

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Avaliação epidemiológica da aspergilose em pinguins-de-
Magalhães no Centro de Recuperação de Animais
Marinhos – FURG**

Rodolfo Pinho da Silva Filho

Pelotas, 2012

RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO

**Avaliação epidemiológica da aspergilose em pinguins-de-Magalhães no Centro
de Recuperação de Animais Marinhos – FURG**

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: Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586a Silva Filho, Rodolfo Pinho da
Avaliação epidemiológica da aspergilose em pinguins-de-Magalhães no Centro de Recuperação de Animais Marinhos – FURG / Rodolfo Pinho da Silva Filho. – Pelotas, 2012. – 67f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Veterinária preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2012. - Orientador Mário Carlos Araújo Meireles ; co-orientador Melissa Orzechowski Xavier.

1.Veterinária. 2.Aspergillus. 3.Fatores de risco. 4. Sphenisciformes. 5.Mortalidade. 6.Pinguins-de-Magalhães.
I.Meireles, Mário Carlos Araújo. II.Xavier, Melissa Orzechowski.
III.Título.

CDD: 598.441

Banca examinadora

Profa. Dra. Marlete Brum Cleff – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles – Universidade Federal de Pelotas

Orientador

Agradecimentos

Eternos,

a minha Mãe, que mesmo ausente materialmente, está sempre presente em meus passos,

a minha Mulher Sylvia e minhas filhas, Yéssica e Helena, que, mesmo não participando diretamente, estão ao meu lado nesta, também, loucura,

ao Diretor do Museu Oceanográfico e amigo Lauro Barcellos, por me oportunizar o desenvolvimento deste trabalho no Centro de Recuperação de Animais Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande,

à colega Valéria Ruoppolo, pela insistência na utilização e confecção dos protocolos, utilizados e produzidos no CRAM,

aos meus colegas de Guerra, Andréa Adornes, Paula Canabarro, Roberta Petitet, Pedro Bruno, Vanessa Pedroso, Silvia Gastal e Alice Meirelles, que, sem a dedicação em todos esses anos, tais dados trabalhados não teriam existido,

à nova geração de profissionais, Ralph Vanstreels, Laura Reisfield, Juliana Yuri, etc..., que já estão na ativa com seus esforços e sabedoria,

ao “TIME DOS SONHOS” brasileiro, que possibilita a reabilitação do maior número de animais impactados por óleo, Ana Paula Albano, Angela Cabana Leitzke, Bruna Zafalon da Silva, Laís Guterres, Matheus Alves Teixeira, Melina Martins Ruzzene, Renan Alves Conceição, Thaise Lima Albernaz e Vinícius Alves Teixeira

e aos tantos voluntários do CRAM.

Ao Prof. Dr. Raúl Sassi pelo auxílio essencial para avaliação epidemiológica e análise estatística dos dados.

Ao meu Orientador Mario Meireles e sempre Mestre, pelo apoio e incentivo nesta minha história.

aos colegas do laboratório de micologia.

E, em especial, a minha, inicialmente, voluntária, estagiária, orientada e também orientadora e amiga Aryse Martins

e muito especialmente a minha, inicialmente, voluntária, estagiária, orientada, co-orientada, e agora Co-orientadora neste trabalho, amiga e Dra. Melissa Orzechowski Xavier.

Me considero un rojo sin diminutivos. No soy un rojillo, soy un rojo, un rojazo. Y eso no quiere decir comunista, ni socialista, ni anarquista, quiere representar esa hermosísima ideología de hace unos años, que hacía creer que esta infamia de mundo podía cambiar de alguna manera. (Joaquín Sabina).

Resumo

SILVA-FILHO, Rodolfo Pinho. **Avaliação epidemiológica da aspergilose em pinguins-de-Magalhães no Centro de Recuperação de Animais Marinhos – FURG**. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) trabalha essencialmente com pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) debilitados, com a intenção de reabilitá-los e devolvê-los ao seu habitat natural. No entanto, muitos exemplares recebidos acabam desenvolvendo aspergilose, uma doença fúngica oportunista frequentemente responsável pela morte de aves em cativeiro, associada ao estresse sofrido por estes animais. Neste sentido, este trabalho objetivou realizar um levantamento epidemiológico de seis anos da aspergilose em pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG. Para isso, foi realizado um estudo de coorte retrospectivo a partir de informações coletadas do banco de dados do CRAM-FURG referentes aos pinguins recebidos no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2009. Os animais foram classificados em dois grupos, sendo o grupo “caso” referente a pinguins que morreram por aspergilose, e o grupo “controle” aquele composto por animais que foram liberados ou morreram por outras causas. As variáveis analisadas quanto a fator de risco foram idade, sexo, petrolização, procedência, uso de itraconazol profilático, tempo de cativeiro, peso corpóreo e parâmetros sanguíneos como hematócrito e proteínas plasmáticas totais. Durante esse período o Centro recebeu 366 pinguins de Magalhães, dos quais 39 foram excluídos do estudo por não apresentarem dados disponíveis no banco de dados sobre sua *causa mortis*, resultando num total de 327 animais. Durante o período estudado, 66 pinguins morreram por aspergilose, sendo *Aspergillus fumigatus* o principal agente etiológico encontrado, com 98,5% dos casos. A mortalidade proporcional por aspergilose foi de 48,5% no período de seis anos de estudo, e a densidade de incidência encontrada foi de 7,3 casos de aspergilose/100 pinguins-mês. Aproximadamente 75% dos casos de aspergilose ocorreram em animais procedentes de outros Centros de reabilitação, sendo este considerado um fator de risco para a doença, com risco relativo maior que 3,0. Também foram encontradas diferenças significativas entre os grupos “caso” e “controle” em relação ao tempo de cativeiro, valores de hematócrito e proteínas plasmáticas totais na chegada ao Centro, e ganho de peso durante o período de cativeiro. Os achados deste estudo demonstram a interferência negativa da aspergilose na reabilitação de pinguins-de-Magalhães, com alta densidade de incidência, e responsável por importante mortalidade destes animais.

Palavras-chave: *Aspergillus*, fatores de risco, Sphenisciformes, mortalidade.

Abstract

SILVA-FILHO, Rodolfo Pinho da. **Epidemiological survey of aspergillosis in Magellanic penguins at the Centro de Recuperação de Animais Marinhos – FURG.** 2012. 67f. Dissertation (Master's degree) - Veterinary Postgraduate Education Program. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) is a rehabilitation center that works essentially with debilitated Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*), aiming to rehabilitate and release them to their natural habitat. However, several of the received penguins develop aspergillosis, an opportunistic fungal disease frequently responsible for the death of captive birds, often in association with the stress experienced by these animals in captivity. This study aimed to examine a six-year period for cases of aspergillosis in Magellanic penguins undergoing rehabilitation at CRAM-FURG. For that purpose, a retrospective cohort study was conducted using the institution's records of Magellanic penguins received from January 2004 to December 2009. Animals were classified in two groups: the "case" group included animals that died from aspergillosis, the "control" group included animals that survived and were released or those that died from conditions unassociated with aspergillosis. Variables examined as potential risk factors were age group, gender, oil fouling, precedence, prophylactic administration of itraconazole, time in captivity until death or release, body mass, and hematological parameters such as hematocrit and total plasmatic proteins. During this period, the institution received 366 Magellanic penguins, of which 39 were excluded from the analyses due to the insufficiency of data on their cause of death, thus 327 animals were studied. During the studied period, 66 penguins died of aspergillosis. *Aspergillus fumigatus* was the most frequent etiological agent (98.5%). Relative mortality by aspergillosis was 48.5% during the examined period, and the density of incidence was 7.3 lethal aspergillosis cases per 100 penguins-month. Approximately 75% of the aspergillosis cases occurred in animals received through transfers from other rehabilitation centers, and this was considered a significant risk factor for the disease, with a relative risk of greater than 3.0. Significant differences were also observed between the case and control groups in regards to their time in captivity until death, their hematocrit and total plasmatic proteins upon admission to the center, and their body mass change during the period in captivity. The findings demonstrate the negative impacts of aspergillosis on the rehabilitation of Magellanic penguins, with a high density of incidence and important mortality of these animals.

Key-words: *Aspergillus*, risk factors, Sphenisciformes, mortality.

Lista de Figuras

Figura 1-	Distribuição das áreas reprodutivas de Sphenisciformes ao longo da Terra, evidenciando, em vermelho, a presença desses animais somente no hemisfério Sul, entretanto não especificamente restritos ao gelo.....	18
Figura 2-	Colônia reprodutiva de pinguins-de-Magalhães em Camarones - Argentina, demonstrando ninhos em forma de tocas.....	20
Figura 3-	Exemplar adulto de anchoita (<i>Engraulis anchoita</i>), principal alimento dos pinguins-de-Magalhães.....	21
Figura 4-	Navio cargueiro Treasure, encalhado na Cidade do Cabo, África do Sul, em 2000, demonstrando o perigo que acidentes com embarcações de grande porte pode trazer para o meio ambiente.....	22
Figura 5-	Vista aérea do Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG), Rio Grande.....	23
Figura 6-	a) Colônias de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> demonstrando distintas características morfológicas de acordo com a espécie. b) Estrutura de esporulação unisseriada de <i>A. fumigatus</i> demonstrando células conidiogênicas distribuídas no terço superior da vesícula piriforme (seta).....	25

Figura 7-	Aspergilose em pinguins-de-Magalhães A) Lesões granulomatosas na siringe, formando massa que obstrui parcialmente a passagem de ar; B) Espessamento dos sacos aéreos, contendo colônias fúngicas; C) Parênquima pulmonar com múltiplos nódulos e focos de necrose; D) Múltiplos nódulos coalescentes, resultando em massas na glândula adrenal.....	27
Figura 8-	Desinfecção geral de rotina realizada semanalmente no Centro de Recuperação de Animais Marinhos, com digluconato de clorexidine a 20%.....	30
Figura 9-	Diferença morfológica entre pinguim-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) juvenil (A), com penas acizentadas no dorso, nadadeiras e face; e adulto (B), com penas de padrão anelar preto e branco bem definidas.....	34
Figura 10-	Avaliação macroscópica das gônadas, destacadas pelas setas, de pinguins-de-Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) utilizada para sexagem necroscópica (a) seta indicando ovário (fêmea), (b) setas indicando testículos (macho).....	34
Figura 11-	Representação das medidas corpóreas utilizadas para sexagem <i>in vivo</i> de pinguins-de-Magalhães no Centro de Recuperação de Animais Marinhos.....	35
Figura 12-	Acomodação dos pinguins-de-Magalhães procedentes de outros Centros do Brasil para encaminhamento ao CRAM-FURG por transporte aéreo (A) e terrestre (B).....	36
Figura 13 -	Manutenção dos pinguins-de-Magalhães em reabilitação na área interna no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG).....	37

Figura14-	Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães recebidos pelo CRAM-FURG e incluídos no estudo durante o período de seis anos (01/2004-12/2009).....	38
Figura 15-	Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães machos e fêmeas recebidos pelo CRAM-FURG, entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, de acordo com a idade do animal (Juvenil ou Adulto) (χ^2 ; $p < 0,05$).....	39
Figura 16-	Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães com e sem petrolização recebidos pelo no CRAM-FURG entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, de acordo com a procedência (Outros Centros ou Praia) dos animais.....	40
Figura 17-	Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães com e sem petrolização recebidos pelo CRAM-FURG entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, em relação a idade (Juvenil ou Adulto). (χ^2 ; $p < 0,0001$).....	41
Figura 18-	Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães machos e fêmeas recebidos pelo CRAM-FURG entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009 submetidos ou não ao tratamento profilático com itraconazol (χ^2 ; $p < 0,0001$)...	41
Figura 19-	Mortalidade proporcional de pinguins-de-Magalhães decorrente da infecção por <i>Aspergillus</i> spp. no CRAM-FURG, entre os anos de 2004 e 2009.....	42
Figura 20-	Densidade de incidência de casos de aspergilose/100 pinguins-de-Magalhães-ano no CRAM-FURG, entre 2004 e 2009.....	45

Figura 21-	Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães “casos” e “controles” do CRAM-FURG, entre 01/ 2004 e 12/2009, em relação as variáveis categóricas: a) Idade (Juvenil ou Adulto); b) Procedência (Outros Centros ou Praia); c) Petrolização (Sim ou Não); d) Itraconazol (Sim ou Não).....	45
Figura 22-	Média e IC de 95% do tempo de cativeiro total (dias) dos pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p=0,003$).....	47
Figura 23-	Média e IC de 95% de proteína plasmática total na chegada dos pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p=0,004$).....	47
Figura 24-	Média e IC de 95% do hematócrito na chegada dos pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p=0,01$).....	48
Figura 25-	Média e IC de 95% do ganho de peso dos pinguins-de-Magalhães durante o período de reabilitação no CRAM-FURG, entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p< 0,0001$).....	48

Lista de tabelas

Tabela 1-	Variáveis categóricas como fator de risco/proteção para a aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre o período de 01/2004 e 12/2009.....	44
Tabela 2-	Resultado da análise multivariada das variáveis categóricas ajustadas entre si em relação ao risco de aspergilose em pinguins-de-Magalhães recebidos pelo CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009.....	46

Lista de abreviaturas e siglas

CRAM - Centro de Recuperação de Animais Marinhos

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

Ht - Hematócrito

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IDGA – Imunodifusão em gel de agar

IUCN – Internacional Union for Conservation of Nature

NEMA - Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental

PPT - Proteínas Plasmáticas Totais

TRI – Trato Respiratório Inferior

Sumário

1 Introdução Geral.....	15
2 Objetivo Geral.....	17
2.1 Objetivos Específicos.....	17
3 Revisão de Literatura.....	18
3.1 Pinguins-de-Magalhães.....	18
3.2 Reabilitação de pinguins afetados por petróleo e derivados.....	21
3.3 <i>Aspergillus</i> spp.....	23
3.4 Aspergilose em pinguins em reabilitação.....	25
3.4.1 Sintomatologia e apresentação clínica em aves.....	26
3.4.2 Diagnóstico.....	28
3.4.3 Prevenção e tratamento da aspergilose.....	29
4 Materiais e Métodos.....	32
4.1 Local de estudo.....	32
4.2 Delineamento do estudo.....	32
4.3 Critérios de inclusão e de exclusão.....	32
4.4 Classificação dos grupos “casos” e “controles”.....	33
4.5 Variáveis analisadas.....	33
4.6 Análise estatística.....	37
5 Resultados.....	38
5.1 Análise descritiva da população de pinguins-de-Magalhães recebida pelo CRAM-FURG no período do estudo.....	38
5.2 Medidas de frequência e análise descritiva da aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG.....	42
5.3 Fatores de risco para aspergilose em pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG.....	43
6 Discussão.....	49

7 Conclusões.....	58
8 Considerações finais.....	59
9 Referências Bibliográficas.....	61

1 Introdução Geral

Anualmente, durante o inverno no hemisfério Sul, é comum a ocorrência de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) na costa brasileira, desde o extremo sul do Brasil até o norte do Rio de Janeiro, podendo ser avistados alguns indivíduos até Fortaleza. Tais aves chegam até o litoral brasileiro, seguindo a corrente fria das Malvinas, que traz cardumes de anchoíta (*Engraulis anchoita*), um dos principais alimentos desses pinguins (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

Durante esse período de migração, alguns espécimes acabam entrando em contato com um sério problema dos oceanos, a poluição crônica por óleo. Essa poluição se baseia em manchas órfãs de petróleo e seus derivados, que se encontram em alto mar devido a pequenos vazamentos de tanques de embarcações, limpeza de tanques de navios, vazamentos em áreas de exploração de petróleo ou mesmo devido a água de lastro com restos de óleo. Os pinguins, por serem aves não voadoras e nadarem lentamente se caracterizam como as aves mais afetadas pela poluição por petróleo e derivados (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006).

O contato destes animais com o óleo culmina com prejuízo na impermeabilidade das penas em decorrência da desorganização das mesmas, o que permite que a água fria entre em contato com sua pele, causando hipotermia. Como consequência, o animal busca sair da água deixando de se alimentar, o que ocasiona desnutrição e desidratação, já que a sua hidratação é obtida através do alimento. Quanto maior o tempo decorrido para o resgate desses animais para reabilitação, pior o seu prognóstico, aumentando as chances de óbito (MASSEY, 2006; TSENG, 1993).

Todos os anos, inúmeros destes animais contaminados por petróleo, além de animais enfermos ou perdidos do grupo, em sua maioria juvenis, são encaminhados para o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) (RUOPPOLO et al., 2004). Durante a reabilitação existem problemas secundários que surgem devido ao cativeiro como, por exemplo, as doenças oportunistas. Dentre estas, destaca-se a aspergilose, que é uma das enfermidades mais comuns em pinguins de cativeiro, sendo responsável por altas taxas de mortalidade destes animais durante a reabilitação. O ambiente quente, para manter os animais aquecidos, e úmido, devido a limpeza constante do local, proporciona um cenário ideal para multiplicação do fungo, que, associada a debilidade do animal e a imunossupressão causada principalmente pelo estresse de cativeiro, torna os pinguins mais suscetíveis a infecção por *Aspergillus* spp. (OILED WILDLIFE CARE NETWORK, 2000; RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

A aspergilose pode ser causada por diversas espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto, a espécie mais patogênica e responsável pela maioria dos casos clínicos é *A. fumigatus* (REDIG, 2005). Os sinais clínicos da aspergilose não são específicos, podendo o animal apresentar letargia, anorexia, inapetência, dispnéia, dentre outros, sendo o diagnóstico clínico dificultado. Por isso, para um diagnóstico presuntivo, se faz necessária a realização de exames laboratoriais, e o diagnóstico definitivo geralmente é realizado somente por exames *post-mortem* (TELL, 2005).

Os inúmeros óbitos por aspergilose de pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG, evidenciam a necessidade de fazer um levantamento dos dados epidemiológicos locais e de, principalmente, buscar fatores de risco associados, a fim de direcionar medidas profiláticas específicas a animais mais suscetíveis ao desencadeamento da doença, com o intuito de diminuir os óbitos causados por esta enfermidade.

2 Objetivo Geral

Realizar um levantamento epidemiológico de janeiro de 2004 a dezembro de 2009 da aspergilose em pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a densidade de incidência da aspergilose em pinguins em reabilitação no CRAM-FURG;
- Determinar a mortalidade proporcional por aspergilose em pinguins em reabilitação no CRAM-FURG;
- Determinar os principais fatores de risco para aspergilose em pinguins em reabilitação no CRAM-FURG;
- Identificar o agente etiológico da doença.

3 Revisão de Literatura

3.1 Pinguins-de-Magalhães

Os pinguins são aves marinhas não voadoras, pertencentes a ordem Sphenisciformes, distribuídas em seis gêneros, totalizando 18 espécies. São exclusivas do hemisfério Sul, porém não restritas ao gelo (Fig. 1), existindo apenas duas espécies, Pinguim-imperador (*Aptenodytes forsteri*) e Pinguim-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*), que possuem reprodução restrita a Antártica (IUCN, 2011; WILLIAMS, 1995).

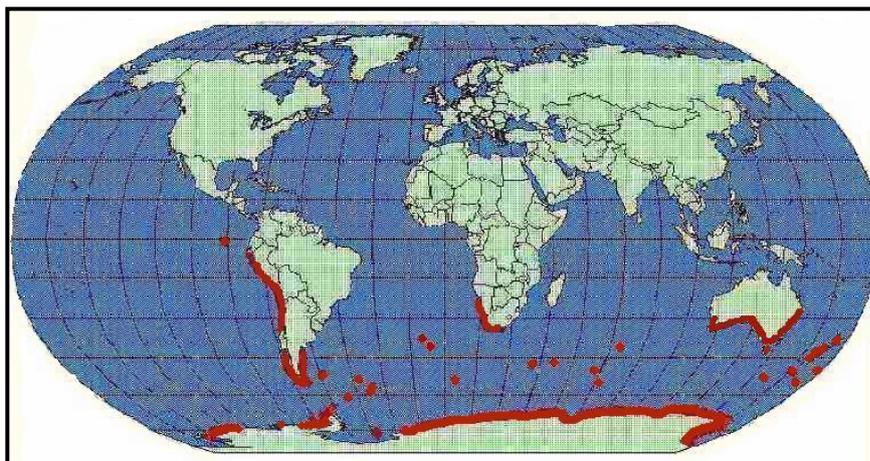


Figura 1- Distribuição das áreas reprodutivas de Sphenisciformes ao longo da Terra, evidenciando, em vermelho, a presença desses animais somente no hemisfério Sul, entretanto não especificamente restritos ao gelo.

Fonte: Internacional Union for Conservation of Nature - IUCN, 2011.

Os pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) distribuem-se na costa Atlântica e Pacífica da América do Sul, e suas colônias estão localizadas desde a Terra do Fogo, até 29°S na costa Pacífica e 42°S na costa Atlântica, incluindo as Ilhas Falklands (Malvinas) (BOERSMA et al. 1990).

Os pinguins-de-Magalhães apresentam moderado dimorfismo sexual, sendo os machos 5% a 15% maiores que as fêmeas. Em geral, essa espécie pode chegar a 70 cm de altura, e em média 4 Kg. Possuem corpo fusiforme, com pescoço e membros curtos, e diferentemente das outras aves, possuem ossos densos e não pneumáticos. Penas curtas, e em grande densidade, distribuídas ininterruptamente pelo corpo, e sempre organizadas, formam uma fina camada de ar entre a superfície do corpo e a pele, impedindo que a água entre em contato com a pele do animal (FOWLER; FOWLER, 2001; WALKER; BOERSMA; WINGFIELD, 2004; WILLIAMS, 1995).

No período de reprodução, que se estende de outubro a março, os pinguins-de-Magalhães permanecem em terra firme, para nidificação (Fig. 2). Essas aves tendem a monogamia, e cada fêmea pode colocar até dois ovos por período reprodutivo, sendo o cuidado parental compartilhado entre fêmeas e machos até o filhote se tornar juvenil é (BOERSMA et al., 1990; YORIO et al., 2001).



Figura 2- Colônia reprodutiva de pinguins-de-Magalhães em Camarones - Argentina, demonstrando ninhos em forma de tocas.

Após o período reprodutivo, os animais fazem a muda de penas, saindo das colônias no fim deste processo. Entre os meses de abril e setembro, tornam-se pelágicos, migrando rumo a latitudes menores, seguindo correntes frias, ricas em

alimento, podendo ser avistados na costa Atlântica até o Rio de Janeiro, sendo que há diversos relatos de observação dessas aves até Fortaleza (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006; WILLIAMS, 1995).

Pinguins-de-Magalhães são predadores generalistas, se alimentando de peixes, cefalópodes, crustáceos, conforme sua disponibilidade no ambiente. Cada indivíduo ingere diariamente uma quantia de pescado correspondente a 10-20% da sua massa corpórea, sendo anchoita, um dos principais alimentos dessas aves (Fig. 3) (CRISSEY et al., 2002; FOWLER; FOWLER, 2001; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

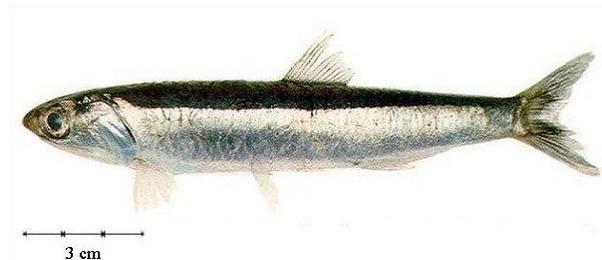


Figura 3 - Exemplar adulto de anchoita (*Engraulis anchoita*), principal alimento dos pinguins-de-Magalhães.

Fonte: Lauro Saint Pastous Madureira

De acordo com a lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais - IUCN) (2011), o pinguim-de-Magalhães é considerado quase ameaçado de extinção, estimando-se uma população de 1.300.000 pares. Autores afirmam que, enquanto algumas colônias tem aumentado o número de pares reprodutivos, como em Caleta Valdéz, outras vem demonstrando um decréscimo no número destes pares, como em Punta Tombo, uma das maiores colônias de pinguins-de-Magalhães na Argentina, ou ainda nas ilhas Falklands (Malvinas), onde foi registrado um decréscimo de 76% da sua população total, em um período de 12 anos (BINGHAM, 2002; GANDINI; FRERE; BOERSMA, 1996; SCHIAVINI et al., 2005).

Pode-se listar como ameaças a esta espécie de pinguins, a poluição crônica dos oceanos, derramamentos e operações ilegais envolvendo óleo, intensa atividade pesqueira, as mudanças climáticas, aumento do número de embarcações, principalmente em rotas migratórias, ou próximo a colônias, e turismo em regiões de colônias. Dentre as ameaças naturais, temos os principais predadores dessa espécie, destacando-se skuas, gaivotas, ratos, canídeos, como predadores de ovos, e leões marinhos, orcas e focas como predadores de juvenis e adultos (BOERSMA, 2008; GANDINI et al., 1994; GANDINI; FRERE; BOERSMA, 1996; SCHIAVINI et al., 2005; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

3.2 Reabilitação de pinguins afetados por petróleo e derivados

A poluição dos oceanos por petróleo e derivados, é uma das principais causas de morte de pinguins-de-Magalhães. Essa ave é a mais afetada por não voar, e passar grande parte da vida no mar. Estima-se que 42.000 espécimes de pinguins-de-Magalhães morram por ano na costa Argentina, atingidos pela poluição crônica por hidrocarbonetos (GANDINI et al., 1994; GARCIA-BORBOROGLU et al., 2008; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

Além da poluição crônica, representada por manchas órfãs de óleos nos oceanos de todo o planeta, outra ameaça consiste nos acidentes com navios de grande porte, sejam petroleiros ou não, e acidentes em locais de extração de petróleo. Estes tipos de acidentes são considerados desastres ambientais, e podem ser responsáveis por dizimar populações ou até mesmo espécies endêmicas (GARCIA-BORBOROGLU 2008; HEREDIA et al., 2008). A exemplo dessa ameaça, pode-se citar o acidente ocorrido com o navio cargueiro *Treasure*, encalhado na Cidade do Cabo, África do Sul, em 2000, nessa ocasião, mais de 20 mil pinguins africanos (*Spheniscus demersus*) foram afetados diretamente, e outros 20 mil tiveram que ser retirados de sua colônia reprodutiva pelo risco iminente desta ser atingida pela mancha formada (Fig. 4) (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2008).



Figura 4- Navio cargueiro Treasure, encalhado na Cidade do Cabo, África do Sul, em 2000, demonstrando o perigo que acidentes com embarcações de grande porte pode trazer para o meio ambiente.

Diante da necessidade de amenizar o problema causado pelo óleo sobre a macro fauna, diversos estudos tem sido realizados em busca das melhores técnicas para que se obtenha maior sucesso na reabilitação de fauna atingida por hidrocarbonetos. Na América do Sul são conhecidos 25 grupos que trabalham com reabilitação de fauna petrolizada (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006).

No sul do Rio Grande de Sul, na cidade do Rio Grande, está localizado o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) ($32^{\circ} 1' 3374''S$; $52^{\circ} 06' 21.01'' O$) (Fig. 5), associado ao Museu Oceanográfico, da Universidade Federal do Rio Grande (MOFURG). O CRAM-FURG é um Centro especializado em reabilitação de fauna petrolizada, atuando nesta área desde 1996, data de sua construção, embora o recebimento de fauna petrolizada ocorra desde 1974 no Museu Oceanográfico (RUOPPOLO et al., 2004). Além de reabilitação, o CRAM-FURG também tem como função a capacitação de pessoal para atender em casos de emergências com animais petrolizados, e atuar em projetos de educação ambiental, com a comunidade em geral, além de colégios e faculdades da região.



Figura 5- Vista aérea do Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG), Rio Grande.

O CRAM-FURG segue protocolos internacionais de reabilitação, baseado em técnicas comprovadamente eficazes, que garantem o sucesso na reabilitação de pinguins petrolizados. Esse protocolo estabelece como etapas importantes: exame físico, clínico e triagem, estabilização, banho e enxágue, recuperação da impermeabilidade de plumagem, exame pré liberação e liberação (OILED WILDLIFE CARE NETWORK, 2000; RUOPPOLO et al., 2004, TSENG, 1993).

Embora o processo de reabilitação seja realizado seguindo rígidos protocolos com maximização de medidas para a manutenção da sanidade dos animais e para obtenção do maior número de animais liberados, problemas secundários, associados ao cativeiro e a outros fatores, como a própria debilidade e imunossupressão do animal e/ou a petrolização do mesmo, são relativamente comuns, e culminam com o insucesso na recuperação e liberação de pinguins. Dentre estes problemas encontram-se os de caráter metabólicos e principalmente os infecciosos, com destaque a infecção por fungos do gênero *Aspergillus* (OILED WILDLIFE CARE NETWORK, 2000; RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; TSENG, 1993).

3.3 *Aspergillus* spp.

Aspergillus spp., agente etiológico da aspergilose, está classificado como pertencente à sub- divisão *Ascomycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família

Moniliaceae. Compreende cerca de 300 espécies, das quais 20 são consideradas patogênicas ao homem e aos animais. *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans*, são descritos como agentes etiológicos da aspergilose, entretanto *A. fumigatus* é responsável por 95% dos casos de aspergilose em aves (LACAZ et al., 2002; TELL, 2005).

Fungos desse gênero são distribuídos mundialmente, podendo ser encontrados em diferentes locais, como superfícies inanimadas, água, solo, ar, alimentos e plantas. São ubíquos e anemófilos, possuindo capacidade de produzir inúmeras enzimas e com isso assimilar nutrientes a partir dos mais variados substratos, suprindo facilmente sua necessidade nutricional (RAPER; FENNELL, 1965).

O gênero *Aspergillus* caracteriza-se por formar colônias filamentosas de crescimento rápido, que possuem variações quanto a coloração, textura, diâmetro, presença de esclerócios, exsudato e pigmento solúvel de acordo com a espécie (Fig. 6a). As estruturas vegetativas deste gênero constituem-se de hifas hialinas e septadas, medindo aproximadamente 4µm de espessura, as quais se bifurcam em ângulo de 45°. A estrutura de frutificação é formada por um conidióforo com uma célula pé e uma dilatação no ápice chamada de vesícula. Em espécies bisseriadas, como *A. niger* e *A. terreus*, as métulas se projetam da vesícula sustentando as células conidiogênicas denominadas fiálides, enquanto que nas espécies unisseriadas, as fiálides são originadas diretamente da vesícula, como ocorre no *A. fumigatus* (Fig. 6b). Milhares de conídios de reduzido tamanho são produzidos diariamente pelas fiálides e liberados ao ambiente, sendo facilmente veiculados pelo ar e inalados pelos indivíduos, correspondendo ao propágulo fúngico infectante (ABARCA, 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002; RAPER; FENNELL, 1965; SIDRIM; ROCHA, 2004).

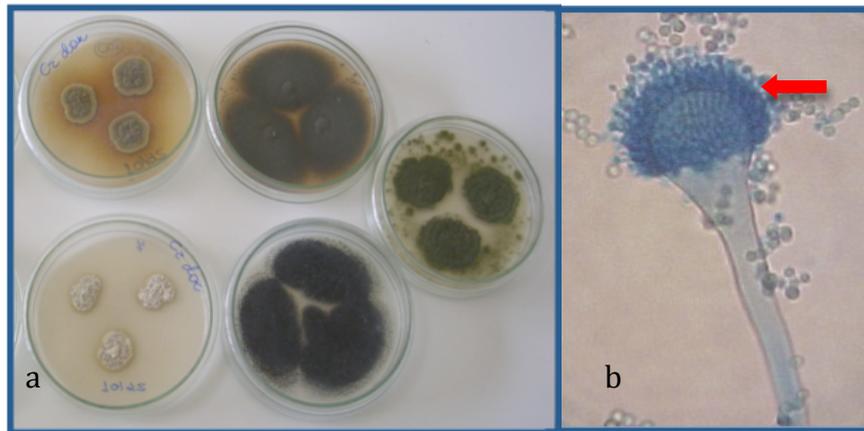


Figura 6 - a) Colônias de fungos do gênero *Aspergillus* demonstrando distintas características morfológicas de acordo com a espécie. b) Estrutura de esporulação unisseriada de *A. fumigatus* demonstrando células conidiogênicas distribuídas no terço superior da vesícula piriforme (seta).

Fatores físico-estruturais e metabólicos conferem às espécies de *Aspergillus*, diferentes níveis de patogenicidade. *A. fumigatus* é considerada a espécie mais patogênica do gênero por apresentar a maior taxa de crescimento dentre as demais espécies do gênero, possuir os menores conídios, com cerca de 2 a 3µm de diâmetro, resistir e se multiplicar em altas temperaturas e ter alta taxa de germinação dos conídios à temperatura corporal do hospedeiro (LATGÉ, 1999).

3.4 Aspergilose em pinguins em reabilitação

A aspergilose é uma enfermidade infecciosa, porém não contagiosa, não sendo transmitida de indivíduo para indivíduo. Os esporos de *Aspergillus spp.*, denominados conídios, estão dispersos no ambiente, e seu reduzido tamanho permite sua penetração até o trato respiratório inferior (TRI), principal sistema acometido pela doença. *Aspergillus spp.* pode colonizar o pulmão, e a germinação dos conídios com consequente formação de hifas permite a invasão tecidual. Muitas vezes, ocorre disseminação hematogênica ou por contiguidade para outros órgãos, geralmente culminando na morte do indivíduo infectado (FRIEND, 1999).

Além da diferença entre aves e mamíferos na imunidade inata e adquirida contra esse patógeno, as características anatômicas das aves, como a ausência de

epiglote a qual dificulta a penetração de partículas no trato respiratório, a ausência de diafragma o que inviabiliza a expulsão de partículas do TRI pelo reflexo de tosse, e a limitada camada de células ciliadas pseudoestratificadas no trato respiratório superior que servem como barreira mecânica, fazem com que as aves sejam mais suscetíveis a infecção por *Aspergillus* spp. do que os mamíferos (TELL, 2005). Em adição, a presença de sacos aéreos, promove um habitat ideal para que os conídios fúngicos infectantes consigam germinar e iniciar o processo de invasão tecidual, isto porque estas estruturas são providas de oxigênio e secreções respiratórias, que servem de substrato para o microrganismo, e ainda apresentam pouca vascularização, dificultando o aporte de células de defesa para o local infectado (TELL, 2005).

Essas características associadas ao processo de reabilitação fazem com que os pinguins em centros de recuperação sejam comumente acometidos por esta infecção fúngica, tendo como agravantes o estresse causado por manejo e pela migração, quadros de desidratação, desnutrição, traumatismos e intoxicação por petróleo, que contribuem para a imunossupressão (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). Conseqüentemente, cerca de 50% das mortes de pinguins em cativeiro são causadas pela aspergilose, o que caracteriza essa doença como de extrema importância, trazendo prejuízos ecológicos e financeiros para instituições, como zoológicos, aquários e centros de reabilitação (FOWLER; FOWLER, 2001; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

3.4.1 Sintomatologia e apresentação clínica em aves

A aspergilose pode se manifestar de forma aguda, quando o indivíduo é exposto a inóculos fúngicos de alta concentração, com quantidade massiva de conídios, os quais colonizam e invadem um órgão vital. Nestes casos a doença tem um curso rápido, normalmente inferior a uma semana, com possibilidade de morte aguda em 24h, sem aparecimento de sintomas. Outra apresentação clínica da doença é a forma crônica, a qual é mais comumente encontrada e se caracteriza pelo desencadeamento de granulomas no trato respiratório, com possibilidade de disseminação fúngica para órgãos adjacentes, com um curso que pode durar de semanas a meses até o óbito do

indivíduo (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BAUCK, 1994; KEARNS; LOUDIS, 2003; MARTINÉZ; CERECERO; CERVANTES, 2000).

No que diz respeito a localização, a aspergilose pode apresentar lesões em um único órgão ou disseminadas. Embora a forma localizada com presença de granulomas, ou acúmulo de secreções e restos necróticos, seja comumente observada na região da siringe, podendo levar a obstrução parcial ou total da via aérea, a forma disseminada ocorre na maioria dos casos de aspergilose em pinguins e culmina com a formação de trombos vasculares contendo hifas fúngicas que se disseminam via hematogênica, comprometendo além dos sacos aéreos e pulmões, trato gastrointestinal, vísceras abdominais, fígado e serosa (Fig. 7). Mais raramente, podem haver lesões cerebrais, oculares e cutâneas (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004; KEARNS; LOUDIS, 2003; REDIG, 1993).

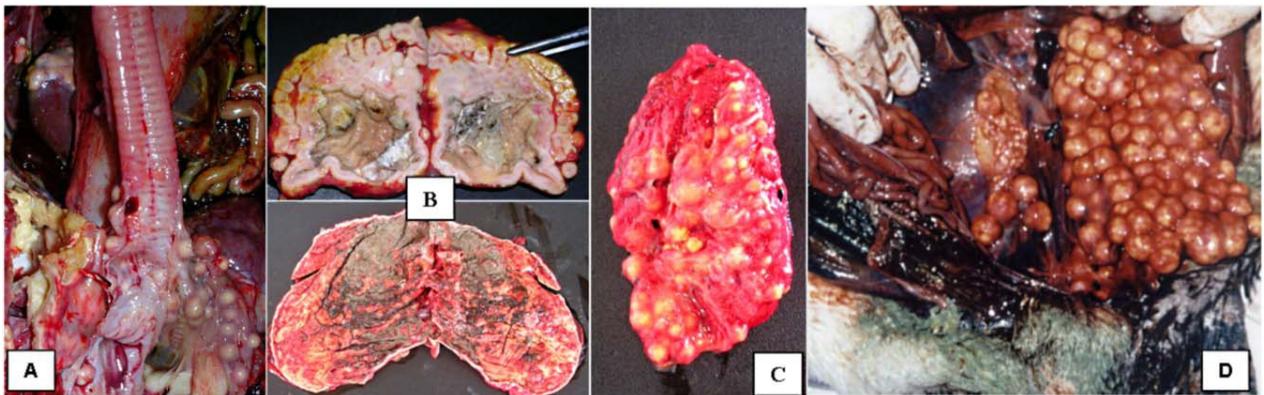


Figura 7- Aspergilose em pinguins-de-Magalhães A) Lesões granulomatosas na siringe, formando massa que obstrui parcialmente a passagem de ar; B) Espessamento dos sacos aéreos, contendo colônias fúngicas; C) Parênquima pulmonar com múltiplos nódulos e focos de necrose; D) Múltiplos nódulos coalescentes, resultando em massas na glândula adrenal.

Fonte: Xavier et al. 2011.

Em casos de envolvimento localizado do trato respiratório os principais sinais clínicos da aspergilose são apatia, dispnéia, ruídos respiratórios, alteração na vocalização e emaciação. Na aspergilose disseminada, os sinais mais comuns são redução gradual da função respiratória, plumagem eriçada, apatia e anorexia, além dos anteriormente citados. No entanto, em pinguins, é comum a ocorrência de morte súbita,

sem haver evidência prévia de sinais respiratórios ou sistêmicos específicos (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004; KEARNS; LOUDIS, 2003; REDIG, 1993).

Em casos com acometimento cerebral, os sinais clínicos constituem-se de ataxia e torcicolo. Casos de envolvimento cutâneo são evidenciados por dermatite necrótica granulomatosa; e em lesões oculares, geralmente há desenvolvimento de ceratite unilateral, com fotofobia, secreção purulenta, blefaroespasma e edema periorbital e palpebral (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003; MARTINÉZ; CERECERO; CERVANTES, 2000; TELL, 2005).

3.4.2 Diagnóstico

Considerando que, em muitos casos, um pinguim com aspergilose não apresenta sinais clínicos ou os demonstra tardiamente, o diagnóstico *in vivo* desta enfermidade é difícil de ser realizado. Exames rotineiros de hematologia e bioquímica, embora possam complementar exames radiográficos, não são suficientes para determinar o diagnóstico definitivo de aspergilose. Por outro lado, a endoscopia do TRI é uma alternativa viável que permite a visualização de lesões tipicamente fúngicas ou até mesmo de colônias fúngicas em sacos aéreos; entretanto é um método muito invasivo, o qual é contra indicado para aves debilitadas, especialmente por exigir que o animal esteja anestesiado. A citologia associada a exames microbiológicos de amostras respiratórias constitui uma alternativa diagnóstica importante, embora também seja de baixa sensibilidade e especificidade, necessitando de cuidado na interpretação dos resultados tendo em vista a alta taxa de falso-positivos e de falso-negativos (JONES; OROSZ, 2000; CRAY, 2012; REDIG, 1993).

Neste sentido, estudos vem sendo realizados na busca de métodos diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade, e que permitam a detecção da aspergilose em pinguins em estágio precoce. Os métodos mais promissores se baseiam em exames sorológicos com detecção de anticorpos ou de antígeno específicos, a partir de técnicas como imunodifusão radial dupla em gel de agar (IDGA) e ELISA. A IDGA é um teste qualitativo, ou semiquantitativo, que não oferece restrições

quanto a espécie, entretanto sua sensibilidade é limitada, por exigir alta concentração de anticorpos necessária para formar uma linha de precipitação visível que determina um resultado positivo. O teste de ELISA possui sensibilidade e especificidade mais elevada que a IDGA, entretanto sua utilização é restrita a espécies as quais um reagente secundário está disponível e se trata de uma técnica trabalhosa e não padronizada (JONES; OROSZ, 2000; CRAY 2012).

A detecção sérica de epítomos antigênicos de fungos do gênero *Aspergillus* também é uma alternativa promissora. Comercialmente encontra-se disponível um kit baseado na técnica de ELISA sanduíche, reativo para β -(1-5)-galactofuranose, indicado para diagnóstico precoce de aspergilose invasiva em humanos neutropênicos a partir da detecção de galactomanana circulante. A galactomanana é o principal componente da parede celular fúngica que é liberado durante o crescimento das hifas no tecido do hospedeiro, podendo ser detectada no sangue em caso de doença invasiva. Tendo em vista que indivíduos imunossuprimidos raramente produzem anticorpos para *Aspergillus spp.*, o teste de detecção de antígeno torna-se potencialmente promissor para o diagnóstico da aspergilose em pinguins em reabilitação, no entanto, este teste ainda não está validado para uso em animais (JONES; OROSZ, 2000; CRAY, 2012). Testes de biologia molecular também tem sido citados como futuras alternativas promissoras, no entanto, estudos comprovando a sua aplicabilidade para o diagnóstico de aspergilose ainda são muito escassos (CRAY, 2012).

Considerando que nenhum dos métodos citados acima apresenta resultados satisfatórios no diagnóstico da aspergilose em aves, a necropsia ainda segue sendo considerada o padrão-ouro, sendo o diagnóstico de certeza confirmado por achados de lesões típicas, associadas ao isolamento de *Aspergillus spp.* em cultivo de amostras tissulares, e à detecção de estruturas vegetativas típicas do fungo em exames micológicos diretos e histopatológicos (FRIEND, 1999).

3.4.3 Prevenção e tratamento da aspergilose

A dificuldade na confirmação *in vivo* do diagnóstico da aspergilose em pinguins, aliada as altas taxas de mortalidade em decorrência desta micose, torna, de extrema

necessidade, a adoção de medidas preventivas em locais de cativeiro destas aves marinhas. No intuito de evitar o acúmulo de matéria orgânica, e conseqüentemente de diminuir a proliferação de conídios e o aporte dos mesmos aos animais, medidas eficazes de higienização e desinfecção do ambiente devem ser adotadas, e o mesmo deve ser mantido bem ventilado e com temperatura controlada (CORK et al., 1999; REDIG, 1993; XAVIER et al., 2008).

Para desinfecção desses ambientes, o enilconazol é bastante utilizado e possui uma boa eficiência, além do digluconato de clorexidina (20%), o qual é indicado para programas de desinfecção de cativeiros de aves por ser atóxico, e possuir atividade comprovada contra *Aspergillus* spp. (Fig. 8). A qualidade do ar também deve ser monitorada frequentemente, a fim de avaliar a concentração de propágulos fúngicos aos quais as aves estão expostas (MORRIS et al., 2000; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; XAVIER et al., 2008).



Figura 8- Desinfecção geral de rotina realizada semanalmente no Centro de Recuperação de Animais Marinhos, com digluconato de clorexidine a 20%.

Essencialmente, deve-se ainda preconizar a diminuição de estresse e alimentação correta dos pinguins em reabilitação buscando a redução do risco dos indivíduos de contrair a doença. Em protocolos de reabilitação de aves, a administração de itraconazol profilático, na dose de 15 mg/Kg durante 15 dias, é aconselhada para

animais com peso abaixo do ideal o que varia de acordo com cada espécie. No caso de pinguins-de-Magalhães, o peso limite estabelecido no CRAM-FURG, é 2.500g. A vacinação é outra medida de prevenção que vem sendo estudada, porém com resultados contraditórios na literatura (BUNTING et al., 2009; GRACZYK; CRANFIELD, 1995; REDIG, 2005; RICHARD; PEDEN; SACKS, 1991; OILD WILDLIFE CARE NETWORK, 2000).

Para o tratamento, em casos de aspergilose localizada, é indicada a remoção cirúrgica do aspergiloma associada a administração de antifúngicos sistêmicos. Entretanto esta intervenção tem alto risco e, geralmente, relação custo-benefício negativa. Em casos de aspergilose disseminada, o tratamento é realizado somente com terapia antifúngica sistêmica. A anfotericina B é um antifúngico que vem sendo utilizado no tratamento da aspergilose, podendo ser administrado através de nebulização, via intratraqueal, ou endovenosa. Por ser rapidamente metabolizada e eliminada em aves, seus efeitos tóxicos são menores quando comparados aos efeitos em mamíferos. Cetoconazol, itraconazol, terbinafina e voriconazol são fármacos utilizados para administração oral, sendo o itraconazol, o fármaco de eleição, acessível e com poucos efeitos colaterais e reações adversas. O voriconazol é um fármaco de última geração, com resultados recentes muito satisfatórios no tratamento da aspergilose em aves, entretanto seu custo é muito alto, sendo sua utilização complicada, principalmente quando se trata de uma grande quantidade de animais, como é o caso de pinguins em reabilitação (DI SOMMA et al., 2007; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003).

Embora a literatura apresente relatos de cura clínica com uso de distintos antifúngicos, o prognóstico da aspergilose em pinguins é sempre desfavorável, especialmente devido a dificuldade de diagnóstico precoce, o que culmina com ineficácia terapêutica na maioria dos casos. Por este motivo, a prevenção ainda é o melhor caminho a ser seguido.

4 Materiais e Métodos

4.1 Local de estudo

O estudo foi realizado no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM), anexo ao Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de Carvalho Rios, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Esse centro é referência em reabilitação de animais marinhos no Brasil, com ênfase em fauna petrolizada, e possui uma equipe multidisciplinar formada por profissionais e voluntários de distintas áreas, como medicina veterinária, biologia e oceanologia.

Todos os anos, principalmente durante o inverno, o CRAM recebe dezenas e até centenas de pinguins-de-Magalhães para reabilitação e armazena um banco de dados com informações, como origem, peso corpóreo, idade, petrolização, avaliação hematológica, dentre outros, de todos os animais recebidos.

4.2 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo a partir de informações referentes a um período de seis anos, coletadas no banco de dados do CRAM-FURG.

4.3 Critérios de inclusão e de exclusão

Foram incluídos no estudo todos os pinguins-de-Magalhães recebidos para reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos entre janeiro de 2004 e dezembro 2009. Animais que foram a óbito e não tiveram sua ficha de necropsia anexada a ficha individual, não dispendo de dados sobre a *causa mortis* foram

excluídos do estudo descritivo e das análises de risco para aspergilose por não preencherem os critérios necessários para sua categorização como casos ou controles.

4.4 Classificação dos grupos “casos” e “controles”

Foram classificados como “casos” os animais que durante o período de reabilitação no CRAM-FURG foram a óbito, seja por morte natural, ou eutanásia, e cujos exames *post-mortem* confirmaram o diagnóstico de aspergilose. Essa confirmação foi baseada na característica das lesões macroscópicas observadas durante a necropsia, como presença de colônias e/ou de placas fúngicas nos tecidos ou ainda de granulomas branco-amarelados, associada a demonstração de hifas hialinas, septadas e bifurcadas em ângulo agudo nos tecidos lesionados por exame direto e/ou histopatológico, e ao isolamento de fungos do gênero *Aspergillus* no cultivo micológico de fragmentos tissulares em agar Sabouraud dextrose. E o grupo “controle” consistiu de animais reabilitados e liberados, e pinguins que morreram durante a reabilitação por outras causas infecciosas ou não infecciosas, como caquexia, desnutrição, intoxicação por petróleo, traumas, infecção bacteriana e outras injúrias.

4.5 Variáveis analisadas

Para determinação dos fatores de risco para aspergilose, foram analisadas variáveis categóricas como idade, gênero, petrolização, uso de itraconazol profilático e procedência; e quantitativas como, peso corpóreo, tempo de cativeiro e dados hematológicos, como proteínas plasmáticas totais e hematócrito.

A idade dos animais foi determinada de forma categórica, de acordo com Williams (1995), classificando os animais em juvenis ou adultos, conforme a coloração das penas. Os pinguins juvenis (<1 ano de idade) foram aqueles recebidos com plumagem de cor acinzentada nas costas, nadadeiras e na face; enquanto que aqueles com padrão de penas anelar preto e branco, característico dos *Spheniscus*, foram considerados animais adultos (acima de 1 ano de idade) (Fig. 9) (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

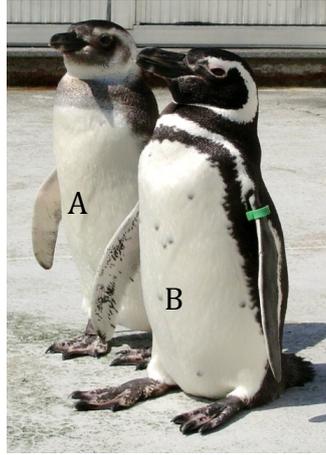


Figura 9- Diferença morfológica entre pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) juvenil (A), com penas acizentadas no dorso, nadadeiras e face; e adulto (B), com penas de padrão anelar preto e branco bem definidas.

Animais que foram a óbito foram sexados em exame *post mortem*, através da verificação macroscópica das gônadas (Fig. 10). Para animais vivos, as medidas corpóreas de comprimento do bico, altura do bico, comprimento da nadadeira a articulação úmero-radio ulnar (cotovelo) e comprimento da pata foram utilizadas para a realização da sexagem morfométrica (Fig. 11), através das funções descritas por Vanstreels et al. (2011). O sexo foi considerado indeterminado para os 20% dos animais cujos escores discriminantes eram mais próximos de zero, conforme recomendado por Brennan et al. (1991).

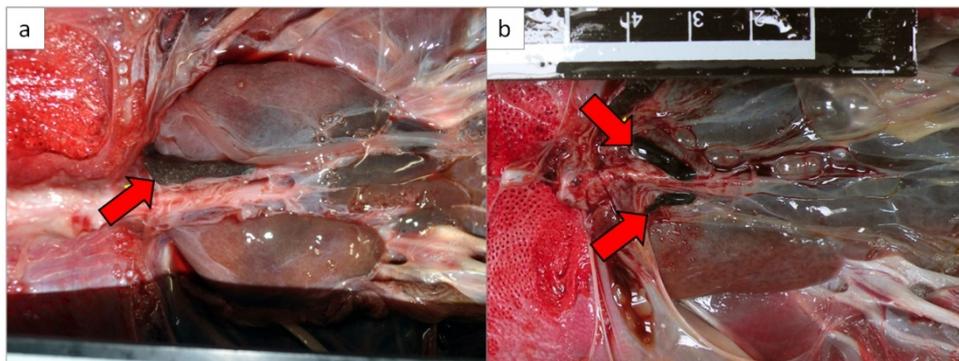


Figura 10- Avaliação macroscópica das gônadas, destacadas de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) utilizada para sexagem necroscópica (a) seta indicando ovário (fêmea), (b) setas indicando testículos (macho).

Fonte: Ralph Eric Thijl Vanstreels / LAPCOM-FMVZ-USP

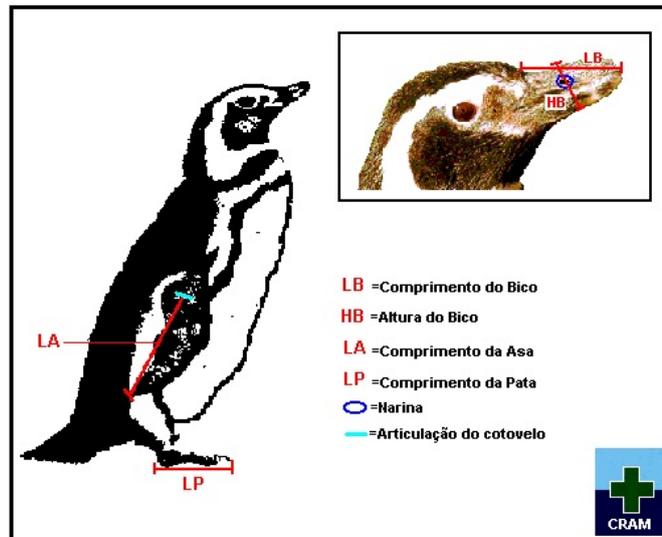


Figura 11- Representação das medidas corpóreas utilizadas para sexagem *in vivo* de pinguins-de-Magalhães no Centro de Recuperação de Animais Marinhos.

Outra variável analisada foi a procedência da ave, sendo categorizada em praia, ou outros Centros. Os pinguins procedentes de praia foram aqueles animais encontrados nas praias do litoral sul do Rio Grande do Sul, pela população, ou através de monitoramentos rotineiros feitos por parceiros, como laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental (NEMA), e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio); enquanto que os animais classificados como procedentes de outros Centros, foram aqueles resgatados e recebidos por outros Centros de recuperação, os quais iniciaram o tratamento de reabilitação, encaminhando posteriormente os animais ao CRAM-FURG, através de transporte aéreo, para término da reabilitação e liberação (Fig. 12).



Figura 12- Acomodação dos pinguins-de-Magalhães procedentes de outros Centros do Brasil para encaminhamento ao CRAM-FURG por transporte aéreo (A) e terrestre (B).

A contaminação por petróleo e derivados e o uso de itraconazol profilático foram também analisadas como variáveis categóricas (sim/não), sendo a petrolização determinada no momento do recebimento do animal pelo CRAM-FURG.

Peso, em gramas, e parâmetros sanguíneos, avaliados através do Hematócrito (Ht) e das Proteínas plasmáticas totais (PPT) dos pinguins também foram analisados nos diferentes grupos como variáveis quantitativas. O peso foi avaliado considerando o seu valor no dia da chegada do animal ao CRAM-FURG, enquanto que para avaliação de Ht e PPT foram considerados os valores obtidos na segunda semana de cativeiro dos animais, após estabilização, no sentido de evitar um viés em função da hemoconcentração frequentemente encontrada em decorrência de desidratação (animais procedentes de praia) ou de liberação adrenérgica relacionada ao estresse (animais vindos de outros Centros, após transporte aéreo). O parâmetro de ganho de peso durante o cativeiro foi paralelamente avaliado a partir da diferença entre os valores de chegada e de saída (morte ou liberação) do animal do Centro.

O período de permanência total em cativeiro (dias), também foi levado em consideração. Este período total incluiu um tempo de permanência em área interna para tratamento e estabilização, onde os animais foram aquecidos com lâmpadas de 200 watts, sendo mantidos em grades de 120cm de comprimento por 65cm de largura, e 60cm de altura, no chão, forrado de jornal (Fig. 13); e posteriormente em área

externa de pré liberação, composta por uma área seca de 48 metros quadrados, com acesso a um tanque de 180 mil litros abastecido com água captada do estuário.



Figura 13- Manutenção dos pinguins-de-Magalhães em reabilitação na área interna no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG).

4.6 Análise estatística

Ao final do levantamento e compilação dos dados, análise descritiva com teste de frequência foi realizada. Densidade de incidência, mortalidade proporcional e fatores de risco para aspergilose em pinguins no CRAM-FURG foram calculadas com auxílio do programa SPSS® 20.0. Foram utilizados cálculo de Risco Relativo (RR), Teste de T para variáveis quantitativas e Teste de Qui-Quadrado para variáveis categóricas, bem como Regressão binária logística para análise multifatorial e cálculo de *Odds Ratio*. Como nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Análise descritiva da população de pinguins-de-Magalhães recebida pelo CRAM-FURG no período do estudo

Entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG) recebeu 366 pinguins-de-Magalhães, dos quais 191 foram liberados, correspondendo a uma taxa de reabilitação de 52,2%. Deste total de 366 animais, 39 foram excluídos do estudo por não apresentarem informações disponíveis no banco de dados sobre a *causa mortis*, resultando em um total de 327 animais estudados (Fig. 14).

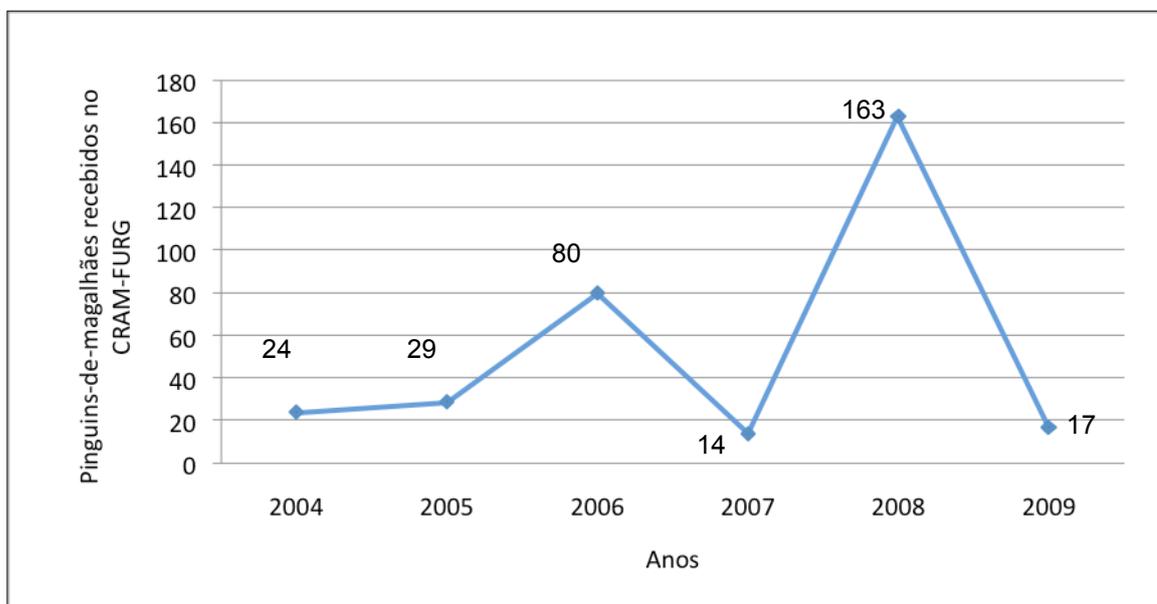


Figura 14- Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães recebidos pelo CRAM-FURG e incluídos no estudo durante o período de seis anos (01/2004-12/2009).

A grande maioria (85,3%) destes animais era juvenil, com somente 48 exemplares (14,7%) representando o grupo dos adultos. Dentre os indivíduos sexados, 132 eram machos e 128 fêmeas, sendo que o grupo de animais adultos foi composto principalmente (66,7%) por fêmeas, diferindo significativamente (c^2 ; $p=0,018$) dos juvenis, que tiveram 53,8% de representatividade de machos (Fig. 15).

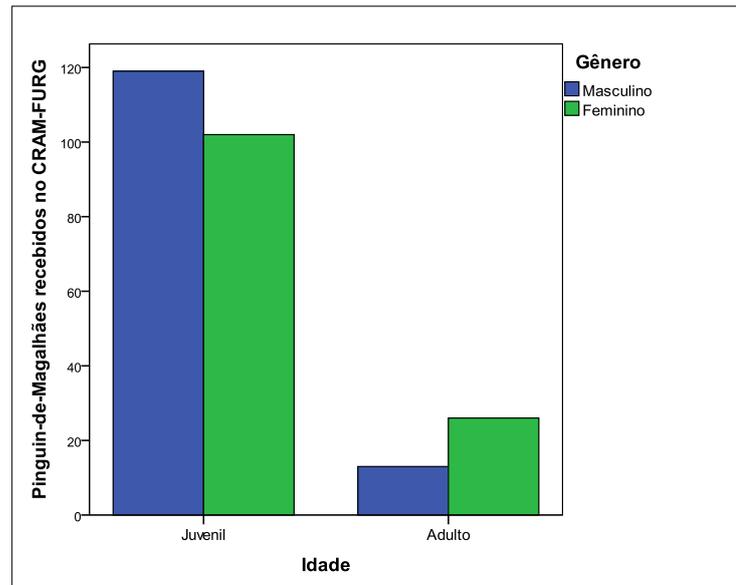


Figura 15- Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães machos e fêmeas recebidos pelo CRAM-FURG, entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, de acordo com a idade do animal (Juvenil ou Adulto) (c^2 ; $p<0,05$).

A avaliação destes pinguins na chegada ao CRAM-FURG revelou uma média de peso dos animais de 2.791g, variando de 1.574g a 4.866g (+/- 547,7). Pinguins machos tiveram peso médio significativamente maior que fêmeas, com valores de 2.900g e 2.545g, respectivamente (c^2 ; $p<0,0001$). A média de proteínas plasmáticas totais (PPT) e de hematócrito na chegada dos animais ao CRAM-FURG foi 6,82 g/dL (+/- 1,37) e de 39,8% (+/- 6,8), respectivamente, com valores variando de 2 a 10 g/dL e de 11 a 56%.

Observou-se que 46,7% dos animais recebidos no CRAM-FURG, foram procedentes de outros Centros de reabilitação do país, sendo submetidos a transporte por via aérea. Destes, 99,4% (154/155) eram juvenis (c^2 ; $p<0,0001$) e nenhum apresentou sinal de petrolização. Em contrapartida, os 131 animais petrolizados,

correspondendo a 40,1% da população estudada, pertenciam ao grupo de animais oriundos de praia, representando cerca de 80% deste grupo (131/171; χ^2 ; $p < 0,0001$)(Fig. 16).

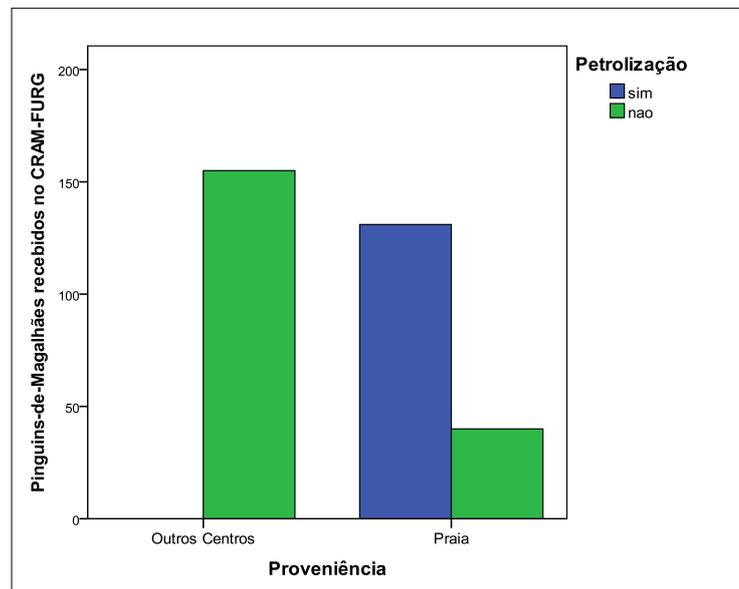


Figura 16- Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães com e sem petrolização recebidos pelo no CRAM-FURG entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, de acordo com a procedência (Outros Centros ou Praia) dos animais.

A frequência de animais petrolizados foi similar entre machos e fêmeas (47% x 39,4%; χ^2 ; $p = 0,217$), no entanto diferiu em relação a idade, alcançando valores próximos a 90% em indivíduos adultos e a 30% em juvenis (χ^2 ; $p < 0,0001$) (Fig. 17).

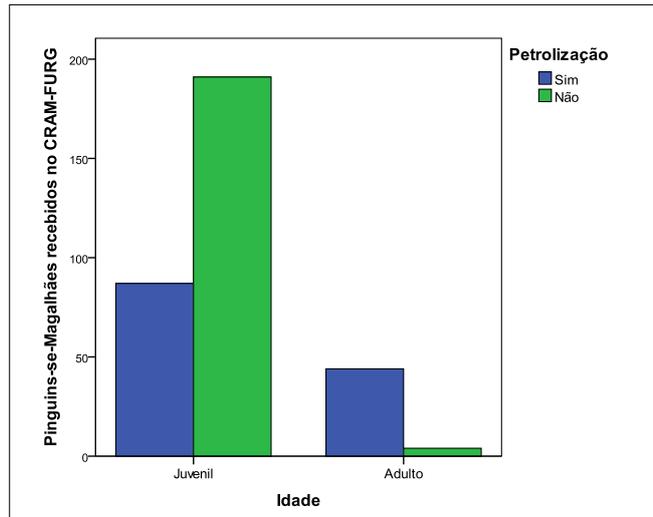


Figura 17- Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães com e sem petrolização recebidos pelo CRAM-FURG entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009, em relação a idade (Juvenil ou Adulto). (c^2 ; $p < 0,0001$).

O uso profilático do itraconazol, indicado no CRAM-FURG para animais com peso inferior a 2.500g. foi realizado em 21,4% (70/327) dos pinguins-de-Magalhães recebidos. Destes, cerca de 70% (48/70) eram fêmeas (c^2 ; $p < 0,0001$) (Fig. 18).

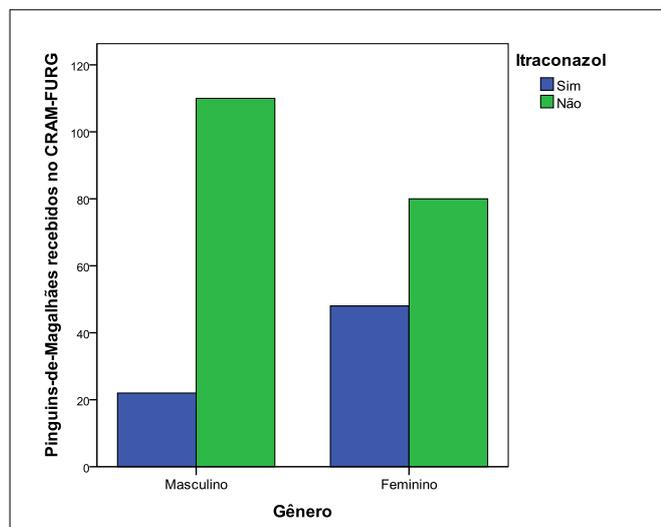


Figura 18- Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães machos e fêmeas recebidos pelo CRAM-FURG entre janeiro de 2004 e dezembro de 2009 submetidos ou não ao tratamento profilático com itraconazol (c^2 ; $p < 0,0001$).

5.2 Medidas de frequência e análise descritiva da aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG

Do total de 327 pinguins-de-Magalhães incluídos no estudo, 66 animais desenvolveram aspergilose no CRAM-FURG durante o processo de reabilitação, sendo *Aspergillus fumigatus* o agente etiológico predominante, identificado em todos os casos, exceto em um ocasionado por *A. flavus*.

Cerca de 75% dos casos de aspergilose (50/66) ocorreram em animais procedentes de outros Centros do país e conseqüentemente submetidos a transporte aéreo, 77,3% (51/66) ocorreram em animais não petrolizados, e 84,8% dos casos (56/66) em animais sem uso de terapia antifúngica profilática. A maioria dos casos foi encontrada em pinguins juvenis, correspondendo a 63 dos 66 casos (95,5%), e a distribuição dos mesmos quanto ao gênero foi similar, com 56,2% (36/66) em machos e 43,8% (28/66) em fêmeas.

Nos anos de 2005 e 2007 nenhum caso de aspergilose foi diagnosticado em pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG, sendo o maior número de casos da doença (45/66) de ocorrência no ano de 2008, representando 68,2% dos casos. Anualmente, a mortalidade proporcional por aspergilose variou de 0 a 100% (Fig. 19), resultando em um valor de 48,5% no total dos seis anos do estudo.

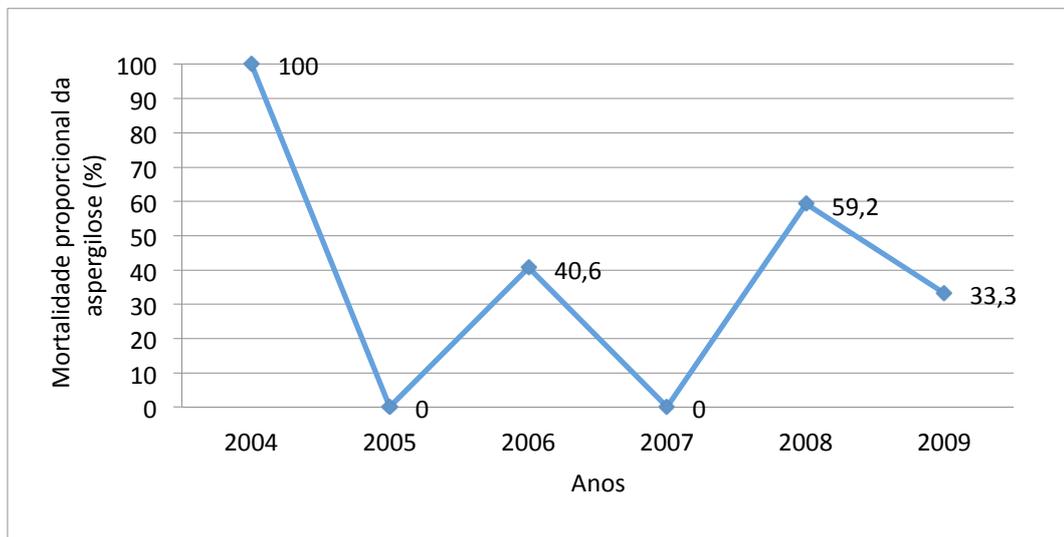


Figura 19- Mortalidade proporcional de pinguins-de-Magalhães decorrente da infecção por *Aspergillus* spp. no CRAM-FURG, entre os anos de 2004 e 2009.

Considerando o período de cativeiro de todos os pinguins incluídos no estudo como período de risco para aspergilose, a densidade de incidência encontrada foi de 7,3 casos/100 pinguins-mês. Tendo em vista que a maioria dos animais não permaneceu durante um ano no CRAM-FURG, a densidade de incidência por ano foi calculada de forma aproximada, utilizando como denominador a população em risco na metade do período. Neste caso, obtiveram-se valores de densidade de incidência variando de 0 a 32 casos de aspergilose/100 pinguins-ano de seguimento (Fig. 20).

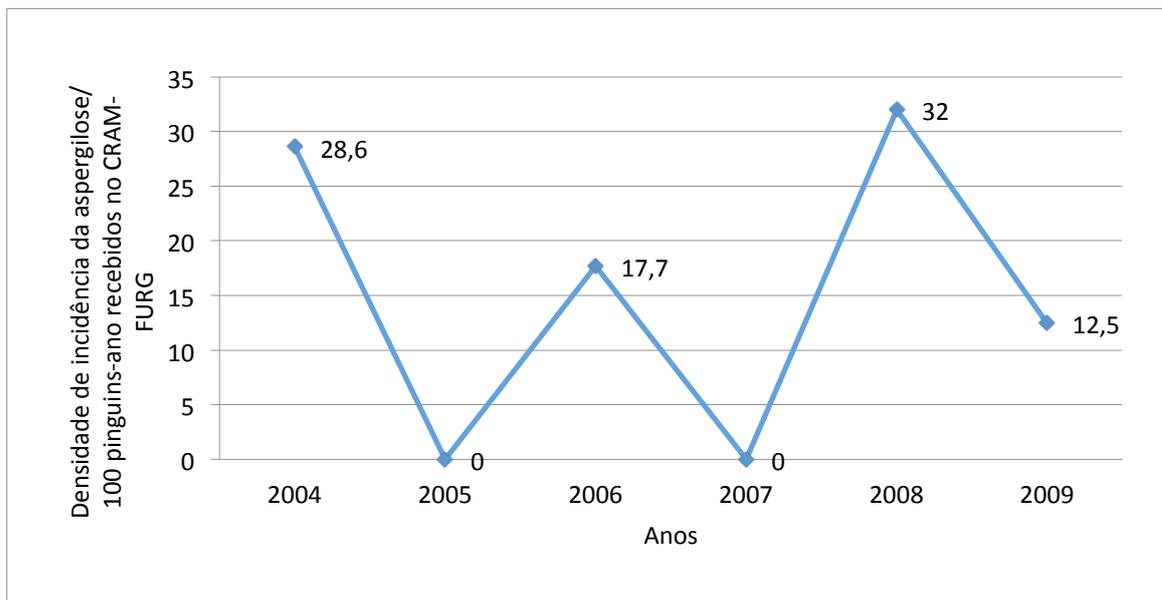


Figura 20- Densidade de incidência de casos de aspergilose/100 pinguins-de-Magalhães-ano no CRAM-FURG, entre 2004 e 2009.

5.3 Fatores de risco para aspergilose em pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG

Em relação a idade, 22,6% (63/249) dos animais juvenis desenvolveram aspergilose, enquanto que em adultos este valor foi reduzido para 6,2% (3/48). De forma similar, a doença ocorreu em 32,3% (50/155) dos animais oriundos de outros Centros e em somente 9,3% (16/172) dos pinguins procedentes de praia. Em contrapartida, 11,5% dos pinguins contaminados por petróleo desenvolveram a doença, e 26,2% dos não petrolizados morreram de aspergilose, sendo a ocorrência da doença 2,3 vezes menor em animais petrolizados. Similarmente, o grupo de pinguins que

recebeu itraconazol profilático teve 1,8 vezes menos exemplares com aspergilose em relação aos sem profilaxia antifúngica (12,2% e 22,9%, respectivamente) (Fig.21).

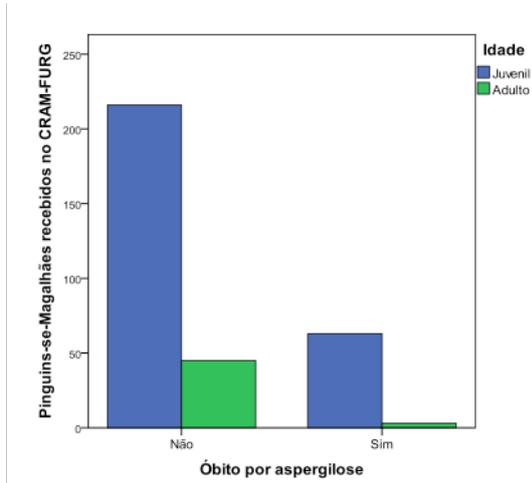
Considerando todas estas variáveis categóricas (idade, gênero, procedência, petrolização e uso de itraconazol profilático) analisadas isoladamente, somente o gênero não demonstrou ser um fator de risco/proteção para aspergilose. As demais variáveis resultaram em valores de p menores que 0,05 quando comparadas entre os grupos “caso” e “controle” (Tab. 1).

Tabela 1 Variáveis categóricas como fator de risco/proteção para a aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre o período de 01/2004 e 12/2009.

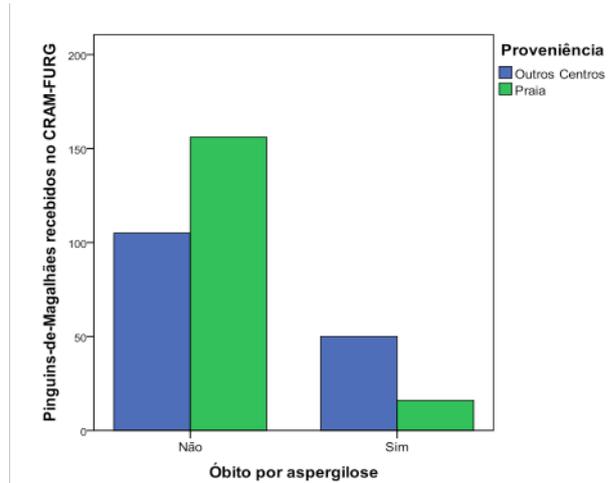
Variável	Valor de p (Teste de qui-quadrado)	Risco relativo	Intervalo de confiança de 95%
Idade	0,009	3,613*	1,182 – 11,040
Gênero	0,312	1,247	0,811 – 1,916
Procedência	<0,0001	3,468**	2,063 – 5,829
Petrolização	0,001	0,438***	0,257 – 0,745
Uso de itraconazol	0,037	0,534****	0,286 - 0,996

*Grupo de referência: juvenis. **Grupo de referência: outros Centros de reabilitação;

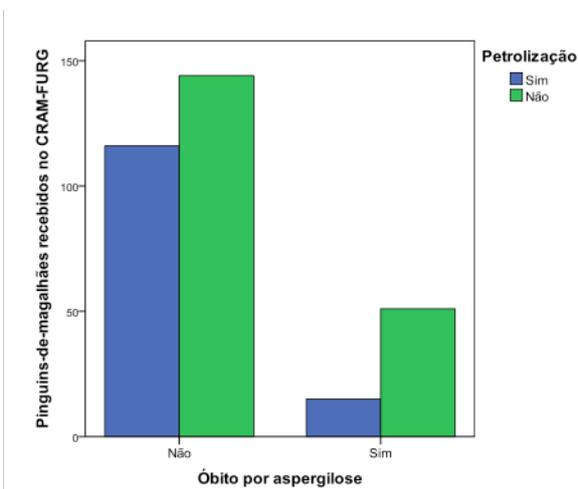
Grupo de referência: animais petrolizados. *Grupo de referência: animais com uso de profilaxia antifúngica.



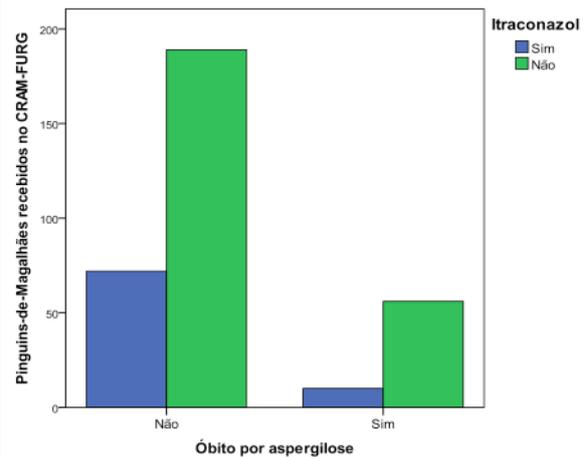
a



b



c



d

Figura 21- Número de exemplares de pinguins-de-Magalhães “casos” e “controles” do CRAM-FURG, entre 01/ 2004 e 12/2009, em relação as variáveis categóricas: a) Idade (Juvenil ou Adulto); b) Procedência (Outros Centros ou Praia); c) Petrolização (Sim ou Não); d) Itraconazol (Sim ou Não).

Embora as variáveis categóricas “idade”, “petrolização”, “uso de itraconazol” e “procedência” tenham se mostrado significativas quando avaliadas isoladamente em relação ao risco de aspergilose por pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG, a análise multivariada demonstrou que estas perdem a significância quando ajustadas entre si, permanecendo somente a “procedência” como fator de risco para a doença, com $p < 0,05$ (Tab. 2). A qualidade do ajuste do modelo foi comprovada pelo Teste de Hosmer-Lemeshow, que resultou em um $p = 0,246$.

Tabela 2 Resultado da análise multivariada das variáveis categóricas ajustadas entre si em relação ao risco de aspergilose em pinguins-de-Magalhães recebidos pelo CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009.

Variáveis	Valor de p Ajustado	Razão de Odds Bruto (IC 95%)	Razão de Odds Ajustado (IC 95%)
Idade (juvenil)	0,16	4,37 (1,31-14,55)	2,57 (0,69 - 9,53)
Procedência (outros Centros)	0,006	4,64 (2,51 – 8,59)	16,67 (2,22 - 125,44)
Petrolização (Sim)	0,08	0,36 (0,19 – 0,68)	6,41 (0,81 - 50,97)
Itraconazol (Sim)	0,31	0,47 (0,23 – 0,97)	0,67 (0,30 – 1,46)
Teste de Regressão Binária Logística	<0,0001		

Nas variáveis quantitativas, diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo de animais que desenvolveu aspergilose e o grupo controle foi observada em relação ao tempo de cativeiro total dos pinguins no CRAM-FURG com valores médios de 51,7 dias (+/- 76,8) e 91,25 dias (+/- 97,05), respectivamente, (teste T, $p = 0,003$) (Fig. 22); aos valores de proteínas plasmáticas totais, com valores médios de 7,3 g/dL (+/- 1,3) e 6,7g/dL (+/- 1,4) , respectivamente (Fig. 23); de hematócrito, com valores médios de 37,5% (+/- 6,4) e 40,3% (+/- 6,8), respectivamente (Fig. 24); e de ganho de peso durante o cativeiro, com valores médios de 127,9g (+/- 525,3) e 864,4g (+/- 736,1), respectivamente (Fig. 25). Em contrapartida, a média de peso de chegada dos animais no CRAM-FURG não teve diferença entre o grupo de animais com e sem aspergilose, valores médios de 2.856,6g (+/- 472,2), e 2.775,1g (+/- 563,6), respectivamente (teste T, $p = 0,25$).

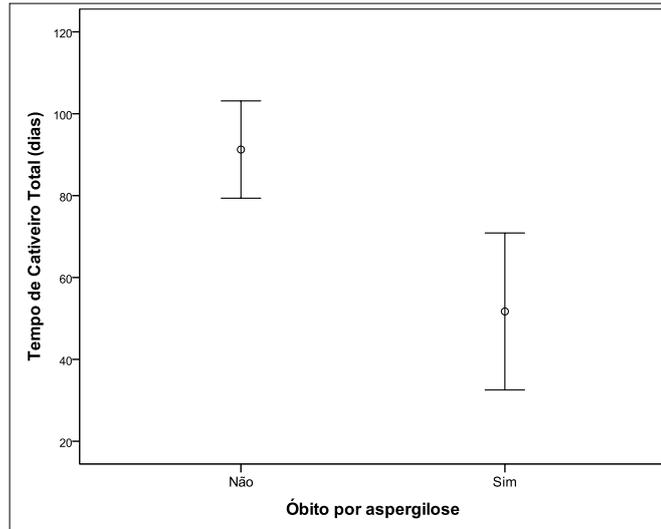


Figura 22- Média e IC de 95% do tempo de cativeiro total (dias) dos pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p=0,003$).

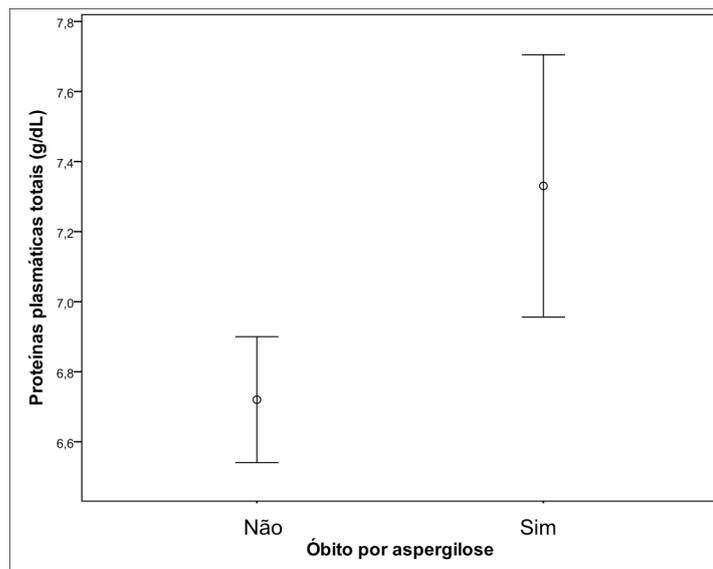


Figura 23- Média e IC de 95% de proteína plasmática total na chegada dos pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p=0,004$).

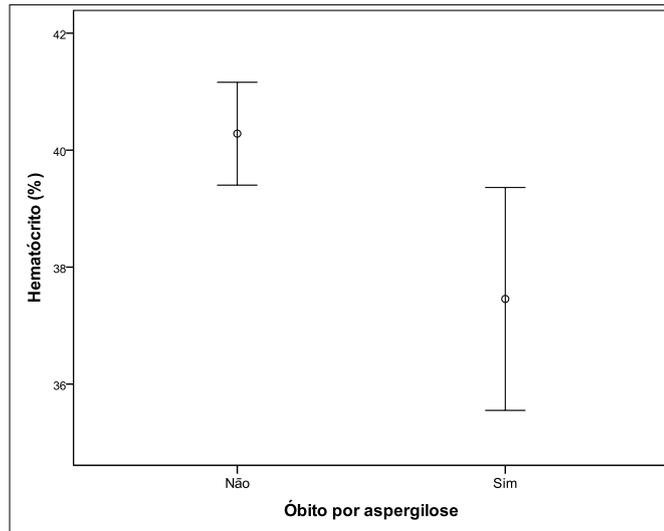


Figura 24- Média e IC de 95% do hematócrito na chegada dos pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p=0,01$).

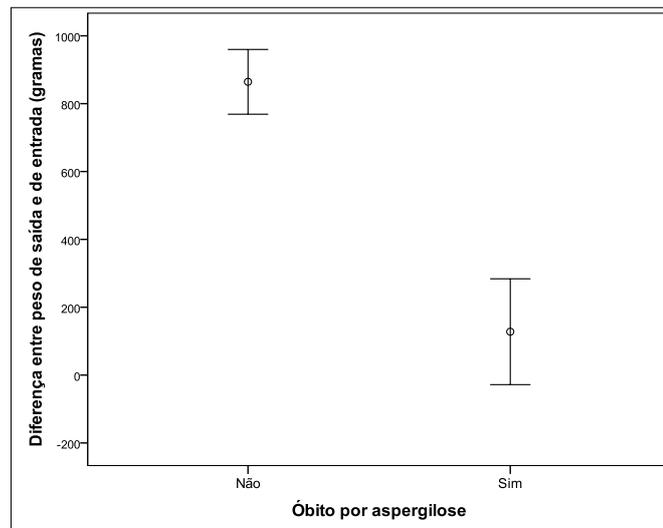


Figura 25- Média e IC de 95% do ganho de peso dos pinguins-de-Magalhães durante o período de reabilitação no CRAM-FURG, entre 01/2004 e 12/2009, de acordo com o desfecho (óbito ou não óbito por aspergilose) (teste T, $p < 0,0001$).

6 Discussão

Este estudo de coorte retrospectiva avaliou dados epidemiológicos da aspergilose referentes a pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG durante um período de seis anos, incluindo 327 animais. Embora a aspergilose seja descrita por inúmeros autores como um dos principais problemas encontrados em pinguins em cativeiro, seja em zoológicos, aquários ou Centros de reabilitação (AINSWORTH; REWELL, 1949; CARRASCO et al, 2001; RUSSEL; HOLCOMB, BERKNER, 2003; XAVIER et a., 2007), estudos similares não estão disponíveis na literatura, a qual é rica neste tema em artigos de relatos de caso e séries de casos enfocando dados clínicos, microbiológicos e histopatológicos (CACCIUTTOLO et al., 2009; CARRASCO et al., 2001; MARTINÉZ; CERECERO; CERVANTES, 2000; SEVERO et al., 1997; TELL, 2005;) bem como em estudos relacionados a diagnóstico (CRAY et al., 2009; CRAY, 2012; GERMAN et al., 2002; JONES; OROSZ, 2000), tratamento (BECHERT et al., 2010; Di SOMMA et al., 2007; HINES; SHARKEY; FRIDAY, 1990) e prevenção da enfermidade (BUNTING et al., 2009; COOK, 1985; RIORDAN; Mc CUNE; BERG, 1986; XAVIER et al., 2008).

Em relação a população de animais incluída no presente estudo, pode-se observar uma grande oscilação na densidade populacional no CRAM-FURG de acordo com o ano de avaliação, variando de 14 a 163 pinguins. Esta diferença no número de animais recebidos por ano para reabilitação ocorre por fatores ainda pouco compreendidos, e acredita-se que fatores climáticos como a Oscilação Sul El Niño, flutuações e mudanças progressivas na disponibilidade de alimento e na ocorrência de impactos humanos possam estar envolvidos (BOERSMA, 2008; GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2006). Esta oscilação vem sendo observada desde o início das

atividades de reabilitação pelo CRAM-FURG, há cerca de 15 anos, assim como em outros Centros que atuam nesta área, como por exemplo Mundo Marino, na Argentina e Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) no Rio Grande do Sul (informação verbal¹).

O recebimento de um maior número de animais juvenis em relação a adultos, representando uma proporção de 5,8:1, pode ser justificado pela inexperiência dos mesmos no processo de migração, o que os torna mais suscetíveis a intempéries, como tempestades e alterações bruscas em alto mar, e a ações antrópicas como a sobre-pesca, que causa a escassez de alimento gerando necessidade de competição entre os animais e conseqüentemente descarte dos mais enfraquecidos, os quais são encontrados na orla da praia e encaminhados para reabilitação (BOERSMA, 2008; GANDINI; FRERE; BOERSMA, 1996).

Embora tenha sido encontrada uma proporção de cerca de 1:1 entre pinguins machos e fêmeas recebidos, foi observada uma diferença significativa entre gênero quando comparado o grupo de pinguins juvenis com o de adultos. No grupo dos juvenis, o número de machos e fêmeas recebidos foi proporcional, no entanto as fêmeas representaram a maioria dos animais adultos encaminhados para o CRAM-FURG no período do estudo. Um maior gasto energético devido a fabricação e postura do ovo pela fêmea (GHEBREMESKEL, 1989), pode resultar em uma pior condição corporal no momento de saída da colônia, após o período de reprodução e muda, quando comparada ao macho, tornando a fêmea mais suscetível aos fenômenos climáticos durante o processo de migração (BOERSMA, 2008).

A média de peso dos animais na chegada ao CRAM-FURG representou dois terços do valor de referência para a espécie (média 4Kg), segundo Williams(1995), o que demonstra a privação alimentar destes exemplares, muitos dos quais recebidos em estado de caquexia. Embora esta variável tenha sido utilizada no estudo, ressalta-se que, estes valores analisados de forma isolada podem não representar fidedignamente a condição corporal do animal, tendo em vista a importante variação de tamanho

¹ Informação recebida através comunicação pessoal de Sérgio Pappo Rodrigues Heredia, coordenador responsável da Fundación Mundo Marino, em San Clemente del Tuyú, Argentina, em dezembro de 2011, e Mauricio Tavares, coordenador responsável pelo CECLIMAR, em Imbé, RS, em dezembro de 2011.

encontrada entre indivíduos, e até mesmo entre animais de diferentes populações (colônias) (GANDINI; FRERE; HOLIK,1992). De fato, a média de peso das fêmeas recebidas pelo CRAM-FURG foi significativamente menor do que a dos machos, o que pode ser explicado pelo fato de que estes são de 5% a 15% maiores que as fêmeas (GANDINI; FRERE; HOLIK, 1992; WALKER; BOERSMA; WINGFIELD, 2004).

A média dos valores de Ht dos animais recebidos pelo CRAM-FURG permaneceu dentro dos valores de referência descritos para a espécie (38-48%), porém a média de PPT encontrada superou o limite máximo (6,0g/dL) preconizado para pinguins-de-Magalhães (HAWKEY,1989; GHEBREMESKEL, 1989), indicando que muitos animais poderiam estar com algum processo inflamatório/infeccioso em andamento na chegada ao Centro, tendo em vista que estes valores se referem a uma amostra sanguínea da segunda semana de cativeiro, momento em que a hidratação normal do animal já estaria reestabelecida, sem viés de hemoconcentração.

A petrolização encontrada em 40,1% dos pinguins recebidos no CRAM-FURG durante os anos de 2004 a 2009 reflete o prejuízo e o impacto negativo das ações antrópicas nas aves marinhas, conforme já descrito por Gandini et al.(1996), Boersma et al. (2008) e Garcia-Borboroglu et al. (2008). Embora represente praticamente a metade da população, a taxa de petrolização de pinguins no CRAM-FURG já atingiu valores de 65,4%, considerando o período de 1995 a 2004 (RUOPOLLO et al., 2004). Similarmente, cerca da metade ou até mesmo a maioria dos pinguins recebidos em outros Centros de reabilitação distribuídos pelo Brasil e outros países do Hemisfério sul, como Mundo Marino, na Argentina, e CECLIMAR, também encontram-se petrolizados, evidenciando que esta é uma preocupação de nível mundial (informação verbal ²).

Cabe ressaltar que nenhum pinguim proveniente de outros Centros chegou ao CRAM/FURG petrolizado, tendo em vista que estes animais são estabilizados antes de serem submetidos a transporte aéreo. Este dado justifica também a diferença de petrolização encontrada entre juvenis e adultos, considerando que somente um indivíduo proveniente de outros Centros tinha mais de um ano de idade. De fato, ao

² Informação recebida através de comunicação pessoal Sérgio Pappo Rodrigues Heredia, coordenador responsável da Fundación Mundo Marino, em San Clemente del Tuyú, Argentina, em dezembro de 2011, e Mauricio Tavares, coordenador responsável pelo CECLIMAR, em Imbé, RS, em dezembro de 2011.

avaliar somente o grupo procedentes de praia, a taxa de petrolização não difere em relação a idade dos animais, porém aumenta consideravelmente, atingindo cerca de 80% destes animais oriundos das praias do litoral Sul do RS, sendo esta a principal causa de recebimento destes animais no Centro. Esta situação ocorre principalmente devido a ocorrência de manchas órfãs de petróleo nos oceanos, já que durante esses anos não foi documentado nenhum acidente com embarcações na região do Rio Grande do Sul, e a poluição crônica por petróleo é um acontecimento amplamente conhecido (PETRY, 2002, GARCIA-BORBOROGLU, 2008).

A reduzida taxa de animais ($\approx 20\%$) que receberam profilaxia para aspergilose com itraconazol sistêmico está relacionada ao critério estabelecido no protocolo de reabilitação utilizado no CRAM-FURG, adaptado de Oiled Wildlife Care Network (2000) e Ruoppolo et al., (2004), o qual caracteriza como grupo de risco animais com peso inferior a 2.500g. Considerando este critério de peso como determinante ao uso de itraconazol, e levando em consideração que, conforme previamente descrito, as fêmeas são menores que os machos (GANDINI; FRERE; HOLIK, 1992; WALKER; BOERSMA; WINGFIELD, 2004), era, de fato, de se esperar um número significativamente maior de fêmeas do que de machos em profilaxia antifúngica, conforme encontrado neste estudo.

Dentre os 66 casos de aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG ocorridos durante o período de 01/2004 a 12/2009, o predomínio absoluto da espécie *A. fumigatus* como agente etiológico de 98,5% dos casos é compatível com o descrito em outros estudos similares como relatos ou séries de casos da enfermidade em pinguins (AINSWORTH; REWELL, 1949; FLACH; STERVENSON; HENDERSON, 1990; GRACZYK; COCKREM, 1995; KHAN et al., 1977; REDIG, 1993). Esta espécie de *Aspergillus* é considerada a mais patogênica do gênero para os mais variados hospedeiros, com fatores de virulência já bastante estudados e bem estabelecidos, os quais incluem características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, nutricionais e reprodutivas do fungo, além de adaptabilidade do mesmo ao organismo dos hospedeiros, mesmo os de alta temperatura corporal como é o caso dos pinguins e demais aves (BEERNAERT, 2008; LATGÉ, 1999; NG; ROBSISON; DENNING, 1994;).

A distribuição anormal dos casos de aspergilose entre os seis anos estudados pode ser decorrente de uma gama de fatores, desde os relacionados ao agente

etiológico, como variações entre genótipos e cepas predominantes, e sua disponibilidade no ambiente de cativeiro dos pinguins, até mesmo às condições de sanidade dos animais recebidos pelo CRAM-FURG, os quais são oscilantes de um período a outro. Mais de 65% dos casos ocorreram no ano de 2008, assim como este foi o ano com maior densidade de incidência da doença no Centro. Isto pode ser consequência da alta densidade populacional ocorrida neste período, o qual correspondeu a um número de animais recebidos de duas a 11,6 vezes maior do que o encontrado nos outros cinco anos do estudo. A aglomeração de animais culmina com maior acúmulo de matéria orgânica, maior dificuldade na manutenção de uma ventilação e desinfecção ambiental adequada, e conseqüentemente maior aporte nutricional para rápido desenvolvimento fúngico gerando alta concentração de propágulos infectantes passíveis de ser inalados pelas aves (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; TSENG, 1993). Em adição, nestas condições, há um aumento no número de pessoas e na intensidade das atividades profissionais dentro do Centro, no intuito de proporcionar intervenções terapêuticas necessárias a todos os animais recebidos. Essa atividade intensificada, embora indispensável para cumprir com o manejo correto dos animais para reabilitação, gera um maior nível de estresse, que pode culminar com aumento da imunossupressão dos animais devido a liberação de cortisol e conseqüentemente com maior predisposição dos mesmos às doenças oportunistas como a aspergilose (NG; ROBSISON; DENNING; 1994). A relação inversamente proporcional entre densidade populacional e imunidade mediada por células T já foi descrita por Tella e colaboradores ao analisar colônias reprodutivas de pinguins-de-Magalhães, destacando a maior predisposição à enfermidades em locais de aglomeração de animais (TELLA et al., 2001).

Considerando todo o período do estudo, a densidade de incidência encontrada foi de 7,3 casos de aspergilose para cada 100 pinguins-mês, e a mortalidade proporcional por aspergilose foi de 48,5%. Outros estudos descrevendo valores de medidas de frequência desta doença em pinguins não foram encontrados na literatura, no entanto, a porcentagem de mortalidade proporcional foi similar a outros estudos realizados como em Flach et al. (1990), em que a mortalidade proporcional por aspergilose em pinguins gentoo (*Pycoscelis papua*) foi de 41%, num período de 24 anos,

ou em Russel et al. (2003), em que a mortalidade proporcional por aspergilose chegou a 79% das aves em reabilitação durante uma emergência com derrame de óleo, em 1991.

Embora estes valores não possam ser extrapolados para outros Centros de reabilitação ou outros locais de cativeiro, como aquários e zoológicos, devido aos inúmeros fatores que diferem tanto em relação ao ambiente quanto à população de animais, eles corroboram com a afirmação de que esta enfermidade tem um caráter limitante na reabilitação de pinguins, conforme já descrito por Russel et al. (2003) e Xavier et al. (2007) e que medidas profiláticas devem ser sempre preconizadas.

Ao analisar, a mortalidade proporcional anual, foi possível verificar que em 2004 esta atingiu o valor máximo de 100%, o que pode ser explicado pelo fato de que neste primeiro ano do estudo ainda não estava implantada a rotina de desinfecção ambiental no CRAM-FURG, a qual teve início em 2005 resultando em melhoria da qualidade do ar e conseqüentemente menor concentração de inóculo infectante de *Aspergillus* spp. inalado pelos animais em cativeiro (XAVIER et al., 2008). Neste contexto, todos os animais suscetíveis a doenças oportunistas no ano em questão, por estarem expostos a uma grande quantidade de propágulos de *Aspergillus* spp., desenvolveram a micose. Pode-se perceber ao analisar anualmente os dados de densidade populacional, densidade de incidência da aspergilose e mortalidade proporcional por aspergilose que as curvas de valores praticamente se sobrepõem, demonstrando a importante influência da quantidade de animais no local de cativeiro associada a desinfecção deste local, conforme descrito anteriormente.

Em relação aos fatores de risco para aspergilose, a análise bivariada demonstrou que pinguins juvenis ou procedentes de outros centros de reabilitação tem cerca de 3,5 vezes mais chance de desenvolver aspergilose que os demais. Embora a imaturidade do sistema imune dos pinguins juvenis possa torná-los mais suscetíveis a infecção por *Aspergillus* spp. (GRACZYCK; CRANFIELD, 1995), esta variável quando ajustada demonstrou uma diferença de mais de 10% na Razão de Odds, permitindo com que sua significância encontrada previamente em relação a aspergilose pudesse ser considerada como um fator de confusão. Similarmente, a petrolização e o uso de itraconazol profilático foram identificados na análise bivariada como fatores de proteção

para o desenvolvimento da aspergilose por pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG; no entanto, perderam esta característica ao serem ajustadas pela análise multifatorial. Estas modificações na significância das variáveis se devem ao fato de que 98% da população de animais adultos, e 100% dos animais petrolizados e com uso de profilaxia antifúngica pertenciam ao grupo de animais encontrados nas praias regionais, o qual foi significativamente menos acometido pela doença, resultando em fatores de confusão.

O alto risco de animais procedentes de outros Centros serem acometidos por aspergilose evidenciado neste estudo está provavelmente relacionado as implicações do processo de transporte aos quais são submetidos. Buscando reduzir o tempo necessário para o deslocamento destes animais de um estado ao outro, os pinguins são acomodados em caixas de madeira teladas, e encaminhados ao CRAM-FURG por via aérea e terrestre (Fig. 25), na grande maioria das vezes em aviões da Força Aérea Brasileira (FAB), permanecendo diversas horas no processo de deslocamento. Considerando que durante todo o período de vôo os animais são submetidos a um ambiente com superlotação, escassez de ventilação, acúmulo de matéria orgânica e consequentemente péssima qualidade do ar, com provável proliferação dos conídios de *Aspergillus* spp. o risco de infecção torna-se alto (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003, TSENG, 1993). Em adição a estes fatores, a poluição sonora ainda contribui para o aumento do estresse, o qual culmina com liberação de corticosteróides na circulação sanguínea dos animais, responsável por imunossupressão dos mesmos e ainda por estímulo a proliferação fúngica (NG; ROBSON; DENNING, 1994).

Além do processo de transporte aéreo, os pinguins procedentes de outros Centros passam por períodos variados de cativeiro em condições de reabilitação desconhecidas. Esta primeira fase é crucial para o sucesso na reabilitação, e caso seja negligenciada quanto aos procedimentos e intervenções necessárias conforme os protocolos disponíveis (OILED WILDLIFE CARE NETWORK, 2000; RUOPPOLO et al., 2004; TSENG, 1993), bem como quanto aos cuidados necessários com o ambiente e a qualidade do ar (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; TSENG, 1993; XAVIER et al., 2008), pode comprometer o processo e culminar com maior predisposição a doenças oportunistas.

A profilaxia para aspergilose com o uso de itraconazol sistêmico, indicada em diversos protocolos de reabilitação de pinguins (OILED WILDLIFE CARE NETWORK, 2003; RUOPPOLO et al., 2004; TSENG, 1993), é realizada no CRAM-FURG a partir de itraconazol procedente de farmácia de manipulação e administrado na dose de 15mg/Kg/dia durante um período de 15 dias. Estudo sobre farmacocinética e farmacodinâmica do itraconazol em pinguins demonstra que os fármacos genéricos não atingem concentrações plasmáticas necessárias para atividade antifúngica, e que o itraconazol utilizado deve ser comercial (Sporanox®) e administrado na dose de 20 mg/Kg uma vez ao dia (BUNTING et al., 2009), o que pode justificar a ineficácia do uso deste fármaco para prevenção da aspergilose encontrada no presente estudo.

A média de tempo de cativeiro total foi significativamente menor no grupo de animais que desenvolveram aspergilose, no entanto, cabe ressaltar que os valores encontrados correspondem somente ao período de cativeiro dos animais no CRAM-FURG, sem considerar os dias em reabilitação nos outros Centros, cujos dados não estavam disponíveis no banco de dados consultado. Neste contexto, salientando que o período total de cativeiro dos animais procedentes de outros Centros pode estar subestimado, e que este grupo de animais correspondeu a cerca de 75% dos casos de aspergilose, essa diferença deve ser interpretada com cautela. Por outro lado, o menor tempo de cativeiro no CRAM-FURG pode indicar que estes animais se infectaram previamente ou durante o processo de transporte, o qual culminou na queda da resistência e conseqüentemente no início do desencadeamento de um quadro crônico da doença, a qual se manifestou após alguns dias de cativeiro no CRAM-FURG. De fato, pinguins com aspergilose não apresentam sinais clínicos em estágios iniciais da doença, o que pode mascarar um processo infeccioso em andamento, sendo o animal considerado clinicamente sadio (GERMAN, 2000; TELL, 2005).

A diferença significativa entre o grupo de animais com aspergilose e o grupo controle na média dos valores de chegada de Ht e PPT encontrada no presente estudo, corrobora com a hipótese de que os pinguins possam ter sido recebidos no CRAM-FURG já infectados. Neste contexto, o valor médio do Ht significativamente menor em animais que desenvolveram aspergilose poderia ser explicado pela lise de hemáceas ocasionada pela produção e liberação de hemolisinas pelo fungo *Aspergillus* spp.,

(LATGÉ 1999) e o processo inflamatório em resposta a invasão fúngica tecidual, associado ao aumento de imunoglobulinas anti-*Aspergillus* da resposta específica justificam o valor médio de PPT significativamente aumentado neste grupo (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004; GRACZYK; CRANFIELD, 1995). De fato, testes de ELISA e IDGA para detecção de anticorpos específicos são promissores para o diagnóstico de aspergilose, justamente pelo fato de que a produção de imunoglobulinas aumenta significativamente em animais enfermos em relação aos animais sadios (CRAY et al., 2009; GRACZYK; CRANFIELD; KLEIN, 1998; ARCA-RUIBAL et al., 2006).

Embora o peso de chegada dos animais seja o parâmetro descrito por Ruoppolo (2004) e utilizado no CRAM-FURG para início de profilaxia para aspergilose em pinguins-de-Magalhães, neste estudo a média de peso de chegada dos animais no Centro não distinguiu entre o grupo que desenvolveu aspergilose e o controle, demonstrando a falta de robustez na utilização desta medida como definidora de grupos de risco para a doença. Por outro lado, diferença significativa entre os grupos foi encontrada no ganho de peso durante o cativeiro, com valor médio de cerca de 850g no grupo controle e de aproximadamente 100g nos animais que morreram de aspergilose. Entretanto, como esta variável foi avaliada considerando a diferença entre peso de saída e entrada do animal, e não a partir de uma curva com valores de avaliação semanal, não foi possível determinar se os animais que desenvolvem aspergilose permanecem durante todo o período do cativeiro praticamente sem ganho de peso mesmo após a estabilização e início do processo de recuperação, ou se esses pinguins ganharam peso, mas ao longo da reabilitação, quando começaram a manifestar a doença retornaram praticamente ao baixo peso de entrada no CRAM-FURG. Esta segunda hipótese é mais plausível a medida que um dos sinais clínicos dos pinguins com aspergilose é anorexia e regurgitação, os quais culminam com perda de peso em processos crônicos (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BEYTUT; ÖZCAN; ERGINSOY, 2004; KEARNS; LOUDIS, 2003; REDIG, 1993).

7 Conclusões

- A densidade de incidência da aspergilose em pinguins em reabilitação no CRAM-FURG é de 7,3 casos para cada 100 pinguins por mês de seguimento;

- A aspergilose é responsável por uma mortalidade proporcional de cerca de 50% dos pinguins em reabilitação no CRAM-FURG, apresentando oscilações anuais.

- Na análise bivariada, a idade (juvenil) e a procedência (de outros Centros) são fatores de risco para aspergilose, com RR maior que 3,0, enquanto a petrolização e o uso de itraconazol profilático se comportam como fatores de proteção para o desenvolvimento da aspergilose por pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG. No entanto, ao ajustar as variáveis pela análise multifatorial, a única variável categórica considerada como fator de risco é a procedência dos pinguins de outros Centros de reabilitação; e o RR referente a idade dos animais passa a ser considerado como fator de confusão, bem como a petrolização e o uso de itraconazol que perdem a significância.

- *Aspergillus fumigatus* é a principal espécie responsável por casos de aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG.

8 Considerações finais

Tendo em vista a identificação de distintos fatores de risco para a aspergilose em pinguins-de-Magalhães no CRAM-FURG, dentre os quais o peso inicial não está incluído, torna-se essencial uma modificação nos critérios de uso do itraconazol profilático no centro, recomendando-se que o peso corpóreo de chegada não seja o único parâmetro utilizado para determinação de animais que farão tratamento preventivo. Neste sentido, salienta-se a necessidade de intervenção profilática para aspergilose em pinguins-de-Magalhães procedentes de outros Centros, e que foram submetidos a transporte aéreo, os quais possuem cerca de 3,5 vezes mais chance de desenvolver a doença, bem como a animais com Ht baixo e PPT alta.

Na busca de melhor elucidação da condição clínica dos pinguins-de-Magalhães recebidos pelo CRAM-FURG, torna-se essencial a substituição dos métodos de avaliação de parâmetros hematológicos para melhor compreensão dos processos inflamatórios e/ou infecciosos. A realização de hemogramas completos, com avaliação da série vermelha e leucograma, os quais já estão sendo implantados na rotina do CRAM-FURG, poderão contribuir para elucidação de novos fatores de risco para a aspergilose, bem como para avaliação da gravidade, evolução e prognóstico da mesma. A avaliação destes parâmetros será igualmente aprimorada pelo exame clínico individual que tem sido realizado semanalmente em todos os pinguins-de-Magalhães em reabilitação no CRAM-FURG, cujos dados tem sido utilizados para alimentar o banco de dados do respectivo Centro.

Como perspectivas futuras e aplicações práticas deste estudo, pretende-se, para a redução da mortalidade de pinguins-de-Magalhães por aspergilose no CRAM-FURG

- substituir a avaliação de peso corpóreo dos pinguins-de-Magalhães recebidos pela avaliação de condição corporal;
- dar continuidade aos estudos envolvendo tratamentos profiláticos, testando diferentes antifúngicos e formas de administração dos mesmos, com objetivo de otimizar a terapia preventiva da aspergilose;
- elaborar um protocolo específico para prevenção da aspergilose para ser utilizado em pinguins-de-Magalhães em cativeiro por diferentes Centros de recuperação.
- dar continuidade aos estudos relacionados a busca de métodos diagnósticos efetivos e precoces no intuito de possibilitar a intervenção terapêutica em casos de aspergilose em pinguins-de-Magalhães.

9 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.

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

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.

ARCA-RUIBAL, B.; WERNERY, U.; ZACHARIAH, R.; BAILEY, T. A.; DI SOMMA, A.; SILVANOSE, C.; MCKINNEY, P. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. **The Veterinary Record**. p. 158-442, 2006.

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.

BECHERT, U.; CHRISTENSEN, J. M.; POPPENG, R. LE, H.; WYATT, J.; SCHMITT, T. Pharmacokinetics of orally administered terbinafine in African penguins (*Spheniscus demersus*) for potential treatment of aspergillosis. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**. v. 41, n. 2, p. 263-74, 2010.

BEERNAERT, L. A.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; MARTEL, A. Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Avian Pathology**. n. 5, p.545–549, 2008.

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.

BINGHAM, Mike. 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.

BOERSMA, P. D.; STOKES, D. L.; YORIO, P. M. Reproductive variability and historical change of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Punta Tombo, Argentina. In: DAVIS, L.S; DARBY, J.T.: **Penguin Biology**. San Diego: Academic Press, 1990. p.15-43.

BOERSMA, P. Dee. Penguins as marine sentinels. **BioScience** , v.58, n.7, p.597-607, 2008.

BRENNAN, L.A., BUCHANAN, J.B., SCHICK, C.T. & HERMAN, S.G. Estimating sex ratios with discriminant function analysis: the influence of probability cutpoints and sample size. **Journal of Field Ornithology** n. 62, p. 357-366, 1991.

BROSSY, J. J.; PLÖS, A. L.; BLACKBEARD, J. M.; KLINE, A. Diseases acquired by captive penguins: what happens when they are released into the wild? **Marine Ornithology**. n. 27, p.185–186, 1999.

BUNTING, E. M.; MADI, N. A.; COX, S.; MARTIN-JIMENEZ, T.; FOX, H.; KOLLIAS, G. Evaluation of Oral Itraconazole Administration in Captive Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 3, p. 508-518, 2009.

CACCIUTTOLO, E.; ROSSI, G.; NARDONI, S.; LEGROTTAGLIE, R.; MANI, P. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. **Veterinary Res Commun**, v. 33, n. 6, p. 521-527, 2009.

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.

COOK, R. A. A Clinical Trial of Ketaconazol for the Prevention of Aspergillosis in Rockhopper Penguins, *Eudyptes crestatus* In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians, Arizona, D.C, 1985. p. 18-19.

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.

CRAY, C.; WATSON, T.; ARHEART, K. L. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. **Avian Disease**, v. 53, n. 4, p. 491-494, 2009.

CRAY, Carolyn. Diagnosis of Aspergillosis in Avian Species. In: MILLER, E. R.; FOWLER, M. E. **Zoo and Wild Animal Medicine** . St Louis: Elsevier Saunders, 2012. p. 336-342.

CRISSEY, S.; MCGILL, P.; SLIFKA, K. Penguins: Nutrition and Dietary Husbandry. 2002, 19pp. Disponível em: <http://www.nagonline.net/husbandry/Diets%20pdf/Penguin%20Nutrition.pdf> > Acesso em 15 out 2011.

DI SOMMA, A., BAILEY, T., SILVANOSE, C.; GARCIA-MARTINEZ, C. The Use of Voriconazole for the Treatment of Aspergillosis in Falcons (*Falco* Species). **Journal of Avian Medicine Surgery**, v. 21, n. 4, p. 307-316, 2007.

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.

FRIEND, Milton. Aspergillosis In: Field Manual of Wildlife Diseases: Birds. 1999, p. 129-134.

GANDINI, P. A.; FRERE, E.; HOLIK, T. M. Implicancias de las diferencias en el tamaño corporal entre colonias para el uso de medidas morfométricas como método de sexado en *Spheniscus magellanicus*. **El Hornero**, n. 13, p. 211-213, 1992.

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

GANDINI, P.; FRERE, E.; BOERSMA, P. D. Status and Conservation of Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus* in Patagonia, Argentina. **Bird Conservation Internacional**, n. 6, p. 307-316. 1996.

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.

GARCÍA-BORBOROGLU, P., BOERSMA, P. D., REYES, L., SKEWGAR, E. Petroleum Pollution and Penguins: Marine Conservation Tools to Reduce the Problem. In: HOFER, T.N. **Marine Pollution: New Research**. New York: Nova Science, 2008, p. 339-356.

GERMAN, Alisson. Avian Aspergillosis. Langford School of Veterinary Science, Bristol University. 2000. 13p.

GERMAN, A. C.; FLACH, E. J.; SHANKLAND, G. S.; FLACH, E. J. Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. **Veterinary Record**, v. 150, p. 513-518, 2002.

GHEBREMESKEL, K.; WILLIAMS, G.; KEYMER, I. F.; HORSLEY, D.; GARDNER, D. A. Plasma chemistry of Rockhopper (*Eudyptes crestatus*), Magellanic (*Spheniscus magellanicus*), and Gentoo (*Pygoscelis papua*) wild penguins in relation to molt. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.92A, n.1, p. 43-47, 1989.

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.

HAWKEY, C. M.; HORSLEY, D. T.; KEYMER, I. F. Haematology of wild penguins (sphenisciformes) in the falkland islands. **Avian Pathology**, v.18, p.495-502, 1989.

HEREDIA, S. A. R.; ALVAREZ, C. K.; LOUREIRO, J. D. **Aves Marinas Empetroladas: guia para su manejo y atención**. 1ª. ed. San Clemente: Fund. Mundo Marino, 2008. 139p.

HINES, R. S.; SHARKEY, P.; FRIDAY, R. B. Itraconazole treatment of pulmonar y, ocular, and uropygeal aspergillosis and candidiasis in birds—data from five clinical cases and controls. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**. p.322–327, 1990

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 27 Out. 2011.

JONES, M. P.; OROSZ, S. E. The diagnosis of aspergillosis in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 2, p. 52-58, 2000.

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/mar/2011.

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

KLICH, Maren. **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, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.

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

MASSEY, Gregory. Summary of a oiled bird response. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.15, n.1, p.33-39, 2006

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.

NG, T. T. C.; ROBSON, G. D.; DENNING, D. W. Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp. : implications for pathogenesis , **Microbiology**. n. 140, p. 2475-2479, 1994.

OILERD WILDLIFE CARE NETWORK. Protocols for the care of oil-affected birds. Davis: Wildlife Health Center, School of Veterinary Medicine, University of California, 2000. 75p.

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, Patrick. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis; In: Fowler, M.E.: **Zoo & Wild Animal Medicine: current therapy** 3. W B Saunders Inc., Denver, Colorado; cap.23:178-181; 1993.

REDIG, Patrick. Mycotic Infections in Birds I: Aspergillosis In: THE NORTH AMERICA VETERINARY CONFERENCE – PROCEEDINGS, 2005. p.1192-1194.

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.

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

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

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

SCHIAVINI, A.; YORIO, P.; GANDINI, P.; REY, A. R.; BOERSMA, P. D. Los pinguinos de la costa argentina: estado poblacional e conservación. **Hornero**, v.20, n.1, p.5-23, 2005.

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 Micología**, v.14, p.104-110, 1997.

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 (Pinguim). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.: **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. São Paulo, SP: Roca, 2006. p.309-323.

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

TELLA, J. L.; FORERO, M. G.; BERTELLOTTI, M.; DONÁZAR, J. A.; BLANCO, G.; CEBALLOS, O. Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities in a colonial seabird: a multiscale approach. **Proceedings of the royal society Biological Sciences**. n. 268, v. 1475, p.1455–1461, 2001.

TSENG, Florina. Care of oiled seabird: a veterinary perspective. In: OIL SPILL CONFERENCE, 1993, Washington. p.421-424.

VANSTREELS, R.E.T., ADORNES, A.C., RUOPPOLO, V., CANABARRO, P.L., SILVA-FILHO, R.P. & CATÃO-DIAS, J.L. Gender determination from morphometrics in migrating Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus*. **Marine Ornithology** n.39, p.215–220, 2011

XAVIER, M.O.; SOARES, M. P. ; MEINERZ, A. R. ; NOBRE, N. 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, p.480-484, 2007.

XAVIER, M. O.; MEINERZ, A. R.; CLEFF, M. B.; OSÓRIO, L. G.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.; SILVA-FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. Eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p.873-877, 2008.

WALKER, B. G.; BOERSMA, P. D.; WINGFIELD, J. C. Physiological condition in magellanic penguins: does it matter if you have to walk a long way to your nest? **The Condor**, v.106, p.696-701, 2004

WILLIAMS, Tony. **Bird families of the world – The Penguins**. New York: Oxford University Press, 1995, 352p.

WILSON, M. D.; RIORDAN, A.; McCUNE, E. L.; BERG, J. N. Evaluation of Ketoconazole in the Prophylactic Treatment of Aspergillosis in Birds. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians, Washington, D.C, 1986. p. 21.

YORIO, P.; GARCIA BORBOROGLU, P.; POTT, J.; MORENO, J. Breeding Biology of Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Golfo San Jorge, Patagonia, Argentina. **Marine Ornithology**, n. 29, p. 75–79, 2001.