aproximadamente 1mm em saco aéreo torácico direito. Ao fim da segunda semana outro animal foi

submetido à eutanásia, observando-se ao exame necroscópico espessamento e opacidade de sacos aéreos e congestão pulmonar. Inicialmente esta fase do experimento objetivou ocorrer no período de quatro semanas, porém, com o desenvolvimento de alterações teciduais após sete e 14 dias de inoculação, foram realizadas necropsias nos demais animais (n=2) ao fim da segunda semana, nos quais também observou-se lesões correspondentes à infecção respiratória.

De todos os animais foi retroisolado *A. fumigatus* do material coletado de trato respiratório e do fígado. Resultados similares foram encontrados por Tell, 2005 que relata em aves, que este micro-organismo tem uma predileção pelo trato respiratório, envolvendo as cavidades nasais, traqueia, siringe, pulmões ou sacos aéreos, mas também pode se difundir e causar a doença sistêmica nas fases posteriores da infecção, acometendo outros órgãos, como o fígado.

Para a segunda etapa do experimento, foram utilizadas duas concentrações diferentes de inóculo, a menor concentração ( $5 \times 10^6$ ) baseou-se em estudo realizado por Tell et al. (2010), já a maior ( $24 \times 10^8$ ) foi definida pela primeira etapa deste experimento, uma vez que esta concentração desenvolveu a doença de forma branda, sem acarretar em morte súbita dos animais, nem sinais clínicos.

Nos animais submetidos à menor concentração do inóculo (grupos 1 e 2) não houve retroisolamento fúngico e nem alterações teciduais macroscópicas em nenhuma necropsia realizada durante os sete dias. Concordando com Taylor & Burroughs (1973), que com inóculo pouco concentrado de *A. flavus* também não demonstraram evidência de patologia. Outro possível responsável pela ausência de infecção nessas aves, é que não foi provocada imunossupressão, conforme é realizado por diversos autores (ARNÉ et al., 2011), uma vez que esta é uma micose oportunista, de maior ocorrência em imunocomprometidos (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Já entre os animais inoculados com a concentração de  $24 \times 10^8$  UFC/mL no volume de 0,5 mL (grupo 3), observou-se lesões anatomopatológicas a partir da segunda necropsia (48h pós inoculação) em apenas um entre os dois animais, que apresentou espessamento de sacos aéreos. O desenvolvimento da micose nos dois animais ocorreu a partir da terceira necropsia (72h pós inoculação), quando observou-se espessamento de sacos aéreos em ambas as aves e presença de um nódulo em saco aéreo torácico de uma. Além de obter-se o retroisolamento fúngico de amostras de trato respiratório e fígado. Todos os demais animais do grupo 3 apresentaram alterações anatomopatológica e retroisolamento fúngico nas necropsias posteriores.

Entre os animais inoculados com a mesma concentração, porém no volume 1,0mL (grupo 4), houve retroisolamento de *A. fumigatus* somente a partir da quinta necropsia (120h pós inoculação). Tal fato não pode ser plenamente elucidado, mas provavelmente tenha ocorrido em função de o volume administrado ser muito alto. Acarretando mal estar dos animais, que acabavam por expelir parte do inóculo, havendo desta forma perda de material.

## **CONCLUSÃO**

Nas condições em que o experimento foi realizado, a concentração adequada para desenvolver aspergilose crônica por *A. fumigatus* foi  $24 \times 10^8$  UFC/mL administrada no volume de 0,5 mL. E o primeiro dia de infecção foi considerado o dia três, 72h após a administração do inóculo.

## REFERENCIAS

ABUNDIS-SANTAMARIA, E., Aspergillosis in birds of prey. 2003. **Disponível em:** [www.aspergillus.man.ac.uk](http://www.aspergillus.man.ac.uk). Consulta em: 15-07-2012.

ARNÉ, P.; Thierry, S.; Wang, D.; Deville, M.; Le Loc'h, G.; Desoutter, A.; Férménia, F.; Nieguitsila, A.; Huang, W.; Chermette, R.; Guillot, J. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. **International Journal of Microbiology**, 2011, p. 1-14

CABANA, A. L.; Xavier, M. O.; Silva-filho, R. P.; Osório, L. G.; Meireles, M. C. A. Diagnóstico precoce de aspergilose em pinguim de magalhães (*spheniscus magellanicus*) pela técnica de imunodifusão – Relato de caso. **In: Anais Congresso Medvop de Especialidades Veterinárias**, Curitiba, 2010

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução Nº 714, DE 20 de junho de 2002

CLSI M38-A2 **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Approved Standard Second Edition. v. 22, n. 16, 2008

CRAY, C.; Watson, T.; Rodriguez, M.; Arheart, K. L. Application Of Galactomannan Analysis And Protein Electrophoresis In The Diagnosis Of Aspergillosis In Avian Species. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, 2009. p. 64–70

FOWLER M. E. **Zoo & Wild Animal Medicine: current therapy 3**. Denver, Colorado: W B Saunders, 1993

FRAN-FISHER, N. B. C. **Micologia: fundamentos e diagnósticos**. Ed. Revinter, 2001. p. 36-53.

KUBITSCHKEK-BARREIRA, P Neves, G.; Curty, N.; Loureiro Y Penha, C.; Lopes-Bezerra, L. Subproteome analysis of *Aspergillus fumigatus* during filamentation. **In: Abstract Book of 4th advances against aspergillosis**, Rome, Italy, 2010

OLIVEIRA, H.P.; Alves, G.E.S.; Rezende, C. M. F. Eutanásia em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Veterinária. **Disponível em:** <http://www.ufmg.br/coep/eutanasia.pdf>. Consulta em 10-07-2012

TAYLOR, John j; Burroughs, Edward J. **EXPERIMENTAL AVIAN ASPERGILLOSIS** *Mycopathologia et ~. [ycologia applicata*, vol. 51, 2 3, pag. 131-141, 1973

TELL LA. Aspergillosis in mammals and birds: **impact on veterinary medicine**. *Med Mycol* 2005; **43** ( Suppl. 1 ): S71 – 73 .

TELL, L. A.; Clemons, K. V.; Kline, Y.; Woods, L.; Kass, P.H.; Martinez, M.; Tevens, D. A. Efficacy of voriconazole in Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, V. 48, 2010. p. 234–244

XAVIER, M.; O.; Soares, M.; P.; Meinerz, A.; R.; M.; Nobre, M.; O.; Osório, L.; G.; Silva-Filho R.; P.; Meireles, M.; C.; A. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 2007. p. 480-484