

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós Graduação em Veterinária



Dissertação

**Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce
da aspergilose em pinguins em cativeiro**

Ângela Leitzke Cabana

Pelotas, 2013

ÂNGELA LEITZKE CABANA

Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro

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 de conhecimento: Sanidade Animal – Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2013

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Severo (UFRGS)

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello (UFRGS)

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas (UFPeI)

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (UFPeI- orientador)

Profa. Dra. Ana Raquel Mano Meinerz (UFPeI- suplente)

Dedico este trabalho a todos (as) médicos veterinários (as) apaixonados por aquilo que escolheram como profissão, assim como eu e a todos (as) participantes da minha caminhada profissional, família, amigos e colegas de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a TODOS os colegas de trabalho, de profissão e “laboratórios” (MICVET/UFPel e FAMED/FURG), pós graduandos, funcionários, bolsistas, estagiários e, na maioria dos casos, amigos (as), pelo essencial carinho e amizade dedicados neste período de minha vida e desde minha iniciação científica, sem essa dedicação não teria sido possível “aguentar” muitos e muitos dias de aflições, trabalho duro e árduo e de muitas risadas.

Especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles também pelo carinho, amizade e oportunidade de me permitir adentrar a este maravilhoso mundo dos fungos e ainda da micologia veterinária, fruto de muitos orgulhos para essa maravilhosa pessoa, além de pelas inúmeras responsabilidades por ele listadas a nós do grupo de Pesquisa em Micologia Veterinária que só me fizeram crescer profissionalmente e humanamente ao segui-lo como exemplo em muitas das vezes.

Ainda especialmente e não menos importante, a minha co-orientadora Melissa Orzechowski Xavier, que em muitas vezes foi ORIENTADORA e AMIGA, trazendo idéias, soluções e opiniões nessa fase importante de minha formação e ainda pela dedicação e carinho ao ocupar incontáveis horas de trabalho e conversas sempre agilizando os resultados e respostas para tudo que precisei, mesmo que as vezes parecesse difícil de eu aceitar. Considero-a exemplo de profissionalismo e responsabilidade.

A equipe de veterinários, biólogos, oceanólogos, voluntários, estagiários e também em muitos dos casos amigos (as) do Centro de Recuperação de Animais Marinhos/CRAM/FURG/RG. Especialmente ao idealizador de tudo lá também orientador e amigo “Neneco”, e ainda e não menos importante a “Déia”, “Paulinha”, “Pedrinho”, “Arysita”, “Robs”, “Vanessinha”, “Silvinha”, bem como muitos outros (as) que se fizeram importantes nessa jornada e na abertura das portas para esse mundo da pesquisa no CRAM e no mundo dos animais marinhos e silvestres.

Ao Micvet/UFPel por todo apoio dedicado, amizades concretizadas e aprendizado acumulado junto delas, “as gurias do Mário”, aqui deixando registrado especialmente a amiga da dupla sertaneja micológica Angelita dos Reis Gomes, as negrinhas Luiza da Gama Osório e Anelise Fonseca, as mais chiques de todas Maria Elvira Sica Cruzeiro e Flávia Biasoli de Araújo, aquela da risada mais gostosa Caroline Bohnen de Matos, as colegas e amigas sempre tão atarefadas com seus “*in vitros*” Rosema Santin, Cláudia Giordani e Isabel Martins Madrid. As “chefas”, companheiras de café e também amigas Renata Osório de Faria e Ana Raquel Mano Meinerz, e as também “chefas” e amigas Patrícia da Silva Nascente e Marlete Brum Cleff, a nossa funcionária e amiga Tatiane Oliveira Barbosa pelo incansável auxílio, bem como horas de chimarrão contemplando uma rica amizade. Ainda representando a parte masculina do Micvet não poderia esquecer do antigo e atual colega, companheiro de boas filosofias sobre a vida e amigo Franklin Vaz.

As amigas do peito de longa data e também do meio científico Josiara Mendes Redu e Bruna Zafalon da Silva, que embora separadas pelo local de trabalho estão sempre me incentivando nessa longa jornada científica e me engrandecendo com suas idéias, carinho e amizade sempre dedicados, além de me entenderem quando foi preciso desabafar sobre os assuntos e obstáculos que encontrei no caminho.

As amigas “dos Silvestres” Ana Paula Neuschrack Albano, esta também colega micológica, Greici Behling, Alice Teixeira Meirelles Leite e Marcela Pearson pela amizade, boas conversas, acolhimento e auxílio indescritível nessa etapa que se encerra, com certeza vocês serão figuras marcadas daqui para frente na minha vida, exemplos de dedicação aos animais e a profissão.

As fontes financiadoras: CNPq, CAPES e FAPERGS pelas bolsas de estudo e apoio financeiro concedido, firmando um incentivo a pesquisa e ciência nas instituições envolvidas no estudo e no país, sendo assim possível a realização do dispendioso projeto de pesquisa desta dissertação.

A minha família, ou ainda, as “minhas famílias” (Leitzke Cabana, Silva Peres, Casalinho e Medeiros) em especial a minha mãe, exemplo de autoestima e coragem sempre confiando no meu potencial e tocando tudo pra frente, mesmo que encontrasse “pedras” no caminho, ao meu irmão André, que é mais pai do que irmão, dedicando muita paciência e carinho a tudo aquilo que veio junto com essa fase de minha vida e ao meu pai. Ainda aqueles que fazem parte do meu coração

Marivoni Moreira, Andressa Cabana e Alisson Cabana. A minha família do coração e que tomei para minha na qual possuo outras duas mães e outros dois pais Neura Lúcia Peres e Pedro Osório Peres, entusiastas dessa minha caminhada e acompanhantes cativos de minhas conquistas e obstáculos, que só tiveram a ajudar a superá-los; bem como Nórís Helena Medeiros e Cléber Medeiros também cativos na minha jornada e vida, sempre incentivando a obter bons frutos.

Aqui com espaço especial e dedicado ao meu namorado Pedro Humberto da Silva Casalinho, companheiro dessa caminhada e senão o maior, um dos mais empolgados com tudo aquilo que conquistei, amigo, carinhoso e realista, muitas vezes me ajudou nas decisões durante essa fase, bem como me freou quando eu na empolgação iria ter atitudes desnecessárias, servindo de exemplo para manter a mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo, Pedro, essa conquista também é tua!

Aos meus “bichos”, cães, gatos, coelhos, cobaias, cavalos, ovelhas, bichos de pena, escamas e pêlo...vocês todos foram essenciais e sempre serão na minha vida, uma vez que basta um olhar, um gesto de cada um quando se adentra a porta de casa muitas vezes querendo desistir de tudo...isso serviu de entusiasmo.

À Deus, que fica por último, mas julgo o mais importante, por me fazer como sou, por me permitir trabalhar com o que gosto e no que gosto e pensando assim TRABALHES COM O QUE AMAS E NÃO TRABALHARÁS UM SÓ DIA DE SUA VIDA. Obrigado por permitir o milagre da vida e suas consequências.

A todos e todas aqui listados e aqueles que estão em meu coração o meu MUITO OBRIGADO por tudo, pelo amor, estímulo, carinho, amizade e principalmente paciência e compreensão das muitas horas de convívio substituídas por trabalho e estresse, tudo isso foi com certeza necessário e hoje essa etapa conquistada e concluída será facilitadora de muita coisa na minha vida, essa CONQUISTA É NOSSA!

Muito Obrigada!

“Tenho andado distraído, impaciente e indeciso e ainda estou confuso só que agora é diferente... ESTOU TÃO TRANQUILO E TÃO CONTENTE...”

(Renato Russo)

Resumo

CABANA, Ângela Leitzke. **Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro**. 2013. 110f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A aspergilose é uma das principais causas de morte de pinguins em cativeiro. Embora este seja um problema conhecido há décadas, a maioria dos casos relatados são ainda confirmados em exames *post-mortem*, sendo necessários mais estudos sobre os métodos de diagnóstico *in vivo* da doença. Assim, este trabalho objetivou avaliar a eficácia da detecção de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus* através do desempenho do monitoramento sorológico por imunodifusão radial dupla em gel de ágar (IDGA) para o diagnóstico *in vivo* da aspergilose em pinguins em cativeiro. O estudo foi realizado incluindo pinguins-de-Magalhães em reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM/FURG) no período de 2009 a 2011.. Foram incluídos 134 pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM / FURG), que foram monitorados por IDGA semanalmente até seu destino final (morte ou de liberação), totalizando 660 amostras de soro estudadas. O monitoramento sorológico foi realizado para detecção de anticorpos anti-*Aspergillus fumigatus* utilizando antígeno e anticorpos comerciais. Todos os animais foram acompanhados clinicamente e exames *post-mortem* foram realizados em pinguins que vieram a óbito durante o período do estudo. Um total de 28% (37/134) dos pinguins veio a óbito, 89,2% (33/37) de aspergilose, 11% (4/37) de outras causas e 97 foram libertados. A partir dos 33 animais com aspergilose comprovada, 21 apresentaram anticorpos anti- *A. fumigatus* por IDGA, sendo o intervalo médio entre a morte e as IDGA positivas 16,4 dias. Doze animais com sorologia negativa vieram a óbito por aspergilose. As taxas de sensibilidade e especificidade foram de 63,6% e 95%, respectivamente, e os valores preditivo positivo e negativo foram 80,7% e 88,9%, respectivamente. Estes dados demonstram que o acompanhamento sorológico para a detecção de anticorpos por IDGA pode ser uma ferramenta útil e importante para o diagnóstico de aspergilose em pinguins. Como nosso estudo com IDGA em pinguins é pioneiro, maiores estudos são necessários acerca do prognóstico dos casos de aspergilose em pinguins cuja intervenção terapêutica se baseie no diagnóstico por IDGA, considerando que o período médio entre o resultado positivo deste teste e o óbito do animal foi de menos de um mês.

Palavras chave: *Sphenisciformes*. Cativeiro. *Aspergillus* sp. anticorpos.

Imunodifusão. IDGA

Abstract

CABANA, Ângela Leitzke. **Monitoramento sorológico para diagnostic precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro.** 2013. 110f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Aspergillosis is a leading cause of death in captive penguins. Though being a known problem for decades, most reported cases are still only confirmed in *post-mortem* examinations, requiring further studies on methods for *in vivo* diagnosis of the disease. This study aimed to evaluate the efficacy of detection of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies through the performance by serological monitoring with agar gel double radial immunodiffusion (AGID) for *in vivo* diagnosis of aspergillosis in captive penguins. The study was performed including Magellanic penguins in a rehabilitation program at Center for Recovery of Marine Animals (CRAM/FURG) in the period from 2009 to 2011. We included 134 Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in rehabilitation at CRAM, which were monitored by AGID weekly until its final destination (death or release) totaling 660 studied serum samples. The serological monitoring was performed in order to detect anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies using commercial antibodies and antigen. All animals were clinically monitored and *post-mortem* examinations were performed on penguins that died during the study period. A total of 28% (37/134) penguin died, 89.2% (33/37) of aspergillosis, 11% (4/37) of other causes and 97 were released. From the 33 animals with proven aspergillosis, 21 had anti-*A. fumigatus* antibodies by AGID, being the average interval between death and the positive AGID result of 16.4 days. Twelve seronegative animals eventually died of aspergillosis. The rates of sensitivity and specificity were 63.6% and 95%, respectively, and positive and negative predictive values were 80.7% and 88.9% respectively. These data demonstrate that serological monitoring for the detection of antibodies by AGID may be a useful and important tool for the diagnosis of aspergillosis in penguins. As our study with AGID in penguins is pioneer, more studies are required concerning the prognosis in cases of aspergillosis in penguins whose therapeutic intervention is based on diagnosis by AGID, considering that the average period between the positive result of this test and the death of the animal was less than one month.

Key-words: *Sphenisciformes*. Captivity. *Aspergillus* sp. Antibody. Immunodiffusion. AGID

Lista de figuras

Artigo 1 Serological monitoring of antibodies to an early diagnosis of aspergillosis in captive penguins

Figure 1a/b Lesions observed at the necropsy of penguins with aspergillosis. a) granulomatous lesions in pulmonary parenchyma, white in colour and dry in texture. b) aerosacculitis showing thickening air sacs with a grey-greenish mould on internal surface typical of fungal sporulation.....56

Lista de tabelas

Artigo 1. Serological monitoring of antibodies to an early diagnosis of aspergillosis in captive penguins

Table 1. Clinical-epidemiological and serological data of penguins with aspergillosis.....	55
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

CRAM- Centro de Recuperação de Animais Marinhos
FURG - Universidade Federal do Rio Grande
FAMED- Faculdade de Medicina
IUCN- União Internacional pela Conservação da Natureza
UFPeI- Universidade Federal de Pelotas
Micvet- Centro de Diagnóstico em Micologia Veterinária
IDGA- Imunodifusão radial dupla em gel de ágar
ELISA- *Enzyme-linked immunosorbent assay*
PCR- *Polymerase chain reaction*
HPLC- *High performance liquid chromatography*
RAPD- (*Random Amplified Polymorphic DNA*)
PHA- Fitohemaglutina
AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida
DNA- Ácido desoxiribonucleico
KOH- Hidróxido de potássio
PAS- Ácido periódico de Schiff
HE- Hematoxilina eosina
PDA- Ágar potato dextrose/ágar batata
LBA- Lavado bronco-alveolar
GM- Galactomanana
IFN-Interferon
TNF- Fator de necrose tumoral
MIP- Proteína inflamatória de macrófagos
MCP-Proteína quimotática de monócitos
IL- Interleucina
Th1- Linfócito T auxiliar (T “helper”) do tipo 1
Th 2- Linfócito T auxiliar (T “helper”) do tipo 2
IgG- Imunoglobulina G
IgE- Imunoglobulina E
CD4- Células T CD4
VU- Vulnerável
TID/QID- Três ou quatro vezes ao dia

Sumário

Resumo	9
Abstract	10
Lista de figuras	11
Lista de tabelas	12
Lista de abreviaturas e siglas	13
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 <i>Aspergillus</i> e Aspergilose	18
2.2 Aspectos históricos	20
2.3 Morfologia fúngica	21
2.4 Etiologia e epidemiologia	22
2.5 Patogenia e fatores predisponentes	25
2.6 Imunologia na aspergilose	27
2.7 Sinais clínicos e formas clínicas	29
2.8 Patologia	31
2.9 Diagnóstico	32
2.10 Pinguins e reabilitação	36
2.11 Aspergilose em pinguins	38
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 ARTIGO	43
4.1 Artigo 1	43
Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro	43
5 CONCLUSÃO GERAL	57
REFERENCIAS	58
APÊNDICES	73
Apêndice A	74
Artigo publicado na revista A hora Veterinária (Julho/Agosto 2012)	74
Apêndice B	85

Artigo submetido a revista Avian Diseases (Dezembro 2012)	85
Anexos	97
Anexo A.....	98
Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal	98
Anexo B.....	99
Normas da Revista Medical Micology	99
Anexo C	109
Confirmação da Submissão do Artigo.....	109

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos antrópicos no habitat dos animais silvestres acarretam sérios prejuízos ambientais e ecológicos, culminando com ameaças e extinção de diferentes espécies selvagens e silvestres (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2006). O pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) está classificado como “quase ameaçado” (IUCN, 2009), e, devido a fatores como descarga de petróleo nos mares, redução de alimento, doenças infecciosas e parasitárias, tornam-se suscetíveis a doenças oportunistas como a aspergilose (GANDINI et al., 1994; RUOPPOLO et al., 2004).

A aspergilose já foi descrita em diversas espécies de pinguins e sua predisposição está diretamente ligada ao grau de imunossupressão, estresse que estes animais se encontram ao chegarem em centros de reabilitação, zoológicos e outros tipos de cativeiro, além de fatores intrínsecos à espécie como anatomia, fisiologia e resposta imune celular, somado a isso, o uso de medicamentos em larga escala (TELL, 2005; XAVIER et al., 2007; 2008 b).

Estima-se que a aspergilose responda por cerca de 45% das causas de mortalidade em pinguins em cativeiro (XAVIER et al., 2007), sendo aproximadamente 95% dos casos ocasionados por *Aspergillus* seção *Fumigati*, uma das espécies mais patogênicas atualmente encontrada (REDIG, 1993; GRACZYK; CRANFIELD, 1995; FOWLER; FOWLER, 2001; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2007; XAVIER et al., 2007).

Esta micose não é contagiosa e a infecção ocorre através dos conídios infectantes, que se disseminam pelo ar e penetram no organismo, principalmente por via inalatória (LATGÉ, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004). Naturalmente estes propágulos, em indivíduo imunocompetente, são eliminados pela resposta imune inata, não causando dano ao organismo (LATGÉ, 1999, 2001).

Em pinguins, a manifestação de sinais é essencialmente respiratória, ocorrendo de forma crônica com manifestação tardia de sinais clínicos como dispnéia, emaciação, letargia, anorexia e/ou frequentemente morte súbita (KHAN et al., 1977; CARRASCO et al., 2001; KEARNS; LOUDIS, 2007; XAVIER et al., 2008).

a, b). Os insucessos terapêuticos com consequente óbito são extremamente comuns e atribuídos ao diagnóstico tardio da micose, muitas vezes obtidos somente no exame *post-mortem* (XAVIER et al., 2007, XAVIER; PASQUALOTTO, 2011).

A prevenção é a melhor forma de controle da aspergilose em aves (ANDREATTI FILHO, 2000; FOWLER; FOWLER, 2001), porém muitas vezes, em cativeiro, existem fatores limitantes para a aplicação das medidas mais adequadas, devido ao estresse causado pelo manejo diário com os animais. Assim, a detecção precoce da aspergilose pode auxiliar a reduzir a mortalidade causada por esta micose em pinguins.

Em adição, o diagnóstico definitivo é limitado em função dos achados inespecíficos. Culturas fúngicas positivas de secreções respiratórias nem sempre indicam doença, podendo indicar apenas colonização da via aérea ou contaminação, e cultivos de sangue e líquido raramente são positivos para *Aspergillus*. Ainda, a biópsia, requer procedimento invasivo, sendo impraticável em animais em reabilitação, e exames de imagem não demonstram achados precoces (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

Há, portanto, uma clara necessidade de aprimorar o diagnóstico da aspergilose nestes animais, buscando a eficácia do tratamento e redução da mortalidade atribuída. Na tentativa de sobrepor estas dificuldades no diagnóstico precoce da aspergilose, utilizam-se técnicas de detecção de anticorpos como a Imunodifusão radial dupla em gel de ágar (IDGA), método imunológico simples, conceituado, padrão ouro para diagnóstico desta doença em outras espécies animais e humanos (SHARP et al., 1984; BABATASI et al., 2000; CAMELI-ROJAS et al., 2004), e que pode ser realizado em amostras clínicas de fácil obtenção em animais silvestres como soro sanguíneo (TELL, 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aspergillus* e Aspergilose

Fungos comensais podem ser responsáveis por micoses oportunistas, tendo o número de registros destas ocorrências aumentado (AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTO, 2007; AQUINO et al., 2010). Dentre estas, destaca-se a aspergilose, doença fúngica de caráter invasivo, causada por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* de origem multifatorial não contagiosa (AINSWORTH; REWELL, 1949; AINSWORTH; AUSTWICK, 1973; RICHARDSON; WARNOCK, 2003).

O caráter multifatorial aplica-se devido aos diversos fatores pelos quais o indivíduo pode desenvolvê-la, tendo em comum a imunossupressão por causas variadas, tais como: uso de drogas citotóxicas, corticosteroides, transplantes de órgãos sólidos, células-tronco, intervenções médicas invasivas, associação com síndromes imunossupressoras como a AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida), bem como uso de antimicrobianos de amplo espectro favorecendo o ambiente para desenvolvimento de micro-organismos (SABALLS-RADRESA et al., 2000; RICHARDSON; WARNOCK, 2003; SLAVIN et al., 2004; RICHARDSON, 2005; NOURRY et al., 2005; PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007).

A aspergilose pode ocorrer em várias espécies como humanos, canídeos, felídeos, equídeos, ruminantes (mamíferos) e principalmente nas aves, tanto domésticas quanto silvestres, em ovos embrionados, onde representa grande problema em aves de produção, quanto em animais jovens e adultos, não sendo atribuída a idade (AINSWORTH; AUSTWICK, 1973; JORDAN; PATTISON, 1997; HERRERA; ULLOA, 1998; FRIEND; FRANSON, 1999; FORBES, 1999; CORBELLINI et al., 2003; ARCA-RUIBAL et al., 2006; SANCHEZ; COUTINHO, 2007; KANO et al., 2012).

A espécie mais comumente isolada de aves silvestres é *Aspergillus fumigatus* com taxas de 95% de isolamento, isolada pela primeira vez dos pulmões de uma

“Great Bustard” (*Otis tarda*) em 1863 por Frenesius (QUINN et al., 1994; RICHARD, 1997; HEIDENREICH, 1997). É a causa *mortis* em 15-30% das aves de rapina (Strigiformes- corujas e Falconiformes- falcões, abutres, condores, águias, gaviões) em cativeiro em zoológicos, aquários ou centros de reabilitação (YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998; ABRAMS et al., 2001).

Nas aves em geral, sejam elas domésticas ou silvestres, a aspergilose tem caráter oportunista e não contagioso, assim como nas outras espécies. Situações de estresse causadas pelo calor, transporte, captura e manejo, além de uso de medicamentos por longo prazo e fatores ambientais como falta de ventilação e consequente inalação massiva de esporos reprodutivos do fungo, faz com que a enfermidade se desenvolva (FORBES, 1991; AGUILAR; REDIG, 1995; OGLESBEE, 1997; FORBES, 1999; STONE; OKONIEWSKI, 2001).

Em mamíferos a micose é menos frequente e ocorre como uma doença individual, não contagiosa. Os cães geralmente adquirem a doença pela inalação dos conídios do ambiente (QUINN et al., 1994; DAY, 1998; TELL, 2005). Os fatores que predispõem os canídeos a aspergilose são diversos, tais como alterações climáticas, baixa imunidade do hospedeiro e uso excessivo de antibióticos, corticosteroides, além da predisposição genética, com maior incidência em animais com menos de oito anos e de raças dolicocefálicas e mesaticefálicas (SHARP, 1998; TASKER et al., 1999; SAUNDERS et al., 2003; 2004; TELL, 2005). Em cães, as formas nasal e disseminada são mais comuns (CABANA et al., 2012a).

Nos equídeos, ovinos e bovídeos, a aspergilose representa grandes perdas econômicas na produção, causando placentites, abortos, e, em até 24% dos casos, dermatites, ceratomicoses, sinusites e infecções de bolsa gútural (AINSWORTH; AUSTWICK, 1973; ZOOK; MIGAKI, 1985; ANDREATTI FILHO, 2000; GANCEDO; GRANDES; DIEZ, 2000; MACHADO et al., 2005; TELL, 2005; TSUJITA; PLUMMER, 2012).

No Brasil, em bovinos já foram relatados aborto associado a broncopneumonia causados por *Aspergillus* sp. (SANTOS; FARIA, 1959), e abortos micóticos com agentes causais como *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* (CORBELLINI et al., 2003). *Aspergillus fumigatus* é a principal espécie causadora destas perdas reprodutivas em bovinos e equídeos, sendo isolada em aproximadamente 60-75% dos casos onde o tecido placentário é o mais afetado (HILLMAN, 1969; HILL et al., 1971; AINSWORTH; AUSTWICK, 1973). O diagnóstico é feito através de exames

laboratoriais micológicos clássicos, histopatologia e ELISA indireto (GARCIA et al., 2008).

Em felinos raros casos de aspergilose orbital foram relatados, porém esta micose já é considerada emergente na espécie (BARACHETTI et al., 2009; GIORDANO et al., 2010; SMITH; HOFFMAN, 2010). Comumente a aspergilose sino-orbital em felinos é causada por *A. fumigatus*, havendo 23 relatos de envolvimento de *A. fumigatus*, *Neosartorya fischeri* e *A. lentulus* como agentes causais (BARRS et al., 2012). Entretanto há relatos de envolvimento de *A. udagawae* e *A. viridinutans*, agentes da seção Fumigati, antes apenas encontrados causando aspergilose invasiva em humanos (ALCAZAR-FUOLI et al., 2008; KANO et al., 2012) .

Em animais selvagens existem relatos de aspergilose pulmonar, causada por *A. corymbifera* e *A. fumigatus* (MONTEROS et al., 1999) e abscessos no parênquima pulmonar (EGGERT; ROMBERG, 1960; GRIFFIN, 1969; PICKETT et al., 1985; SEVERO et al., 1989; EL-KHOULY et al., 1992).

2.2 Aspectos históricos

A denominação *Aspergillus* foi utilizada pela primeira vez pelo padre italiano P.A. Micheli, em alusão ao aspersório (*aspergillum*), instrumento de estrutura semelhante à estrutura de esporulação do fungo (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004).

A doença foi primeiramente relatada em 1847 (Sluyter) e 1856 (Virchow). Em 1926, Thom e Church publicam o livro *The Aspergilli* (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004). Em 1952 Hinson descreveu problemas respiratórios e alérgicos associados ao fungo. A classificação inicial destes fungos data de 1979, sendo que em 1988 Samson & Pitt estabeleceram a classificação atualmente utilizada para o gênero *Aspergillus* (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004).

O gênero *Aspergillus* sp. foi descrito pela primeira vez por Rayer e Montagne (1842) nos sacos aéreos de um curió (*Oryzoborus angolensis*) e em aves selvagens no início dos anos 1800 (RICHARD, 1997; FRIEND; FRANSON, 1999; RAMIREZ; CHAVEZ; VELASCO, 2002).

Raper & Fennell em 1965 identificaram 132 espécies subdivididas em 18 grupos do gênero *Aspergillus*. Porém, em função de novos métodos de classificação e identificação baseados em filogenia, morfologia e técnicas biomoleculares muitas

espécies novas de *Aspergillus* estão sendo descritas correlacionando o gênero com seus teleomorfos (FELSENSTEIN, 1985; GEISER; FRISRAD; TAYLOR, 1998; KLICH, 2002; KATZ et al., 2005).

Nos últimos 15 anos, a aspergilose tornou-se uma micose de importância extraordinária na área da saúde, devido ao aumento concomitante do número de pacientes imunossuprimidos predispostos a infecções e pela contribuição das alterações climáticas globais, que favorecem e criam um ambiente ideal ao surgimento dos fungos ubíquos como causadores de enfermidades, caso do *Aspergillus* sp. Neste contexto, a aspergilose, é considerada a micose mais frequente envolvida na mortalidade de pacientes imunossuprimidos (LATGÉ, 1999; STEVENS et al., 2000; WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000).

2.3 Morfologia fúngica

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem a divisão Eucomycota, subdivisão Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales, família *Aspergillaceae* e apresentam as formas anamórfica, reproduzindo-se assexuadamente através de conídios originados de uma célula conidiogênica, e teleomórfica, reproduzindo-se sexuadamente através de ascósporos contidos em ascos (LATGÉ, 1999; LARONE, 2002; LACAZ et al., 2002; XAVIER; FARIA, 2009).

São fungos filamentosos com hifas hialinas, septadas, ramificadas em ângulo agudo de 45°, que possuem estruturas de reprodução assexuada em forma de vesícula e um prolongamento característico conhecido como conidióforo. Existe ainda um conjunto de células conidiogênicas denominadas fiálides, todas estas estruturas formam a cabeça aspergilar (SHARMA; CHWOGULE, 1998; LACAZ et al., 2002) que é sustentada pelo conidióforo, perpendicular a célula-pé. Os fialoconídeos são produzidos pelas fiálides as quais são dispostas diretamente na vesícula nas espécies unisseriadas, como por exemplo, *A. fumigatus* (LATGÉ, 1999; LACAZ et al., 2002), ou associadas a métulas nas espécies bisseriadas, como em *A. nidulans* (LATGÉ, 1999; LACAZ et al., 2002).

Na macromorfologia do gênero observam-se superfícies de coloração branca em sua fase inicial de crescimento, com o passar do tempo as espécies desenvolvem colorações típicas como verde, amarelo, alaranjado, castanho ou preto. No seu anverso apresentam-se geralmente nas cores branca, dourada ou

acastanhada (KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). A textura varia de algodonosa a pulverulenta, podendo apresentar-se rugosas, de aspecto coreaceo (LARONE, 2002; LACAZ et al., 2002).

Aspergillus fumigatus apresenta conídios de pequeno tamanho (2-3 µm) e tem como característica principal ser termotolerante, o que favorece sua implantação no sistema respiratório e sua disseminação no ambiente (LATGÉ, 1999; BULPA; DIVE; SIBILLE, 2007).

2.4 Etiologia e epidemiologia

Os fungos do gênero *Aspergillus* são ubíquos de distribuição universal, cosmopolitas podendo ser encontrados no solo, água, plantas, ar e material em decomposição. Excepcionalmente esses fungos filamentosos são considerados sapróbios do trato respiratório alto (HORVATH; DUMMER, 1996; EINSELE et al., 1998; LATGÉ, 1999; HERBRECHT et al., 2004; XAVIER; FARIA, 2009).

O gênero *Aspergillus* possui aproximadamente 200 espécies fúngicas, destas cerca de 20 são consideradas potencialmente patogênicas e apenas cinco conseguem desenvolver-se em temperaturas de 35-37°C (ABARCA, 2000; KLICH, 2002; TELL, 2005).

As espécies mais importantes são *Aspergillus fumigatus*, espécie termotolerante, mais relatada em países subtropicais; e *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. terreus*, comumente encontradas em países de clima temperado (O'FEL, 1997; LATGÉ, 1999; MARR; PATTERSON; DENNING, 2002; RAJA; SINGH, 2006).

Aspergillus fumigatus é responsável por aproximadamente 90-95% das infecções fúngicas invasivas em humanos e animais (LATGÉ, 1999; ARAÚJO et al., 2005; XAVEIR et al., 2007, 2011). A capacidade de invasão e multiplicação dos *Aspergillus* está diretamente relacionada a virulência da cepa, resposta imune do hospedeiro, exposição ao agente e quantidade de conídios inalados pelo hospedeiro. Atualmente, registra-se aumento de infecções fúngicas por *Aspergillus* não-*fumigatus*, com taxas de 25% na aspergilose pulmonar (O'FEL, 1997; RICHARDSON; WARNOCK, 2003; RICHARDSON, 2005).

A caracterização das espécies utiliza chaves de identificação, cruzando características macro e micromorfológicas (RAPER; FENNELL, 1965; ABARCA, 2000; KLICH, 2002). As novas taxonomias do gênero são classificadas utilizando

caracteres fenotípicos e sequências de DNA multigênicas, abordando micro e macromorfologia, fisiologia e produção de metabólitos. Assim, atualmente novos “taxon” foram adicionados ao gênero, como *Emericella* e *Neosartorya* (KOZAKIEWICZ, 1989; PETERSON et al., 2001; BULPA; DIVE; SIBILLE, 2007; DEAK; BALAJEE, 2010). A classificação taxonômica tradicional dos *Aspergillus* com base apenas nos caracteres fenotípicos nos mostra uma delimitação de taxon satisfatória. Porém, as várias seções com grande variação morfológica de gênero podem resultar em esquemas taxonômicos discutíveis, por isto precisam estar bem estabelecidas para servirem de referência a novas taxonomias. Assim, as principais espécies do gênero: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* passam a ser tratadas como complexos ou seções, acrescentando diversas e diferentes espécies, com distinta suscetibilidade antifúngica (BULPA; DIVE; SIBILLE, 2007; DEAK; BALAJEE, 2010).

As novas classificações, estudadas a partir de 2005 são *Aspergillus* seção Circumdati, Flavi, Fumigati e Nigri, demonstrando que cada táxon *Aspergillus* tem um perfil diferenciado, diferente do estudado e elucidado anteriormente (KOZAKIEWICZ, 1989; PETERSON et al., 2001; SANSON; HONG; FRISVAD, 2006). Na seção Fumigati as variedades de espécies são identificadas de acordo com as características macro e micromorfológicas, características de crescimento (tempo, temperatura, umidade) e perfis de β -tubulina no sequenciamento de genes, além de genes de calmodulina e actina sequenciados por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), cromatografia gasosa e HPLC (*High performance liquid chromatography*) (FRISVAD; THRANE, 1987; SMEDSGAARD, 1997).

Neosartorya pseudofischeri, um teleomorfo de *Aspergillus* também foi relatado como potencial agente patogênico e *A. lentulus* foi descrito como um agente patogênico relacionado com *A. fumigatus* (VARGA et al., 2000; WALSH et al., 2003).

Aspergillus lentulus é uma espécie de distribuição mundial, podendo ser isolada do solo, ar e ambientes clínico-hospitalares (BALAJEE et al., 2005), que difere fenotipicamente das demais pelo sequenciamento de cinco genes (MITCHELL; SLIGHT; DONALDSON, 1997; HONG et al., 2005; BALAJEE et al., 2005). Esta espécie difere de *A. fumigatus* pelas estruturas micromorfológicas mais finas, menores, predominante presença de vesículas globosas e crescimento em aproximadamente 108°C de temperatura (termotolerante) (BALAJEE et al., 2005).

Outros fungos pertencentes a secção Fumigati como *A. fumisynnematus* são considerados como espécie distinta pelas características de seus conidióforos curtos, suportados por hifas aéreas em forma de funículo, sendo agrupado em outro taxa na secção Fumigati, devido também ao seu tipo de sequenciamento do gene b-citocromo (HORIE et al., 1993; WANG et al., 2000). *A. arvii*, descrito por Aho et al. (1994) tem como característica macroscópica colônia de coloração amarronzada. Embora as informações destes dois fungos indiquem participação na secção Fumigati, é impossível determinar sua posição taxonômica (LARSEN et al., 2005).

Quando se trata de *A. novofumigatus*, a produção de alcalóides apolares (de estrutura química ainda desconhecida) indica que este táxon poderia ter uma capacidade de produzir ascos ou esclerócios, estruturas estas que são morfologicamente importantes nos ascomicetos do gênero *Neosartorya*, relacionando quimicamente espécies anamorfias e teleomorfias de *Aspergillus* (KOZAKIEWICZ, 1989; BALAJEE et al., 2005; SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006).

Pringle, Baker & Platt (2005) detalha através de técnicas moleculares *A. fumigatus* e seus taxon relacionados, demonstrando dois diferentes taxon com distribuição global, já Katz et al, (2005) demonstrou características genéticas distintas em grupos isolados de *A. fumigatus*. Ressalta-se que *A. fumigatus* já teve seu genoma completamente sequenciado (NIERMAN; PAIN; ANDERSON, 2005; GALAGAN et al., 2005).

Aspergillus niger causam deterioração de alimentos e materiais, sendo extensivamente utilizados para fins biotecnológicos, como produção de enzimas e ácidos orgânicos, podendo, no entanto, ser potenciais patógenos (SCHUSTER et al., 2002). A taxonomia dos *Aspergillus* secção Nigri foi recentemente revisada. Monsseray (1934) descreveu 35 espécies de *Aspergillus niger*, Raper & Fennell (1965) 12 e Al-Musallam (1980) sete espécies (*A. japonicus*; *A. carbonarius*; *A. ellipticus*; *A. heliothrix*; *A. heteromorphus*; *A. foetidus*; *A. niger*). Atualmente 19 espécies de *Aspergillus* secção Nigri são aceitas, e estudos identificaram ainda quatro outros isolados que não se encaixam nesse grupo (VARGA et al., 2011).

Aspergillus flavus foi descrito por Raper & Fennell (1965) como um grupo com nove espécies e duas variedades, baseado nas características micromorfológicas das cabeças conidiais e ornamentação destes conídios. A secção Flavi atualmente possui 18 espécies aceitas. Vários estudos tem incluído na secção Flavi espécies como *Petromyces alliaceus*, *P. albertensis* e *A. lanosus* (SAMSON; PITT, 2000; FRISVAD;

SAMSON, 2000), além de *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. tamarii*, *A. leporis*, *A. caelatus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus* e *A. avenaceus* (MURAKAMI; HAYASHI; USHIJIMA, 1982; SAITO; TSUROTA, 1993; FRISVAD; SAMSON, 2000).

A espécie *A. oryzae* teve seu genoma totalmente sequenciado, com isso seu DNA pode ser utilizado para comparação com outros *Aspergilli* (MACHIDA et al., 2005; GALAGAN et al., 2005).

Dentre os métodos modernos para identificação de *Aspergillus* estão os métodos fenotípicos de foto análise de imagem de colônias de fungos, analisando cores e textura, metabólitos secundários, íons seletivos, detecção de gliotoxinas, cromatografia gasosa, gel de eletroforese, imunoensaio enzimático colorimétrico, PCR e métodos imunológicos (DORGE; FRISVAD; CARSTENSEN, 2000; LARSEN et al., 2005).

Os sistemas biomoleculares também possuem suas limitações e devem ser testados utilizando-se diversos isolados dos fungos relacionados com o problema em questão e recorrer muitas vezes a sequencias de genes diferentes para obter-se especificidade suficiente (GIL-LAMAINERE et al., 2003; DEAN et al., 2005).

2.5 Patogenia e fatores predisponentes

Os fungos do gênero *Aspergillus*, liberam no ambiente durante sua reprodução uma grande quantidade de conídios de tamanhos variados dependendo da espécie (LATGÉ, 1999; 2001). Assim, constantemente o hospedeiro está em contato com estes conídios na atmosfera, que apresentam altas e rápidas taxas de crescimento e podem colonizar a mucosa respiratória através da inspiração (TEKAIA; LATGÉ, 2005). Estes propágulos são primariamente fagocitados e destruídos pelos macrófagos alveolares e outras células de defesa presentes na mucosa do trato respiratório (GALLIEN et al., 2008).

As infecções respiratórias ocorrem após a inalação de grande quantidade de conídios, porém o período de incubação e desenvolvimento de sinais é desconhecido e variável conforme o hospedeiro, sugerindo que apenas ocorrerá doença na presença de imunossupressão (O'FEL, 1997; RICHARDSON; WARNOCK, 2003; SAMARAKOON; SOUBANI, 2008).

As lesões são causadas pela produção de enzimas, adesinas, hemolisinas, proteases, peptidases e toxinas como fumagilina e gliotoxinas, liberadas pelo fungo, e associadas a deficiente resposta imune do hospedeiro (BLANCO et al., 1998; LATGÉ, 1999, 2001; LEWIS et al., 2005; SHOHAM; LEVITZ, 2005). Estas facilitam a colonização e a adesão do fungo na superfície corporal do hospedeiro, permitindo assim a invasão dos tecidos (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002; GALLIEN et al., 2008). Em contrapartida, o aspergiloma, ou bola fúngica, desenvolve-se em cavidade pré-existent de indivíduos imunocompetentes (CARVALHO-DIAS et al., 2008). Já a aspergilose broncopulmonar alérgica, configura uma reação de hipersensibilidade a presença dos fungos nas vias aéreas (CARVALHO-DIAS et al., 2004; AQUINO et al., 2010).

Passando por todas estas barreiras de proteção do organismo, os *Aspergillus* podem invadir a parede das vias aéreas e veias e artérias pulmonares adjacentes, causando trombose, necrose tecidual e disseminação sistêmica no organismo acometido (CAILLOT et al., 1997).

A maior suscetibilidade das aves em geral e principalmente dos pinguins à aspergilose é explicada anatomicamente pela ausência de epiglote, que facilita a passagem de partículas para o trato respiratório inferior, complementada pelo sistema mucociliar escasso, ausência de diafragma, resultando em ausência do reflexo da tosse e presença de sacos aéreos, estruturas ricas em oxigênio e pouco vascularizadas (BAUCK, 1994; TELL, 2005). A hipovitaminose A tem sua importância, pois transforma o epitélio escamoso estratificado da região da siringe, causando hipertrofia e hiperqueratose, que facilitam a colonização por conídios de *Aspergillus* spp. (BAUCK, 1994).

Além disso, a falta de macrófagos de superfície para fagocitose de conídios de *Aspergillus* spp. e a substituição de neutrófilos por heterófilos de baixa peroxidação, que utilizam proteínas catiônicas, hidrolases e lisozimas ao invés de mieloperoxidase e mecanismos oxidativos para destruição das hifas fúngicas contribui para a infecção fúngica em aves em geral e consequentemente nos pinguins (TELL, 2005). Outros fatores de manejo como transporte, superlotação, má nutrição, ventilação pobre, antibioticoterapia, administração de corticosteróides, doenças concomitantes e irritantes respiratórios (ex.: amônia, fumaça, desinfetantes voláteis) são considerados importantes e aumentam essa suscetibilidade (BAUCK, 1994; TELL, 2005).

2.6 Imunologia na aspergilose

O fator mais importante para o estabelecimento da aspergilose é o estado imunológico do hospedeiro, contribuindo em menor escala a patogenicidade e virulência do fungo (WANKE; LAZERA; NUCCI, 2000; LATGÉ; CALDERONE, 2002).

Primordialmente as infecções fúngicas são debeladas por reações mediadas por células, isto é observado principalmente nas infecções cutâneas em que elas são autolimitantes. A resistência é baseada na reação de hipersensibilidade do tipo IV frente a alguns antígenos e as micoses crônicas são resultantes da falha na montagem da reação tipo IV, ou seja, na resposta imune celular. Nas micoses respiratórias, o quadro da resposta imune se dá através de infiltrado de linfócitos, células epitelióides e gigantes ao redor do fungo, tentando debelá-lo (MACHADO; MACHADO, 1992).

A imunidade adaptativa tem sido considerada como a principal proteção contra as infecções fúngicas, porém a resposta inata também faz parte deste processo, corroborando para uma proteção eficaz. A imunidade adaptativa proporciona uma gama de respostas efetoras e reguladoras contra infecções fúngicas, as respostas de Th1 protegem contra a maioria das formas de micoses, associadas a persistência limitada do patógeno no sítio de infecção, em contrapartida, as respostas de Th2 melhoraram a tolerância a infecções fúngicas, permitindo assim uma memória imunológica de longa duração (HAMAD, 2012).

Os mecanismos de defesa contra infecções fúngicas se baseiam inicialmente em barreiras muco-cutâneas, que na função de primeira linha de defesa ajudam a debelar os organismos fúngicos patogênicos e mantem equilibrados a microbiota fisiológica e transitória. Tal fato ocorre devido a acidez do meio e hiperplasia celular agindo como fatores de proteção destes locais de primeira defesa (LATGÉ, 2001).

A segunda linha de defesa contra organismos fúngicos são especificamente os neutrófilos, heterófilos (nas aves) e macrófagos, que agem fagocitando os organismos que ultrapassaram a barreira primária de defesa, impedindo a invasão de tecidos mais profundos (SHOHAM; LEVITZ, 2005).

As células fagocíticas e o epitélio do trato respiratório secretam algumas proteínas e peptídeos que possuem atividade antimicrobiana e imunomoduladora, participando da defesa inata contra os agentes etiológicos agressores (lactoferrina,

lisozima, proteínas do surfactante) (SHOHAM; LEVITZ, 2005; ROGAN et al., 2006; KNUTSEN; SLAVIN, 2011).

Quando esta função dos macrófagos alveolares é falha, os conídios inalados germinam e originam as hifas, estruturas de fixação do fungo no trato respiratório. Estas hifas causam invasão tecidual e se instalam neste sistema do organismo comprometendo o prognóstico do paciente, sendo destruídas por mecanismos oxidativos, advindos da degranulação de neutrófilos com liberação de enzimas líticas na superfície da estrutura fúngica (LATGÉ, 1999; SHOHAM; LEVITZ, 2005; SINGH; PATERSON, 2005). As células CD4 + T, geram respostas aos propágulos de *Aspergillus* sp. e são induzidas a gerar uma resposta de Th2 com a produção de IL- 4, IL-5, IL-13 e citocinas (KNUTSEN; SLAVIN, 2011).

As células dendríticas possuem um papel fundamental na modulação da resposta imune contra a aspergilose, através das citocinas inflamatórias (interleucinas, fator de necrose tumoral) no sítio de infecção, pela apresentação de antígenos aos linfócitos locais, e pela internalização do agente, carreando-o até o baço e aos linfonodos regionais, no caso dos mamíferos, para apresentá-lo e transmitir a informação aos linfócitos T (LATGÉ, 2001; SHOHAM; LEVITZ, 2005; HAMAD, 2012).

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

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

Nas aves, a exposição natural aos patógenos endêmicos do ambiente constitui um desafio para o sistema imune. Nesta situação, ocorrem alterações

metabólicas específicas que desviam nutrientes necessários por causa da elevação dos níveis de cortisol (estresse imunológico) para uma imediata sobrevivência do hospedeiro e ainda prolongam a resposta imune contra organismos invasores. Como resultado há uma redução nas taxas de crescimento e piora na conversão alimentar, refletindo em uma baixa condição corporal destes animais, pois os nutrientes básicos foram desviados para as respostas imunes (BAINS, 1995). Ainda podemos ressaltar a importância da senilidade do sistema imune, que pode ser dosada através do teste de fitohemaglutina (PHA) em aves (BARUA; YOSHIMURA, 1999; PARMENTIER et al., 2004), onde ocorre redução das células imunes conforme a idade mais avançada do animal, prejudicando a resposta imune a patógenos mediada por células, conforme já descrito em estudos de Smits et al. (1999) e Losano & Lank (2003).

2.7 Sinais clínicos e formas clínicas

A apresentação clínica da doença pode ser variada e depende do sítio anatômico e das diferentes espécies de *Aspergillus*. Podem ocorrer desde processos alérgicos simples até infecções sistêmicas (DENNING, 2010).

Em humanos a aspergilose invasiva é a forma clínica mais frequente desde a década de 90. Atualmente apresenta elevadas taxas de mortalidade causadas principalmente por *A. fumigatus* (YAMAZAKI et al., 1999; KONTOYIANNIS; BODEY, 2002; MARR; PATTERSON; DENNING, 2002).

Nos canídeos a doença pode ocorrer na forma sinonasal afetando seios paranasais, cornetos, caracterizando-se por espirros, descarga nasal mucopurulenta, epistaxe, dor e despigmentação nasal, bem como lesões oculares. Há predisposição principalmente nas raças dolicocefálicas (XAVIER; FARIA, 2009). Rinite primária ou associada a sinusite são descritas (CASWELL; WILLIAMS, 2007), acometendo também felinos (BARACHETTI et al., 2009).

Em equídeos a infecção aspergilar ocorre principalmente nas bolsas guturais e em casos de placentite micótica, e também na forma de sinusites (KENDALL et al., 2008), considerada rara em outras espécies (CASWELL; WILLIAMS, 2007). Nos ruminantes causa aborto, placentite necrótica e em casos esparsos pneumonias com respiração estertorosa, superficial e tosse úmida. Em muitos casos podem

ainda ocorrer mastite fúngica pré ou pós-parto com lesões sistêmicas iniciadas por secreção inflamatória e purulenta no úbere (XAVIER; FARIA, 2009).

As aves podem apresentar dermatite necrótica, ceratite e lesões extensas ou focais no trato respiratório inferior, de forma aguda ou crônica (XAVIER et al., 2007; XAVIER et al., 2011). A forma aguda ocorre a partir da inalação e germinação de grande concentração de conídios, com rápida e massiva colonização fúngica, formando granulomas miliares nos pulmões e curso clínico rápido. É vista com maior frequência em aves selvagens ou silvestres de cativeiro como psitacídeos encontrados em más condições sanitárias (REDIG, 1993; 1986; 2000; AGUILAR; REDIG, 1995; ROSSKOF; WOERPEL, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998). O principal sinal clínico é dispneia intensa, evoluindo para o óbito em aproximadamente sete dias (FORBES, 1991; AGUILAR; REDIG, 1995; ROSSKOF; WOERPEL, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998; YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998).

Na aspergilose crônica ocorrem granulomas no trato respiratório que tendem a se disseminar para órgãos adjacentes mais lentamente. É a forma mais comum da doença encontrada em aves e geralmente ocorre após um evento de estresse ou imunossupressão (REDIG, 1986; AGUILAR; REDIG, 1995; OGLESBEE, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998; YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998). A aspergilose crônica é dividida em focal e generalizada, mas as formas podem coexistir (REDIG, 1993; 2000; BAUCK, 1994; AGUILAR; REDIG, 1995; RICHARD, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998; RAMIREZ; CHAVÉZ; VELASCO, 2002).

A forma focal se subdivide em nasal e traqueal, a primeira é localizada na narina ou coana do animal, envolve lesões em seios e ossos nasais e pode ser unilateral ou bilateral. Causa granulomas com focos necróticos, cercados por macrófagos, heterófilos, e células gigantes (BAUCK, 1994; AGUILAR; REDIG, 1995; ROSSKOF; WOERPEL, 1997). A forma traqueal é caracterizada por lesões na siringe e traquéia, local anatomicamente estreito, favorecendo a deposição de conídios e formando lesões com detritos necróticos e exsudato caseoso, que reduzem a passagem de ar levando à dispneia intensa (REDIG, 1993; 2000; BAUCK, 1994; AGUILAR; REDIG, 1995; OGLESBEE, 1997; FORBES, 1999; RAMIREZ; CHAVEZ; VELASCO, 2002).

A forma generalizada acomete tecido pulmonar que apresenta granulomas em toda a sua extensão e sacos aéreos, além de exsudato supurativo acumulado nos brônquios (BIRBERSTEIN; ZEE, 1990; QUINN, 1994; AGUILAR; REDIG, 1995;

YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998; CORK et al., 1999; FRIEND; FRANSON, 1999; RAMIREZ; CHAVEZ; VELASCO, 2002). Pode ocorrer disseminação via hematogêna para ossos, pericárdio e outros tecidos adjacentes, ainda encefalite e meningoencefalite (RICHARD, 1997; ROSSKOPF; WOERPEL, 1997; ATKINSON; BROJER, 1998; FRIEND; FRANSON, 1999; AKAN et al, 2002). Em sacos aéreos a evolução é lenta (BIBERSTEIN; ZEE, 1990; AGUILAR; REDIG, 1995; OGLESBEE, 1997; RICHARD, 1997; ROSSKOPF; WOERPEL, 1997; YOUNG; CORNISH; LITTLE, 1998; REDIG, 2000; RAMIREZ; CHAVEZ; VELASCO, 2002).

Dermatologicamente ocorre dermatite granulomatosa necrótica, com raros relatos em aves (ATKINSON; BROJER, 1998; ABRAMS et al., 2001). A apresentação oftálmica pode ser superficial ou de tecidos da conjuntiva, formando placas de exsudato caseoso, ou na membrana nictitante e com disseminação hematogêna a partir de uma infecção primária atingindo o globo ocular, posteriormente acometendo o humor vítreo (RICHARD, 1997; FRIEND; FRANSON, 1999; ABRAMS et al., 2001; AKAN et al., 2002). Hifas fúngicas, heterófilos, macrófagos e debris celulares podem ser observados na retina (RICHARD, 1997; REDIG, 2000).

Nos pinguins, a aspergilose ocorre em animais cativos e em centros de recuperação, os quais são mais suscetíveis, em função da imunossupressão causada pelo estresse associado à captura, manejo, manutenção e/ou reabilitação de animais petrolizados (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; CUBAS; SILVA; CATÃO, 2006;). Os sinais clínicos são inespecíficos, como letargia, inapetência, perda de peso, isolamento do grupo, dispneia e regurgitação (CUBAS; SILVA; CATÃO, 2006; XAVIER, 2007).

2.8 Patologia

Na espécie humana, histologicamente a aspergilose é caracterizada pela invasão tecidual das hifas e consequente necrose tecidual de pulmões, traquéia, pericárdio e esôfago, causando também isquemia e infarto na forma invasiva (BULPA; DIVE; SIBILLE, 2007; PAUW et al., 2008). Na rinosinusite observam-se bolas fúngicas preenchendo os seios paranasais dos hospedeiros, rede de hifas causando destruição tecidual óssea e cartilaginosa e possíveis calcificações de estruturas (CAMELI-ROJAS et al., 2004).

Em canídeos observam-se lesões em seios nasais e paranasais caracterizadas por placas acinzentadas, necróticas e de crescimento fúngico evidente, podendo ocorrer destruição óssea adjacente (SHARP, 1998; ZONDERLAN et al., 2002). Nos equídeos e ruminantes, ocorre guturocistite com espessamento e hemorragia da mucosa da bolsa gutural e espessamento e necrose dos cotilédones da placenta respectivamente, em ambos os casos podemos encontrar hifas de *Aspergillus* sp. infiltradas nos tecidos dos órgãos acometidos (ANDREATTI-FILHO, 2000; GANCEDO; GRANDES; DÍEZ, 2000; TELL, 2005). Nas mastites aspergílares o tecido do úbere é encontrado hemorrágico e com fibroses, além de lesões nodulares granulomatosas e caseosas encontradas nos tecidos adjacentes.

Nas aves em geral, sejam elas domésticas e silvestres, igualmente em aves aquáticas como os pinguins, encontram-se granulomas branco amarelados em pulmões, e sacos aéreos espessos e opacos com a presença de granulomas miliares e fibrose, além de hiperemia, edema e congestão pulmonar (BAUCK, 1994; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003; TELL, 2005; XAVIER et al., 2007; 2008a; 2011). Nas estruturas de maior aeração, como sacos aéreos e siringe, podem ser observadas estruturas completas de frutificação do fungo, com cabeça aspergilar completa; este achado é comum em aves, pelas suas características anatômicas e ainda pela sua sensibilidade a gliotoxina (KEARNS; LOUDIS, 2003; XAVIER et al., 2007; 2008 a,b; XAVIER et al., 2011). Já, em todas as espécies podem ser observadas em tecidos acometidos pelo fungo hifas hialinas, septadas, bifurcadas em ângulo agudo (45°) (PÉREZ; CARRASCO, 2000; TELL, 2005).

2.9 Diagnóstico

O diagnóstico da aspergilose é multivariado e acontece primeiramente da forma clássica em micologia com o cultivo de amostras clínicas e microscopia direta para demonstrar a presença ou não de fungos do gênero *Aspergillus* (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). Estes métodos diagnósticos devem ser aliados a história clínica do paciente, presença de sinais clínicos como ausência de respostas a antibioticoterapia ou corticoidoterapia, situações de estresse, doenças de base, no entanto não são definidores da doença clínica. Em adição, outros exames auxiliares podem ajudar no diagnóstico final, como raio-x, ultrassom, tomografia, além de

endoscopias e hemograma (LATGÉ, 1999; XAVIER et al., 2007; 2011; CABANA et al., 2012b).

No método micológico tradicional, as espécies de *Aspergillus* crescem facilmente em meio de cultivo clássico como ágar Sabouraud dextrose e desenvolvem colônias fúngicas pulverulentas em 24-48 horas de incubação a 25-37° (MARR; PATTERSON; DENNING, 2002). Os meios de cultivo específicos para identificação de espécies de *Aspergillus* como ágar Czapeck, ágar Malte e ágar Potato Dextrose (PDA) auxiliam na identificação das espécies (GAVA, 2002; KLICH, 2002).

As cepas de *A. fumigatus* apresentam crescimento rápido, coloração do verso azul-esverdeada e reverso branco a amarelado. Microscopicamente apresentam conidióforos lisos e hialinos, vesícula piriforme e fiálides unisseriadas (XAVIER; FARIA, 2009). *A. flavus* apresentam textura arenosa, presença de esclerócios e coloração amarelo-esverdeada. Microscopicamente observamos conidióforo incolor, vesícula esférica e fiálides unisseriadas ou bisseriadas (LACAZ et al., 2002; KLICH, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). As colônias de *A. niger* apresentam-se primordialmente de coloração branca e adquirem com o tempo a coloração negra de textura arenosa. Microscopicamente são observados conidióforos de parede espessa, vesícula semi-globosa, métulas e fiálides com distribuição radial (KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002). *A. terreus* tem coloração bege e textura flocosa. Microscopicamente são observadas fiálides bisseriadas, vesículas globosas e conidióforos lisos (KLICH, 2002).

No exame microscópico direto das amostras clínicas realizado a fresco, com calcofluor branco, ou solução de hidróxido de potássio (KOH) 10-30% podem-se observar hifas septadas, ramificadas em ângulo agudo de 45° (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007).

No entanto, a sensibilidade e especificidade destes testes micológicos clássicos variam de acordo com o tipo de amostra e forma de coleta da mesma. Considera-se que a interpretação deve ser rigorosa, visto que os fungos do gênero *Aspergillus* são ubíquos e anemófilos, podendo ser contaminantes de laboratório e microbiota residente e transitória do trato respiratório (XAVIER; FARIA, 2009).

O cultivo de secreções respiratórias possui sensibilidade diagnóstica muito baixa. Estudo com humanos demonstrou baixa recuperação fúngica de 8-34% de amostras de escarro e 45-62% de lavado broncoalveolar (LBA). Do mesmo modo

culturas de sangue, líquido cefalorraquidiano e medula óssea são também raramente positivas (KAHN; JONES; ENGLAND, 1986; HORVATH; DUMMER, 1996; STEVENS et al., 2000).

O grande desafio no manejo das enfermidades causadas por *Aspergillus* sp. é a obtenção de diagnóstico definitivo precoce, para tanto, utiliza-se exames como histopatologia, hematologia ou sorologia (XAVIER et al., 2011).

Na histopatologia os tecidos acometidos pelo agente e corados com HE (hematoxilina-eosina), Gomori Grocott ou ácido periódico de Schiff (PAS) demonstram a presença de estruturas fúngicas e inflamação decorrente (BAUCK, 1994; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Os achados no hemograma são inespecíficos e se interpretados individualmente não servem como parâmetro diagnóstico. Em casos iniciais pode ocorrer normalidade dos parâmetros hematológicos, ou leucocitose com neutrofilia/heterofilia. Em casos crônicos monocitose e linfopenia, acompanhado de anemia não regenerativa, hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia podem ser encontrados (REDIG, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003).

O diagnóstico sorológico da aspergilose atualmente se baseia em técnicas como IDGA (Imunodifusão radial dupla em gel de ágar) e ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), além de técnicas de PCR (*Polymerase chain reaction*). A sorologia permite diagnóstico *in vivo* preciso e precoce (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; GRACZYK; CRANFIELD, 1995; GRACZYK; CRANFIELD; KLEIN, 1998; STEVENS et al., 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; BURCO et al., 2012). A detecção de galactomanana (GM), polissacarídeo termo-estável presente na parede celular dos fungos e liberado durante o crescimento das hifas nos tecidos é um método utilizado para monitorar pacientes em risco de aspergilose invasiva (MENNINK-KERSTEN; DONNELLY; VERWEIJ, 2004). Este polissacarídeo é detectado pela técnica de ELISA sanduíche, através do teste comercial Platelia *Aspergillus*® (BioRad- França) que apresenta alta especificidade e sensibilidade, detectando níveis baixos da GM circulante no plasma sanguíneo ou outros fluídos corporais (STYNEN et al., 1995; VERWEIJ et al., 1995; HOPWOOD et al., 1995; MENNINK-KERSTEN; DONNELLY; VERWEIJ, 2004; ARCA-RUIBAL et al., 2006; AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTTO, 2007; CRAY et al; 2011).

Em testes de detecção de GM, os resultados falso-positivos são atribuídos ao uso de moléculas de antibióticos beta-lactâmicos, como a piperacilina-tazobactam,

de origem fúngica, que consequentemente apresentam em sua composição moléculas de galactofuranose, reagindo os anticorpos utilizados no teste (MAERTENS; THEUNISSEN; LAGROU, 2010). Do mesmo modo, o gluconato de sódio é produzido pela fermentação da glicose em culturas de fungos gerando reações com o teste ou reações cruzadas com outros fungos que podem reagir com os anticorpos do teste. Ou ainda em casos de bacteremia e ingestão de leite ou outros alimentos que contenham resquícios de *Aspergillus* sp. ou *Penicillium* sp. em sua composição (ANSORG; VAN DEN BOOM; RATH, 1997; AQUINO; GOLDANI; PASQUALOTTO, 2007).

A IDGA é usada como teste padrão-ouro para diagnóstico de aspergilose em algumas espécies, apresentando taxas de sensibilidade e especificidade superiores a 80%, como em cães com aspergilose sinonasal, humanos com aspergiloma (“bola-fúngica”) e rinosinusites (SHARP et al., 1984; BABATASI et al., 2000; CAMELI-ROJAS et al., 2004). Características como fácil operacionalização, especialmente no processamento de pequeno número de amostras, baixo custo, quantificação de imunoglobulinas séricas e mínima exigência de estrutura e equipamentos laboratoriais fazem da IDGA um teste diagnóstico atrativo (LANE; WARNOCK, 1977; POLI et al., 1981; BILLEN et al., 2009).

A técnica de IDGA ocorre através da difusão de antígeno e anticorpo em um meio semisólido (gel de ágar ou agarose), onde os complexos formados precipitam (imunoprecipitados) e a reação pode ser observada a olho nú sobre o gel. A interpretação depende dos padrões de linhas de precipitação formadas, como a linha contígua ou linha de identidade (anticorpos dos soros testados iguais aos do controle) ou ainda linha contígua com esporão-linha de identidade parcial (soro testado e controle com anticorpos contra determinantes antigênicos iguais) e linha de não identidade (soros reagindo a determinantes antigênicos diferentes) (OUCHETERLONY, 1949; CABANA et al., 2012b)

Atribuem-se resultados falso-negativos da IDGA a debilidade individual, imunossupressão causada pelo uso de antibioticoterapia em larga escala, corticosteróides, manejo diário, entre outros e a suscetibilidade a gliotoxina produzida pelo agente causal que leva a baixa produção de anticorpos pelo hospedeiro (OUCHETERLONY, 1949; GRACZYK; CRANFIELD; KLEIN, 1998; BEERNAERT et al., 2010; ARNÉ et al., 2011).

O PCR apresenta grande sensibilidade diagnóstica, chegando a 100% e pode utilizar amostras de soro, urina ou LBA (MCWHINNEY et al., 1993). Em contrapartida, não está padronizado e a especificidade deste teste é baixa, já que esta técnica não permite diferenciar colonização de infecção, resultando em altos índices de falso-positivos pela contaminação com o fungo anemófilo *Aspergillus* spp., colonização e/ou reação cruzada com outros fungos filamentosos (BLANCO et al., 1998; LOEFFLER et al., 2001).

A técnica de imuno-histoquímica também já foi anteriormente aplicada como teste diagnóstico, utilizando-se de anticorpos monoclonais para diagnóstico de aspergilose em aves, diferenciando das zigomicoses e fusarioses, no entanto aplicada em tecido coletado após exame *post-mortem* (BEYTU; OZCAN; ERGINSOY, 2004). A presença de gliotoxina no soro também pode se tornar uma ferramenta útil para o diagnóstico (LEWIS et al., 2005).

Em medicina veterinária a maioria dos estudos realizados atualmente buscando técnicas de diagnóstico de doenças fúngicas como a aspergilose, tem enfoque em técnicas avançadas como a detecção de antigenemia por ELISA sanduíche (ARCA-RUIBAL et al., 2006; CRAY; WATSON; ARHEART, 2009 a; CRAY; WATSON; RODRIGUEZ; ARHEART, 2009 b) e/ou detecção de outros antígenos, como β -glucana (BURCO et al., 2012), além de técnicas de biologia molecular. Estudos com IDGA, para detecção de anticorpos IgG que apresentem taxas de sensibilidade e especificidade superiores a 80% são descritas em poucos relatos em cães com aspergilose sinonasal (SHARP et al., 1984) e em maior quantidade em humanos com aspergiloma (BABATASI et al., 2000) e rinosinusite (CAMELI-ROJAS et al., 2004) onde em ambos a técnica é considerada padrão-ouro para diagnóstico.

Em pinguins, existem poucos estudos a respeito de métodos diagnóstico da aspergilose, sendo descrito estudos através da detecção de antígeno galactomanana, anticorpos circulantes e detecção de antígeno β -glucana (GRACZYK; COCKREM, 1995; GRACZYK; CRANFIELD; KLEIN, 1998; GERMAN et al., 2002; CRAY; WATSON; ARHEART, 2009 a; CRAY; WATSON; RODRIGUEZ; ARHEART, 2009 b; BURCO et al., 2012).

2.10 Pinguins e reabilitação

Os pinguins pertencem à Ordem *Sphenisciformes*, família *Spheniscidae*, dividida em seis gêneros que possuem 17 espécies. Habitam o hemisfério sul, e se distribuem nas ilhas subantárticas e costa sul da América do Sul (SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). Devido aos efeitos antrópicos, a situação atual para 10 das 17 espécies de pinguins é crítica ecologicamente e o *status* de “quase ameaçada” é atribuído à espécie de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). As demais espécies encontram-se na lista vermelha da União Internacional de Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) classificadas entre vulneráveis (VU) e ameaçadas de extinção (EN) (CUBAS; SILVA; CATÃO, 2006; IUCN 2007; 2009).

A espécie pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) se reproduz na costa da Argentina, Chile e Ilhas Falklands (Malvinas) entre os meses de setembro a março, e posteriormente migra em direção ao Brasil em busca de alimento (PETRY; FONSECA, 2002; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006). A população de pinguins-de-Magalhães vem diminuindo em uma progressão geométrica nos últimos anos, representada por um declínio de 76% da população total nas Ilhas Falkland (Malvinas) entre os anos de 1989 a 2002 e na costa da Argentina variando de 1,1% a 6% nas populações adulta e juvenis respectivamente, *status* que pode continuar em declínio devido a crescente poluição dos mares (GANDINI et al., 1994; IUCN, 2007).

Durante o período de migração de cerca de sete meses, inúmeros exemplares desta espécie de pinguim são contaminados ao cruzar manchas de óleo nos mares, decorrentes da poluição ambiental proveniente da lavagem de tanques cargueiros e/ou pelo descarte deliberado de conteúdo contaminado de embarcações. Esta poluição coloca os pinguins em situação não fisiológica, como a perda da impermeabilidade das penas e conseqüentemente hipotermia, levando-os para a costa litorânea, e sem se alimentar são encontrados em estado de caquexia, desidratados e subnutridos nas praias (PETRY; FONSECA, 2002; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006; GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006).

No Brasil, existem aproximadamente 25 grupos de reabilitação de pinguins e animais marinhos entre a costa norte do Brasil e o sul do país, além da Argentina (GARCIA-BORBOROGLU et al., 2006). No sul do Rio Grande do Sul, desde o ano de 1995 existe o Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM), mais precisamente localizado na cidade de Rio Grande (32°03'S, 52°08'W), referência em reabilitação de fauna marinha e especializado em despetrolização de aves. Cerca de

100 animais por ano são encaminhados ao centro e após reabilitação são devolvidos ao seu habitat (RUOPPOLO et al., 2004; MARTINS, 2010).

Os animais capturados e encaminhados para reabilitação geralmente são juvenis e devido à debilidade em que se encontram, tornam-se suscetíveis a aspergilose, que representa altas taxas de mortalidade neste local, tornando-se um ponto crucial na reabilitação destes animais (REDIG, 1993; FOWLER; FOWLER, 2001; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; RUOPPOLO et al., 2004; GRACZYK; CRANFIELD, 2005; SHANCHEZ et al., 2005; SILVA-FILHO; RUOPOLLO, 2006; XAVIER et al., 2007; 2011; KEARNS; LOUDIS, 2007)

2.11 Aspergilose em pinguins

A aspergilose é descrita em diferentes espécies de pinguins. A predisposição destas aves marinhas é agravada pelo esforço físico da migração, além das peculiaridades anatômicas, fisiológicas e imunológicas pertencentes às aves em geral, e ainda pelo estresse decorrente do manejo diário durante o processo de reabilitação e administração de fármacos, como antiinflamatórios e antibióticos (RUSSEL; HOLCOMB; BERKNER, 2003; TELL, 2005).

A aspergilose pertence ao grupo das doenças infecciosas de maior susceptibilidade a que os pinguins estão predispostos, causada por inúmeras espécies de *Aspergillus* spp, principalmente por *A. fumigatus* em 95% dos casos (REDIG, 1993; GRACZYK; COCKREM, 1995; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006; XAVIER et al., 2007; 2008 a).

A aspergilose em pinguins apresenta-se especialmente na forma crônica com manifestação tardia dos sinais clínicos como dispneia, emaciação, letargia, anorexia e regurgitação, culminando muitas vezes em morte súbita, sendo esta forma de apresentação considerada clássica, ligada a imunossupressão e com curso clínico prolongado, de semanas a meses (CABANA et al., 2007; XAVIER et al., 2007; 2008 a, b; 2011).

A forma disseminada é a mais comum em aves marinhas (CABANA et al., 2007) iniciando em sistema respiratório e disseminando para outros órgãos por solução de continuidade, sacos aéreos ou via hematógena (FOWLER; CUBAS, 2001).

Os insucessos terapêuticos na aspergilose em pinguins e conseqüente óbito são extremamente comuns e atribuídos ao diagnóstico tardio da micose. Em vista desta realidade, antifúngicos (itraconazol 15-25 mg/kg/dia VO) são administrados profilaticamente por aproximadamente uma semana para pinguins juvenis e/ou muito debilitados (abaixo do peso de referência para espécie ou petrolizados) (ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; RUOPPOLO et al., 2004; SILVA-FILHO; RUOPPOLO, 2006).

É sabido que um diagnóstico definitivo e precoce da aspergilose em aves é de difícil concretização, uma vez que os achados nos exames complementares realizados *in vivo* são inespecíficos (CARRASCO et al., 2001)

Há, portanto, uma clara necessidade de se aprimorar o diagnóstico precoce da aspergilose invasiva nestes animais, buscando a eficácia do tratamento e redução da mortalidade atribuída, na tentativa da substituição do tratamento profilático pelo terapêutico amparado por resultados de exames positivos *in vivo* confiáveis. A utilização de técnicas de detecção de anticorpos é justificada pelos resultados promissores encontrados em diversas e distintas espécies animais com a detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* e podem ser realizados em amostras clínicas de fácil obtenção, como soro sanguíneo (SHARP et al., 1984; TELL, 2005; GARCIA et al., 2008; BILLEN et al., 2009).

Estudos com detecção de galactomanana como técnica diagnóstica de aspergilose em aves são raros na literatura. A detecção de galactomanana por aglutinação em látex (Pastorex® *Aspergillus*) em amostras séricas de pinguins com aspergilose, comprovou a eficácia da utilização deste teste, porém esta técnica caiu em desuso e não é mais utilizada para diagnóstico precoce (HOPWOOD et al., 1995; KOICHI; MICHIIHIRO, 1996).

No entanto, mais recentemente, Arca-Ruibal et al. (2006) testaram a eficácia da detecção da galactomanana sérica para diagnóstico de aspergilose em falcões, pelo método de ELISA sanduíche (Platelia® *Aspergillus* EIA) encontrando sensibilidade de 12%, extremamente baixa e atribuída a interferência de anti-*Aspergillus* circulantes, porém, obtiveram uma boa especificidade, 95%. Posteriormente, utilizando a mesma metodologia para diagnóstico de aspergilose em aves obteve-se resultados distintos, demonstrando taxas de sensibilidade e especificidade relativamente altas, representativas da realidade em cativeiro (67% e 73%, respectivamente) (CRAY et al., 2009 a, b).

Em medicina veterinária, o protocolo recomendado para a aspergilose, terapêutico e profilático, é o itraconazol, um derivado triazólico com ação contra fungos filamentosos, utilizado em diversas espécies, apresentando poucos efeitos colaterais em animais, nas aves de produção não é preconizado, mas em aves silvestres, dentre elas os pinguins, é passível de ser feito o tratamento individual (BAUCK, 1994; KEARNS; LOUDIS, 2003; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; BUNTING et al., 2009).

A segunda opção farmacológica é a anfotericina B e o enilconazol, muito utilizados como terapia inalatória, por possuírem atividade antifúngica ideal ao contato direto se usados intratraqueal, ou diretamente em sacos aéreos de aves (REDIG, 1993; BAUCK, 1994; ABUNDIS- SANTAMARIA, 2003; KEARNS; LOUDIS, 2003; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003).

Os antifúngicos em medicina veterinária podem ser administrados por diversas vias, oral, intravenosa e nebulização. Em aves podem ser administrados por via intratraqueal, utilizando substâncias isoladas ou em associação, e a nebulização deve ser realizada TID ou QID durante 10 minutos por seção até a cura clínica (BAUCK, 1994).

A prevenção da doença é realizada comumente através do controle de temperatura, umidade, ventilação e higiene. Por ser inevitável a presença de matéria orgânica em cativeiros deve ser instituído um plano de manejo para minimizar os efeitos deletérios para os animais alojados (BAUCK, 1994; CORK et al., 1999; KEARNS; LOUDIS, 2003; TESSARI et al., 2004). Medidas de controle e desinfecção também são utilizadas e reduzem significativamente o risco de infecção por *Aspergillus* spp. devido a redução de conídios anemófilos e se associadas a ventilação e filtração do ar aumentam esta estimativa (ANDREATTI FILHO, 2000; ROCHETTE; ENGELEN; BOSSCHE, 2003; ARGAWAL et al., 2009). Em pinguins em cativeiro, estudo demonstrou a importância da clorexidina para desinfecção ambiental como medida de controle de aspergilose, utilizando fricção mecânica (XAVIER, 2007b).

Despesas com antifúngicos para profilaxia e tratamento empírico de infecção por *Aspergillus* spp. em pinguins em cativeiro, constituem um gasto significativo na reabilitação destes animais. Assim, testes diagnósticos que possam conferir um aumento da eficácia do tratamento devido a possibilidade de se detectar a doença em estágio inicial culminariam com corte de custos monetários, ecológicos e exposição desnecessária aos antifúngicos, uma vez que estes somente seriam

utilizados em pacientes enfermos (REDIG, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; CABANA et al, 2012b).

Estudos relacionados às técnicas de diagnóstico precoce da aspergilose em aves não descrevem taxas de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para imunodifusão (ARCA-RUIBAL et al., 2006; CRAY; WATSON; ARHEART, 2009 a; CRAY; WATSON; RODRIGUEZ; ARHEART, 2009 b; BURCO et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho do monitoramento sorológico para detecção de anticorpos específicos por IDGA no diagnóstico da aspergilose em pinguins em cativeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e preditivo negativo da imunodifusão no diagnóstico de aspergilose em pinguins;
- Avaliar a precocidade do monitoramento sorológico por imunodifusão para o diagnóstico da aspergilose em pinguins;
- Avaliar a taxa de mortalidade atribuída a aspergilose em pinguins em cativeiro e definir as principais espécies fúngicas causais.

4 ARTIGO

4.1 Artigo 1

Short title: DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE PENGUINS

Monitoramento sorológico para diagnóstico precoce da aspergilose em pinguins em cativeiro

Ângela Leitzke Cabana^{1*}, Melissa Orzechowski Xavier², Vanice Poester², Andrea Corrado Adornes³, Pedro Luis Bruno-Filho³, Paula Canabarro³, Aryse Martins³, Rodolfo Pinho da Silva-Filho³, and Mário Carlos Araújo Meireles¹

¹Laboratório de Micologia/Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), ²Laboratório de Micologia/Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), ³Centro de Recuperação de Animais Marinhos of Universidade Federal do Rio Grande (CRAM/FURG), Rio Grande do Sul, Brazil.

Submetido a revista Medical Mycology (Janeiro 2013)

Short title: DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE PENGUINS

**SEROLOGICAL MONITORING OF ANTIBODIES TO AN EARLY DIAGNOSIS OF
ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE PENGUINS**

Ângela Leitzke Cabana^{1*}, Melissa Orzechowski Xavier², Vanice Poester², Andrea Corrado Adornes³, Pedro Luis Bruno-Filho³, Paula Canabarro³, Aryse Martins³, Rodolfo Pinho da Silva-Filho³, and Mário Carlos Araújo Meireles¹.

¹Mycology Laboratory/ Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas (UFPEl), ²Mycology Laboratory / Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande (FURG), ³Center for Recovery of Marine Animals of the Federal University of Rio Grande (CRAM/FURG), Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Ângela Leitzke Cabana

Address: Rua Alcides Maya, 152. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 96040-220.

Phone: (+55) 53-32757140/ 91013067/84364983

E-mail: cabanangela@gmail.com or anjinha_kbana@hotmail.com

Key words: *Sphenisciformes*; captivity; *Aspergillus* spp.; antibody; immunodiffusion.

ABSTRACT

Aspergillosis is one of the main causes of death of penguins in captivity. Although this is a problem known for decades, most of the reported cases are still confirmed on *post-mortem* examinations, being necessary further studies on methods for *in vivo* diagnosis of this disease. So this study aimed to evaluate the efficacy of detection of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies by double radial agar gel immunodiffusion (AGID) as a method of diagnosis of aspergillosis in captive penguins. We included 134 Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in rehabilitation at the Center for Recovery of Marine Animals (CRAM / FURG) which were monitored by AGID weekly until its final destination (death or release), totalizing 660 serum samples studied. All animals were clinically accompanied and *post-mortem* examinations were performed in penguins that died during the study period. A total of 28% (37/134) of the penguins died, 89.2% (33/37) of aspergillosis, 11% (4/37) of other causes and 97 were released. From the 33 animals with proven aspergillosis, 21 presented anti- *A. fumigatus* antibodies by AGID, being the average interval between death and positive AGID 16.4 days. Twelve animals with negative serology died of aspergillosis. The sensitivity and specificity rates were 63.6% and 95%, respectively, and the positive and negative predictive values were 80.7% and 88.9% respectively. These data demonstrate that the serological monitoring for detection of antibodies by AGID can be an important tool in the diagnosis of aspergillosis in penguins.

INTRODUCTION

Aspergillosis is an infectious, non-contagious disease caused by fungi of the genus *Aspergillus*, especially those belonging to the section Fumigati [1-6] Although it has a low prevalence in free-living penguins [7,8], this mycosis is extremely important at captivity sites (zoos, aquariums and rehabilitation centers), where it is considered a major cause of mortality of these seabirds and other species [9-12].

Aspergillosis in penguins may result in sudden death, or present unspecific clinical signs such as lethargy and anorexia which may evolve to dyspnea and cyanosis [3,10-12]. Alterations in radiological exams such as thickening and opacity of air sacs may be evidenced only in late frames of the disease, and the alterations as heterophilia and eosinophilia on hemogram are unspecific, which does not allow a definitive diagnosis of this mycosis [6,13-15].

In addition, classical methods in mycology, as direct examination and cultive have a limited value due to the low sensitivity and specificity, and, in addition, the respiratory tract endoscopy is an invasive method and requires the animal anesthesia. Regarding it, there is no test considered the gold standard for definitive diagnosis of aspergillosis in birds, being the confirmation of the disease often performed only by *post-mortem* examinations [6,14-18]. This data gives to aspergillosis a crucial role as a limitation to penguin rehabilitation or in the ongoing maintenance of these animals in places like zoos and aquariums, causing immeasurable ecological and economic losses [4, 9-12, 19, 20].

Most cases of aspergillosis in captive penguins occurs sporadically and is characterized by chronic conditions and advanced disseminated disease that can even present the formation of large granulomatous masses [2, 3, 11, 12, 21]. Considering that the formation of these aspergillomas is a lengthy process, during which the humoral response can be generated [14, 19, 22], and that the *in vivo* diagnosis of aspergillosis is needed to start the specific therapy and achieve clinical cure, this study aimed to evaluate the performance of serological monitoring for detection of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies by double radial agar gel immunodiffusion (AGID) as a method for an early diagnosis of aspergillosis in captive penguins.

MATERIAL AND METHODS

The study was performed including the Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in transitory captivity for rehabilitation during the period from June 2009 to December 2011 at the Center for Recovery of Marine Animals of Rio Grande, RS, Brazil (CRAM-FURG, 32°03'S, 52°08'W). The project followed the standards of animal welfare and was approved by the ethics committee of UFPel (n° 6919).

All animals were subjected to sampling of peripheral blood by venipuncture from the jugular vein on arrival at the CRAM, and every 7-15 days from the medial metatarsal vein over the entire period of captivity until their destination (release to natural habitat or death). The sera were separated by centrifugation, aliquoted into microtubes and stored at 4°C for analysis. Length of stay less than 30 days in CRAM, and animals with only one serum sample collected were excluded from the study.

The serological monitoring was performed weekly for detection of anti-*Aspergillus fumigatus* antibodies from the AGID technique, as described by Ouchterlony (1949), utilizing antigen and positive control sera commercially available (*Aspergillus fumigatus* ID antigen IMMY® e *Aspergillus fumigatus* ID control IMMY®). Samples were considered positive in the visualization of the identity line (antibody-antigen precipitation line of the sample adjacent the control line).

The animals were clinically followed up during the period of captivity and all that died underwent *post-mortem* examinations for the determination of the *causa mortis*, with evaluation of macroscopic and histopathological alterations, mycological examination with 20% KOH and culture of tissue fragments from the respiratory tract (lungs and air sacs) in Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol at 37 ° C for up to seven days.

In order to evaluate the test diagnostic precocity, the time between the first positive AGID and death of animals with aspergillosis was calculated. Data were collected for assessment of mortality attributed to aspergillosis in this population and rates of sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of AGID in the diagnosis of aspergillosis in penguins were calculated, considering as the gold standard the *post-mortem* examinations.

RESULTS

From the 239 Magellanic penguins received in CRAM during the study period, 105 were excluded, 64 by staying less than 30 days in CRAM and 41 by having only one serum sample collected, thus, 134 animals took part on the study. Of these, 33 eventually died of aspergillosis [31 (93.9%) by *Aspergillus* section Fumigati and two (6.1%) by *Aspergillus* section Flavi], four from other causes, and 97 animals were rehabilitated and released to their habitat, being the mortality rate related to aspergillosis in our study of 89.2%.

All 33 cases of aspergillosis included were classified as confirmed cases, with demonstration of granulomatous lesions in the lungs (Fig. 1a), fungal aerosaculitis (Fig. 1b), bronchopneumonia and / or necrosis of the tissues involved, associated with the isolation of fungi of the genus *Aspergillus* in mycological culture and visualization of hyaline, septate, forked at an acute angle (45 °) hyphae and / or typical fruiting structures of the genus *Aspergillus* in histopathology.

An average of four serological tests was performed per animal, ranging from two to ten, according to the period in which the animals were kept in captivity (average of 66 days, ranging from 30 to 271 days). Only about 10% of the animals (14/134) were subjected to only two tests, being the monitoring of the other 120 animals realized by at least three serologic tests, totalizing 660 serum samples tested.

No penguin presented positive AGID on arrival at CRAM. During serological monitoring, the presence of anti-*A. fumigatus* antibodies were detected by AGID in 26 animals, from which 21 died of aspergillosis and the other five were released, not showing clinical signs after an average period of 79 days (ranging from 28 to 183 days) from the serology positive result. From the 108 animals that had no positive sample at AGID, twelve died of aspergillosis. This data resulted in rates of 63.6% of sensitivity, 95% of specificity, 80.7% of PPV and 88.9% of NPV.

From the 33 animals with aspergillosis, eight (24.2%) had sudden death, without clinical signs. In the remaining 25 animals that died of aspergillosis, the main clinical signs were dyspnea (n=13, 52%), lethargy (n = 11, 44%), inappetence/anorexia (n=3, 12%) and/or regurgitation (n=2, 8%). Considering only the 21 animals with positive serology and who died of aspergillosis, five (23.8%) had sudden death, with no apparent clinical signs, and six (28.5%) showed dyspnea before the first positive result of AGID. The mean period between seropositivity and death of the animals was 16.4 days (range 0-59 days) (Table 1).

DISCUSSION

Diagnostic testing in avian species remains in the early stages of development with little validation or standardization, which is a major complication in the diagnosis of avian disease [15]. When dealing specifically with the diagnosis of aspergillosis in penguins, this problem becomes even greater, with few studies published in the literature [17, 19, 24-27]. Therefore the present study evaluated the efficacy of the double radial agar gel immunodiffusion test as a method for diagnosis of aspergillosis in captive penguins from serological monitoring, demonstrating high specificity rates and positive and negative predictive values.

Although the AGID is a quite old technique, it has characteristics that justify its practical applicability to the present day, such as easy operation, especially in the handling of small number of samples, low cost and a minimum requirement for laboratory equipment and structure [28-30]. In addition, being based on a precipitation reaction, the AGID does not require the use of species-specific secondary antibodies, which are required for indirect ELISA and are not commercially available when dealing with wild animals [15, 17, 24-26], which is the case in our study with penguins.

Further, unlike what is described in the studies using the ELISA technique to detect antibodies in which a positive result do not necessarily correlate with clinical disease [15, 17, 24-26], our study with AGID demonstrated high PPV. This discrepancy in the interpretation of a positive result between the two diagnostic techniques is due to that the AGID is less sensitive [15], showing positive results only in serum samples with large concentration of circulating antibodies, a condition found only in individuals with active disease. On the other hand, ELISA technique allows disclosure including low concentration of circulating antibodies from just the exposure / infection of the host to the fungus [17, 24, 25].

Most studies related to techniques for early diagnosis of aspergillosis in birds has worked with direct diagnosis methods, newer and more advanced, such as galactomannan detection by sandwich ELISA [24, 25, 31] or even detection of β -glucan antigen [27], not being described in the literature studies similar to ours, showing rates of S, Sp, PPV and NPV for the indirect diagnosis by AGID of aspergillosis in birds.

Although these direct diagnostic techniques seeking fungal antigen detection demonstrate promising results, it should be noted that these tests are not yet standardized for other types of hosts than humans, with no defined cutoff point, and still has poor accessibility, high cost and large variability in results depending on the population studied [24, 25, 27, 31-33].

In addition, the rates of S, Sp, PPV and NPV for the AGID diagnosis of aspergillosis in penguins found in our study are similar or even superior to those described by Arca-Ruibal *et al.* [31] in their study with galactomannan detection for the diagnosis of aspergillosis in falcons (12% S, 95% Sp, 46.1% PPV and 75.4% of VPN by using cut-off=1.0), and by Cray *et al.* [24, 25] who found 67% sensitivity, 73% specificity, 63% PPV and 76% NPV using the same technique (cut-off=0.5) for the diagnosis of aspergillosis in bird from different species. Likewise, the results are superior to those described by Burco *et al.* [27] who used the technique to detect β -glucan for diagnosis of aspergillosis in birds finding rates of sensitivity and specificity of 60% and 92.7%, respectively.

The high rates of specificity, PPV and NPV found in our study, all above 80%, suggests the applicability of the test as a diagnostic method of aspergillosis in penguins, corroborating with other authors who claim that penguins respond to infection by *Aspergillus* spp. with production of large amounts of antibodies [15], probably due to the chronicity of the lesions that occurs with slow progression [2-4, 10]. These data justify the better results of indirect serologic tests compared with direct diagnostic methods previously studied and described above.

The false negative results in AGID found in twelve penguins who died of aspergillosis in our study may be due to factors of immunosuppression, either by stress, individual weakness (we should also consider that the animals were in different stages of rehabilitation) or even by the individual susceptibility to gliotoxin, toxin with deleterious action on the immune system produced *in vivo* by the etiologic agent, which culminates with low production of antibodies by the host [1, 14, 19, 23-25, 34]. Another possibility would be the acute death of these animals prior to sufficient production of IgG required to be detected by AGID [19]. In these cases of immunosuppression, these individuals could be benefited from a direct diagnostic test, such as sandwich ELISA for detection of galactomannan whose results do not require host immune integrity, being their positivity directly related to the low concentration of circulating antibodies [15, 32].

Considering that only six penguins showed clinical signs before the first positive serology and that the average time between the first positive AGID and death from aspergillosis was about fifteen days, associated with high rates of the predictive values described in our study, we suggest that the result of this serological monitoring may be used as abutment for starting preemptive aspergillosis therapy in penguins at risk of the disease. This would be similar to that recommended for neutropenic human patients at risk of invasive aspergillosis, who must be monitored by antigenemia tests for detection of galactomannan [32, 35].

CONCLUSION

The serological monitoring for detection of specific antibodies by double radial immunodiffusion is useful for the detection of aspergillosis in captive penguins at risk of developing the disease, with high specificity, PPV and NPV. However, more studies are required concerning the prognosis in cases of aspergillosis in penguins whose therapeutic intervention is based on the diagnosis by AGID as our study who pioneered for serological diagnosis of aspergillosis in penguins, considering that the average period between the positive test and death of the animal was less than one month, suggesting average precocity of the test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant n° 485489/2012-0 (Edital Universal 14/2012).

CONFLICT OF INTERESTS

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Arné P, Thierry S, Wang D, et al. 2011. *Aspergillus fumigatus* in poultry. *Int Jour of Microb*, **V 2011**: 746356. 14 pages
- [2] Ainsworth GC, Rewell RE. 1949. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. *Jour of Comp Path and Therap*; **59**: 213-224.

- [3] Xavier MO, Soares MP, Cabana AL, et al. 2011. Clinical and pathological findings of aspergillosis in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Cie. Anim. Bras.* **v.12**, n.3, p. 520-524, jul./set. 2011
- [4] Carrasco L, Lima Jr JS, Halfen DC, et al. 2001. Systemic Aspergillosis in an Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Jour of Vet Med*, **v.48**, p.551-554.
- [5] Abarca ML. 2000. Taxonomy of species involved and identification in the nosocomial aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* Sep: **v.17 (3)**, p.79-84, (Article in Spanish).
- [6] Jones MP, Orosz SE. 2000. The Diagnosis of Aspergillosis. *Sem in Av and Exot Pet Med*, **Vol 9**, No 2 (April), pp 52-58.
- [7] Garcia- Borboroglu P, Boersma PD, Ruoppolo V, et al. 2006. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. *Mar Poll Bull*, **v.52**, p.193-198.
- [8] Hocken AG. Cause of death in blue penguins (*Eudyptula m. minor*) in North Otago, New Zealand. *New Zeal Jour of Zoo* 2000; **27**: 305-309.
- [9] Diebold EN, Branch S, Henry L. 1999. Management of penguin population in North American zoos and aquariums. *Mar Ornith* **27**:171-176.
- [10] Xavier MO, Soares MP, Meinerz ARM, et al. 2007. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. *Braz Jour of Microb.* **38**: 480-484
- [11] Flach EJ, Stevensom MF, Henderson GM. 1990. Aspergillosis in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. *Vet Rec*, **126 (4)**, 81-85
- [12] Khan ZU, Pal M, Paliwal DK, Damodaram VN. 1977. Aspergillosis in imported penguins. *Sabour*, **15**, 43-45
- [13] Ivey E S. 2000. Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *Jour of Av Med and Surg* **14**, 103-106
- [14] Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A. 2010. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Av Path.* **39:5**, 325-331
- [15] Cray C, 2011. Infectious and zoonotic disease testing in pet birds. *Clin lab Med* **.31**. pp 71-85.
- [16] Redig PT, 1994. *Aspergillus ELISA: A Tool For Detection And Management.* *Proc of the Ann Conf of the Assoc of Av Vet.* Reno, USA, Sep 27 to October 1. pp 295-300s
- [17] Graczyk TK, Cockrem JF.1995. *Aspergillus* spp seropositivity in New Zealand penguins. *Mycopath* **131**, 179-184

- [18] Cray C, Zielezienski-Roberts K. 1997. *Application of Aspergillus antigen assay in the diagnosis of aspergillosis. Proceed of the Ann Conf of the Assoc of Av Vet.* Reno, USA, Sep 10 to 12, 1997. pp 219-221
- [19] Graczyk TL, Cranfield MR, Klein PN. 1998. Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive Aspergillosis. *Mycopath* **140**:121-127.
- [20] Sanchez SL, Garret TD, Sanchez C. 2005. Exhibit Modifications to reduce the incidence of Aspergillosis and increase breeding in two penguins species at the Denver Zoo. Available at: <http://www.aza.org/AZApublishations/2005ProceedingsReg>. Accessed: November 2012
- [21] Carcciuttolo E, Rossi G, Nardoni S, Legrottaglie R, Mani P. 2009. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Vet Res Commun*, **33**:521–527
- [22] Martinez- Quesada J, Nieto- Cadenazzi A, Torres- Rodriguez JM, 1993. Humoral immunoresponse of pigeons to *Aspergillus fumigatus* antigens. *Mycopath*, 1993 Dec, **124 (3)**: 131-137.
- [23] Ouchterlony O. 1949. Antigen–antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **26**, 507–515.
- [24] Cray C, Watson T, Arheart KL. 2009a. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. *Av Disea* **53**:491–494.
- [25] Cray C, Watson T, Rodriguez M, Arheart KL. 2009b. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species *Jour of Zoo and Wild Med* **40(1)**: 64–70.
- [26] German AC, Shanklan GS, Edwards J, Flach EJ. 2002. Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. *Vet Rec.* **150**, 513-518
- [27] Burco JD, Ziccardi MH, Clemons KV, Tell LA. 2012. Evaluation of Plasma (1→3) β -D-glucan Concentrations in Birds Naturally and Experimentally Infected with *Aspergillus fumigatus*. *Av Disea*, **56(1)**:183-191.
- [28] Lane JG, Warnock DW, 1977. The diagnosis of *Aspergillus fumigatus* infection of the nasal chambers of the dog with particular reference to the value of the double diffusion test. *J. Small Anim. Pract.* **18**, 169– 177.
- [29] Poli G, Ponti W, Balsari A, Addis F, Mortellaro CM, 1981. *Aspergillus fumigatus* and specific precipitins in dogs with turbinate changes. *Vet. Rec.* **108**, 143–145.

- [30] Billen F, Peeters D, Peters IR, et al. 2009. Comparison of the value of measurement of serum galactomannan and *Aspergillus*-specific antibodies in the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis, *Vet Microb* **133**:358–365
- [31] Arca- Ruibal B, Wernery U, Zachariah R, et al. 2006. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *Vet Rec*, **158**, 442-444
- [32] Aquino V, Goldani LZ, Pasqualoto AC, 2007. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopath*, **163**:191–202
- [33] Wheat LJ, 2003. Rapid diagnosis of invasive aspergillosis by antigen detection. *Transp Infec Disea*, **5**: 158-166
- [34] Nieminen SM, Maki- Paakkanen J, Hirvonem MR, Raponem M, Wright A. 2002. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus* , in a battery of short-term tests systems. *Mutat Res* **520**, 161-170
- [35] Maertens J, Verhaegen J, Lagrou K, Van Eldere J, Boogaerts, M, 2001. Screening for circulating galactomannan as noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* **97**, 1604-161

Table 1: Clinical-epidemiological and serological data of penguins with aspergillosis.

Penguin	Gender	Age	Etiology (<i>Aspergillus</i> section)	Clinical signs	Serology	Number of serological tests	Period between positive serology and death (days)
1	U	J	Fumigati	Lethargy	NEG	4	-
2	U	J	Fumigati	Lethargy	NEG	3	-
3	F	J	Fumigati	WCS	NEG	3	-
4	M	J	Fumigati	WCS	NEG	4	-
5	F	J	Fumigati	Anorexia, repeated vomiting	NEG	6	-
6	F	J	Fumigati	Dyspnoea	NEG	4	-
7	M	J	Fumigati	Lethargy	NEG	4	-
8	M	J	Fumigati	Anorexia	NEG	3	-
9	F	J	Fumigati	WCS	NEG	2	-
10	M	J	Fumigati	Dyspnoea	NEG	3	-
11	U	J	Fumigati	Dyspnoea	NEG	3	-
12	F	J	Fumigati	Dyspnoea	NEG	4	-
13	U	I	Fumigati	Dyspnoea	POS	3	08
14	U	I	Flavi	Lethargy	POS	5	00
15	F	J	Fumigati	WCS	POS	4	00
16	M	J	Fumigati	Dyspnoea	POS	4	21
17	U	J	Fumigati	Lethargy	POS	6	24
18	M	J	Fumigati	Dyspnoea	POS	2	18
19	U	J	Fumigati	Lethargy	POS	5	02
20	F	J	Fumigati	Dyspnoea, repeated vomiting	POS	5	03
21	F	J	Fumigati	Lethargy, Anorexia, Dyspnoea	POS	7	21
22	U	I	Fumigati	Lethargy	POS	3	24
23	U	I	Fumigati	Lethargy	POS	7	59
24	U	A	Fumigati	Dyspnoea, keratitis	POS	10	02
25	F	J	Fumigati	Dyspnoea	POS	4	28
26	M	J	Fumigati	Dyspnoea	POS	9	31
27	U	J	Fumigati	Lethargy	POS	4	33
28	M	J	Flavi	WCS	POS	2	13
29	U	J	Fumigati	Lethargy	POS	3	42
30	U	I	Fumigati	WCS	POS	5	05
31	U	I	Fumigati	WCS	POS	6	05
32	F	J	Fumigati	WCS	POS	2	06
33	U	A	Fumigati	Dyspnoea	POS	4	00

U: unknown; F: female; M: male; J: juvenile; A: adult; WCS: without clinical signs; NEG: negative;
POS: positive

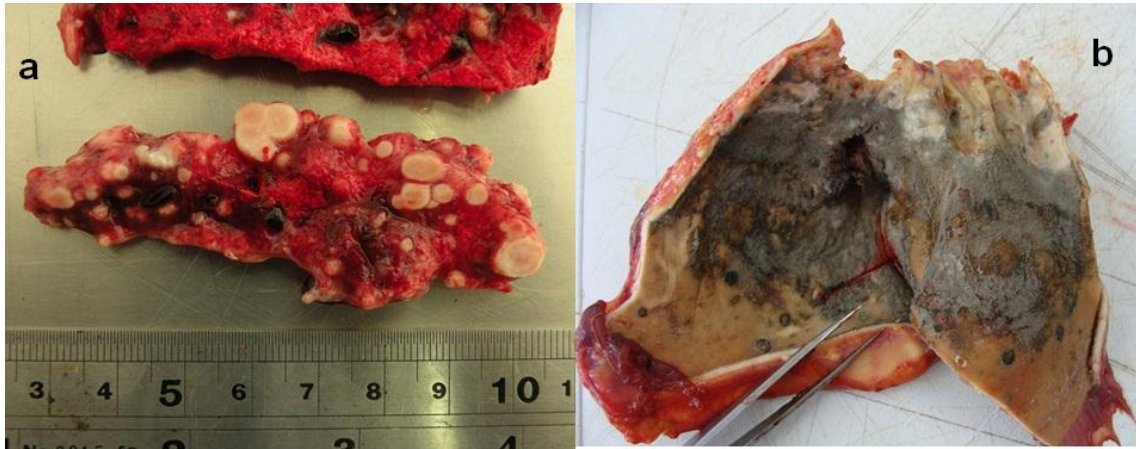


Figure 1 – Lesions observed at the necropsy of penguins with aspergillosis. a) granulomatous lesions in pulmonary parenchyma, white in colour and dry in texture. b) aerosacculitis showing thickening air sacs with a grey-greenish mould on internal surface typical of fungal sporulation.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados encontrados no presente estudo permitiram concluir que:

- As altas taxas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) encontradas no estudo permitem concluir que o monitoramento sorológico pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico da aspergilose em pinguins;
- A aspergilose em pinguins pode ser diagnosticada em um período médio de cerca de duas semanas antes do óbito dos animais utilizando monitoramento sorológico por imunodifusão;
- A mortalidade atribuída a aspergilose no estudo foi de 89,2%, sendo 93,9% dos casos atribuídos a *Aspergillus* seção *Fumigati*, e 6,1% a *Aspergillus* seção *Flavi*.
- Os resultados apresentando altas taxas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, além do período médio entre IDGA positiva e óbito de aproximadamente duas semanas, justificam nosso estudo pioneiro com IDGA em aves, pilar para novos estudos promissores com monitoramento sorológico em pinguins.

REFERENCIAS

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

ABRAMS G.A; PAUL-MURPHY J; RAMER J.C; MURPHY C.J. *Aspergillus* blepharitis and dermatitis in a peregrine falcon-gyr falcon hybrid (*Falco peregrinus* x *Falco rusticolus*), **J Avian Med Surg.** 2001; 15 (2): 114-120.

ABUNDIS-SANTAMARIA E. Aspergillosis in birds of prey. 2003. Available at: <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>> Accessed: august 2011.

AGUILAR R.F; REDIG P.T. Diagnosis and treatment of avian aspergillosis. In: Bonagura JD, Kirk R, editors. **Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice** XII. Philadelphia: Saunders, 1995.

AHO R; HOTIE Y; NISHIMURA K; MIYAJI M. *Aspergillus arvii* spec nov, a new animal pathogen? **Mycoses** 1994; 37: 389_392.

AINSWORTH G.C; AUSTWICK P.K.C. 1973. Mycotic abortion, p 74-80. In: Fungal Diseases of Animals. 2nd ed. **Commonwealth Agriculture Bureaux**, Farnham Royal, Slough, England.

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.

AKAN M; HAZIROĞLU R; ILHAN Z; SAREYYÜPOĞLU B; TUNCA R. A case of aspergillosis in a broiler breeder flock, **Avian Dis.** 2002; 46 (2): 497-501.

ALCAZAR-FUOLI, L; MELLADO, E; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A; CUENCA-ESTRELLA, M; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. 2008. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52: 1244-1251.

AL-MUSALLAM A. **Revision of the black Aspergillus species.** PHD thesis Rijksuniversiteit Utrecht, Utrecht, 1980.

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

ANSORG, R; VAN DEN BOOM, R; RATH, P.M. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. **Mycoses**. 1997, 40:353-57

AQUINO V; GOLDANI L. Z; PASQUALOTO A.C, 2007. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. **Mycopath** (2007) 163:191–202

AQUINO, V.R; VERÇOSA, E.B; FALHAUBER, G; LUNARDI, L.W; SILLA, L; PASQUALOTTO, A.C. Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the haematological Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. **Bras J Infect Dis**. 2010; 14: 277-80

ARCA- RUIBAL B; WERNERY U; ZACHARIAH R; BAILEY T.A; SOMMA A.D; SILVANOSE C; MCKINNEY P, 2006. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. **Vet Rec** (2006) 158, 442-444

ARGAWAL, R; AGGARWAL, A.N; GUPTA, D; JINDAL, S.K. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analyses. **Int J Tuberc Lung Dis**. 2009; 13:936-44

ARNÉ P; THIERRY S; WANG D; DEVILLE M; LE LOC'H G; DESOUTTER A; FÉMÉNIA F; NIEGUITSI A; HUANG W; CHERMETTE R; GUILLOT J. *Aspergillus fumigatus* in poultry. **Int Jour of Microb**, Vol 2011, ID 746356., 14 pages

ATKINSON, R; BROJER C. Unusual presentations of aspergillosis in wild birds. **Proc Assoc Avian Vet**. 1998; 177-181.

BABATASI et al. Surgical treatment of pulmonary aspergilloma: current outcome. **J Thorac Cardiovasc Surg**;119: 906-12, 2000.

BAINS, B.S. Interação: Imunidade x Doença. In: **Anais do Simpósio Internacional Ambiente e Instalação na Avicultura Industrial**. Campinas-SP. P. 205-212. 1995.

BALAJEE, S.A; GRIBSKOV, J.L; HANLEY, E; NICKLE, D; MARR, K.A. *Aspergillus lentulus* sp. Nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. **Eukaryotic Cell** 2005, 4 (3): 625.

BARACHETTI, L; MORTELLARO, C.M; DI GIANCAMILLO, M; GIUDICE, C; MARTINO, P; TRAVETTI, O; MILLER, P.E. 2009. Bilateral orbital and nasal aspergillosis in a cat. **Vet. Ophthalmol**. 12(3):176-182

BARRS, V.R; HALLIDAY, C; MARTIN, P; WILSON, B; KROCKENBERGER, M; GUNEW, M; BENNETT, S; KOEHLMEYER, E; THOMPSON, A; FLIEGNER, R; HOCKING, A; SLEIMAN, S; O'BRIEN, C; BEATTY, J.A. 2012. Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes. **Vet. J**. 191:58-64.

BARUA, A; YOSHIMURA, Y (1999) Effects of aging and sex steroids on the localization of T cell subsets in the ovary of chicken, *Gallus domesticus*. **Gen Comp Endocrinol** 114:28–35

BAUCK L. Mycoses. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. **Avian Medicine: Principles and Application**, Florida: Wingers Publishing. 1994; 997-1006.

BEERNAERT, L.A; PASMANS, F; VAN WAEYENBERGHE, L; HAESBROUCK, F; MARTEL, A. *Aspergillus* infections in birds: a review. **Av Path**. 2010. 39:5, 325-331

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

BIBERSTEIN, E.L; ZEE, Y.C. **Tratado de microbiología veterinaria**. España: Acribia, 1990.

BILLEN F; PEETERS D; PETERS I.R; HELPS C.R; HUYNEN O; DE MOL P; MASSART L; DAY M.J; CLERCX, C. 2009. Comparison of the value of measurement of serum galactomannan and *Aspergillus*-specific antibodies in the diagnosis of canine sino-nasal aspergillosis, **Vet Microb** 133 (2009) 358–365

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

BULPA, P; DIVE, A; SIBILLE, Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**. 2007; 30: 782-800

BUNTING, E.M; JIMENEZ. M.T; FOX, H; KOLLIAS, G.V. Evaluation of oral itraconazole administration in captive Humboldt penguins (*Spheniscus Humboldti*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 40(3): 508–518, 2009

CABANA, A.L; XAVIER, M.O; OSÓRIO, L.G; MENDES, J.F; MATOS, C.B; MEIRELES, M.C.A. 2012a. Aspergilose sinonasal canina. **A Hora Veterinária – Ano 32**, nº 188, julho/agosto/2012

CABANA, A.L; XAVIER, M.O; SILVA-FILHO, R.P; CANABARRO, P.L; FARIA, R.O; MEIRELES, M.C.A. Monitoramento sorológico para diagnóstico de aspergilose em ínguins: avaliação da precocidade e eficácia do teste de imunodifusão radial dupla (IDGA). 2012b. **XIV Encontro de pós graduação/UFPel**. Out 2012. Pelotas

CABANA, A.L; XAVIER, M.O; OSÓRIO, L.G; SOARES, M.P; SILVA-FILHO, R.P; MADRID, I.M; FARIA, R.O; MEIRELES, M.C.A. Alterações anatomo-patológicas da aspergilose em pinguins. 2007. **XVI Congresso de Iniciação Científica/UFPel**. Nov 2007. Pelotas

CAILLOT, D; CASASNOVAS, O; BERNARD, A; COUAILLIER, J.F; DURAND,C; CUISENIER, B. et al., Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoric computed tomographic scan and surgery. **J**

Clin Oncol. 1997; 15:139-47

CAMELI-ROJAS, V; MATA-ESSAYAG, S; DE CAPRILES, C.H; MAGALDI, S; DE PEREZ, E.G; GARRIDO, L; BALDERRAMA-CABALLERO, D. *Aspergillus* species in patients with chronic rinosinusitis. **Mycoses** 47, 47–49, 2004.

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

CARVALHO-DIAS, V.M; SOLA, C.B; CUNHA, C.A; SHIMAKURA, S.E; PASQUINI, R; QUEIROZ-TELLES, F. Invasive aspergillosis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective analysis. **Braz J Infect Dis.** 2008; 12:385-

CASWELL, J.L; WILLIAMS, K.J. 2007. Respiratory system, p.523-653. In: **Maxie, M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals.** Vol.2. 5th ed. Saunders, London.

CORBELLINI, L.G; PESCADOR, C.A; FRANTZ, F.J; LIMA, M; FERREIRO, L; DRIMEIER, D. Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* em bovinos no sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 23(2):82-86, abr./jun. 2003

CORK, S.C; ALLEY, M.R; JOHNSTONE, A.C; STOCKLDALE, P.H. Aspergillosis and other causes of mortality in the stitchbird in New Zealand. **J Wildl Dis.** 1999; 35 (3): 481-486.

CRAY, C. 2011. Infectious and zoonotic disease testing in pet birds. **Clin lab Med** 31. pp 71-85.

CRAY, C; WATSON, T; ARHEART, K.L. 2009a. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. **Av Disea** 53:491–494, 2009.

CRAY, C; WATSON, T; RODRIGUEZ, M; ARHEART, K.L. 2009b. Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species **Jour of Zoo and Wild Med** 40(1): 64–70, 2009

CUBAS, Z.S; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária.** Ed.Roca, 2006. 1354p.

DEAK, E; BALAJEE, S.A. Molecular methods for identification os *Aspergillus* species. In: **Aspergillosis: from diagnosis to prevention.** Pasqualotto, A.C. Ed. Springer, NL 2010: 75-83

DEAN, T.R; ROOP, B; BETANCOURT, D; MENETREZ, M.Y. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. **J Microbiolog Meth** 2005; 61: 9_16.

DENNING, D. Introduction. In: **Aspergillosis: form diagnosis to prevention.** Pasqualotto, A.C, ed. Springer, NL 2010: 3-5

DENNING, D.W.; BENNETT, J.E.; WALSH, T.J.; PATTERSON, T.F.; PANKEY, G.A. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. **Clinical Infectious Diseases**. v.30, p.696-709, 2000.

DORGE, T; FRISVAD, J.C; CARSTENSEN, J.M. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. **J Microbiolog Meth** 2000; 41: 121_133

EGGERT, M. J; ROMBERG, P. F. 1960. Pulmonary aspergillosis in a calf. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 137: 595– 596.

EINSELE, H.K; QUABECK, K. D; MULLER, H; HEBART, I; ROTHENHOFER, J; LOFFLER; SCHAEFER, U. W. 1998. Prediction of invasive pulmonary aspergillosis from colonization of lower respiratory tract before marrow transplantation. **Lancet** 352(9138): 1443.

EL-KHOULY, A; GADIR, F. A; CLUER, D. D; MANEFIELD, G. W. 1992. Aspergillosis in camels affected with a specific respiratory and enteric syndrome. **Australian Veterinary Journal** 69: 182– 186.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783–791.

FORBES N. A. Aspergillosis in raptors. **Vet Rec**. 1991; 128 (11): 263.

FORBES N.A. Rapaces. In: Beynon PH, Cooper JE, editors. **Manual de animales exóticos**. España: Harcourt Brace, 1999.

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

FRIEND, M; FRANSON, J. Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds. **US Geological Survey**, 1999.

FRISVAD, J.C; SAMSON, R.A. Neopetromyces gen nov and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subg. **Circumdati Stud Mycol** 2000; 45: 201_207.

FRISVAD, J.C; THRANE, U. Standardized High-Performance Liquid Chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone indices and UV-VIS spectra (diodearray detection). **J Chromatogr** 1987; 404: 195_214.

GALAGAN, J.E; CALVO, S.E; CUOMO, C, et al . Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature** 2005; 438: 1105_1115.

GALLIEN, S; FOURNIER, S; PORCHER, R; BOTTERO, J; RIBAUD, P; SULAHIAN, A et al. Therapeutic outcome and prognostic factors of invasive aspergillosis in a infectious diseases departmente: a review of 34 cases. **Infection**. 2008; 36:533-8

GANCEDO, J.M.A.; GRANDES, J.M.F; DíEZ, M.F. Mastitis por *Aspergillus fumigatus* en ganado ovino. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.1317, 1999.

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

GARCIA, M.E; CABALLERO, J; ALVAREZ-PERES, S; BLANCO, J.L. Seroprevalence of *Aspergillus fumigatus* antibodies in bovine herds with a history of reproductive disorders. **Veterinarni Medicina**, 53, 2008 (3): 117–123

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**. 2006; 52:193-198.

GAVA, M.A. Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos. **Dissertação de mestrado-** escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. 65 fl. Piracicaba/SP-2002

GEISER, D. M; FRISRAD, J.C; TAYLOR, J.W. 1998. Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta-tubulin and hydrophobin DNA sequences. **Mycologia** 90:831–845.

GERMAN, A.C; SHANKLAN, G.S; EDWRDS, J; FLACH, E.J. 2002 Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. **Vet Rec** (2002) 150,513-518

GIL-LAMAINERE, C; ROLLIDES, E; HACKER, J; MULLER, F.M.C. Molecular typing for fungi a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. **Clin Microbiol Infect** 2003; 9: 172_185.

GIORDANO, C; GIANELLA, P; BO, S; VERCELLI, A; GIUDICE, C; DELLA SANTA, D; TORTORANO, A.M; PERUCCIO, C; PEANO, A. 2010. Invasive mould infections of the naso-orbitalregion of cats: a case involving *Aspergillus fumigatus* and an aetiological review. **J.Feline Med. Surg.** 12: 714-723.

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

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

GRIFFIN, R. M. 1969. Pulmonary aspergillosis in the calf. **Veterinary Record** 84: 109–111.

HAMAD, M. Innate and adaptive antifungal immune responses: partners on an equal footing. **Mycoses**, 2012, 55, 205–217

HEIDENREICH, M. **Birds of prey: medicine and management**. Malden MA: Blackwell Science, 1997.

HERBRECHT, R; NATARAJAN-AME, S; LETSCHER-BRU, V; CANUET, M. (2004). Invasive pulmonary aspergillosis. **Semin Respir Crit Care Med** 25(2): 191-202.

HERRERA, T; ULLOA, M. **El reino de los hongos, micología básica y aplicada**. 2a ed. México: Fondo de Cultura Económica, 1998.

HILL, M.W.M; WHITEMAN, C.E; BENJAMIN, M.M; BALL, L. 1971. Pathogenesis of experimental bovine mycotic placentitis produced by *Aspergillus fumigatus*. **Vet. Path.** 8:175-192.

HILLMAN, R.B. 1969. Bovine mycotic placentitis in New York State. Cornell Vet. HONG S.B, GO S.J, SHIN H.D, FRISVAD J.C, SAMSON R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia** 2005; 97: 1316_1329.

HOPWOOD, V; JOHNSON, E.M; CORNISH, J.M; FOOT, A.B; EVANS, E.G; WARNOCK, D.W. Use pastorex aspergillus antigen latex agglutination test for the diagnosis of invasive aspergillosis. **J Clin pathol**. 1995; 48:210-3

HORIE, Y; MIYAJI, M; NISHIMURA, K; TAGUCHI, H; UDAGAWA, S. *Aspergillus fumisynnematus*, a new species from Venezuelan soil. **Mycoscience** 1993; 34: 3_7.

HORVATH, J.A; DUMMER, S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. **Am J Med**. 1996; 100:171-8

IUCN. 2007. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Accessed: May 2008.

IUCN. 2009. 2009 Red List of Threatened Species. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em 28-07-2011.

JORDAN, F.T; PATTISON, M. **Poultry diseases**. 4th ed. London: Saunders, 1997.

KAHN, F.W; JONES, J.M; ENGLAND, D.M. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. **Am J Clin Pathol**. 1986; 86:518-23

KANO, R; SHIBAHASHI, A; FUJINO, Y; SAKAI, H; MORI, T; TSUJIMOTO, G; YANAI, T; HASEGAWA, A. Two cases of feline orbital aspergillosis due to *Aspergillus udagawae* and *A. viridinutans*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2012.31;75(1):7-10.

KATZ, M.E; DOUGALL, A.M; WEEKS, K; CHEETHAM, B.F. 2005. Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. **J. Clin. Microbiol**. 43:551–555.

KEARNS, K.S; LOUDIS, B. Avian Aspergillosis. In: Recent Advances in Avian Infectious Diseases, Ithaca NY: International Veterinary Information Service. Available at: <<http://www.ivis.org>> Accessed: august 2007.

KENDALL, A; BRÖJER, J; KARLSTAM, E; PRINGLE, J. 2008. Enilconazole treatment of horses with superficial *Aspergillus* spp. rhinitis. **J. Vet. Intern. Med.** 22:1239-1242.

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

KLICH, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraal bureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, The Netherlands. 510pp., 2002

KNUTSEN, A.P; SLAVIN, R.G. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma and cystic fibrosis. **Clin and Develop Immun**, Ciaro, v.2011, 2011.

KOICHI, M; MICHIIHIRO, T. Serological Test for Diagnosis of Pulmonary Aspergillosis in penguins by Detecting Galactomannan. **Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. 1996; 1(2):105-108.

KONTOYIANNIS, D.P; BODEY, G.P. Invasive aspergillosis in 2002: an update. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2002; 21: 161-72

KOZAKIEWICZ, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. **Mycol. Pap.** 161, 1^188.

LACAZ, C.S; PORTO, E; MARTINS, J.E.C; HEINS-VACCARI, E.M; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica** – Lacaz. Ed. Sarvier, 2002. 1104p.

LANE, J.G; WARNOCK, D.W, 1977. The diagnosis of *Aspergillus fumigatus* infection of the nasal chambers of the dog with particular reference to the value of the double diffusion test. **J. Small Anim. Pract.** 18, 169– 177.

LARONE, D. H. (2002). **Medically Important Fungi A guide to identification**. Washington, ASM Press.

LARSEN, T.O; SMEDSGAARD, J; NIELSEN, K.F; HANSEN, M.E; FRISVAD, J.C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Nat Prod Rep** 2005; 22: 672_695.

LATGE, J.P; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Curr Opin. Microbiol.**, v.5.p 355-358, 2002.

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

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

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

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

LOZANO, G.A; LANK, D.B. 2003. Seasonal trade-offs in cell-mediated immunosenescence in ruffs (*Philomachus pugnax*). **Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci** 270:1203–1208

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

MACHADO, S.L; MACHADO, R.D. **Imunologia básica aplicada as análises clínicas**. Universidade federal do Rio de Janeiro. 171p.2002

MACHIDA, M; ASAI, K; SANO, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature** 2005; 438: 1157_1161.

MAERTENS, J; THEUNISSEN, K & LAGROU, K. Galactomannan testing. In: **Aspergillosis from Diagnosis to prevention**. Pasqualotto, A.C. ed. Springer, NL 2010: 105-124

MARR, K.A; PATTERSON, T; DENNING, D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. **Infect Dis Clin North Am**. 2002 Dec; 16:875-94

MARTINS, A.M. Avaliação de parâmetros sanguíneos e medidas de peso na reabilitação de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*, Foster 1781). **Trabalho de conclusão apresentado ao curso de ciências biológicas** para obtenção do título de biólogo. Universidade Federal de Pelotas/UFPeL. 39fl. Pelotas, 2010.

MCWHINNEY, P.H; KIBBLER, C.C; HAMON, M.D; SMITH, O.P; GANDHI, L.B; BERGER, L.A. et al. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. **Clin Infect Dis**. 1993; 17:397-404.

MENNINK-KERSTEN, M.A; DONNELLY, J.P; VERWEIJ, P.E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. **Lancet Infect Dis**. 2004; 4:349-57

MITCHELL, C.G; SLIGHT, J; DONALDSON, K. Diffusible component from the spore surface of the fungus *Aspergillus fumigatus* which inhibits the macrophage oxidative burst is distinct from gliotoxin and other hyphal toxins. **Thorax** 1997; 52: 796_801.

MONTEROS, E; CARRASCO, L; KING, J.M; JENSEN, H.E. Nasal zygomycosis and pulmonary aspergillosis in an American bison. **Journal of Wildlife Diseases**, 35(4), 1999, pp. 790–795

MURAKAMI, H; HAYASHI, K; USHIJIMA, S. Useful key characters separating 3 *Aspergillus* taxa _ *Aspergillus sojae*, *Aspergillus parasitus* and *Aspergillus toxicarius*. **J Gen Appl Microbiol** 1982; 28: 55_60.

NIERMAN, W.C; PAIN, A; ANDERSON, M.J, et al . Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature** 2005; 438: 1151_1156.

NOURRY, L; GAGNADOUX, F; PIERROT, M; GOURDIER, A.L; MERCAT, A; RACINEUX, J.L. 2005. Invasive pulmonary aspergillosis complicating septic shock. **Rev Mal Respir** 22(5 Pt 1): 806-10.

O'FEL, A. 1997. Parasitologie, Mycologie. Maladies parasitaires et fongiques. 4^e édition. **Assoc franc des prof de parasit et C et R. Rue Faidherbe**. 7-272.

OGLESBEE, B.L. Mycotic Diseases. In: Altman RB, Clubb SL, Dorrestein GM, Quesenberry K, editors. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1997.

OUCHTERLONY, O. 1949. Antigen–antibody reactions in gels. **Acta Pathol. Microbiol. Scand**. 26, 507–515.

PARMENTIER, H.K; LAMMERS, A; HOEKMAN, J.J; REILINGH, G.D; ZAAENEN, I.T.A; SAVELKOUL, H.F.J 2004. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. **Dev Comp Immunol** 28:39–49

PAUW, B.D; WALSH, T.J; DONNELLY, J.P; STEVENS, D.A; EDWARDS, J.E; CALANDRA, T et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. **Cli Infect Dis**. 2008; 46: 1813-21.

PÉREZ, J; CARRASCO, L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. **Rev Iberoam Micol**. 2000; 17: 18-22.

PERLROTH, J; CHOI, B; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections : epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med Mycol**. 2007; 45:321-46

PETERSON, S. W; ITO, Y; HORN, B.W; GOTO, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia** 93:689–703.

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. 2002; 13:137-142.

PICKETT, J. P; MOORE, C.P; BEEHLER, B.A; GENDRON- FITZPATRICK, A; DUBIELZIG, R.R. 1985. Bilateral chorioretinitis secondary to disseminated aspergillosis in an alpaca. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 187: 1241–1243.

POLI, G; PONTI, W; BALSARI, A; ADDIS, F; MORTELLARO, C.M. 1981. *Aspergillus fumigatus* and specific precipitins in dogs with turbinate changes. **Vet. Rec.** 108, 143–145.

PRINGLE, A; BAKER, D.M; PLATT, J.L, et al. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Evolution** 2005; 59: 1886_1899.

QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B.K; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994.

RAJA, N. S; SINGH, N.N. 2006. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host. **J Microbiol Immunol Infect** 39(1): 73-7.

RAMÍREZ, L.J; CHÁVEZ, S.L; VELASCO, G. Reporte de un caso de aspergilosis en un ave búho cornudo (*Pseudocops clamator*) en el zoológico Miguel Alvarez del Toro, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. **Memorias del XIX Simposio Sobre Fauna Silvestre**, Gral. MV Manuel Cabrera Valtierra; 2002 noviembre 27-29; México: 2002.

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

REDIG, P.T. Fungal diseases. In: Samour J, editor. **Avian medicine**; London: Mosby, 2000

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

REDIG, P.T. Mycotic infections of birds of prey. In: **Fowler ME, editor. Zoo and wild animal medicine** 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1986.

RICHARD, J.L. Aspergillosis. In: **Calnek BW, editor. Diseases of poultry**. 10th ed. Iowa State University Press, 1997.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J Antimicrob Chemother.** 2005; 56: 5-11.

RICHARDSON, M. D; WARNOCK, D.W. 2003. Fungal Infection Diagnosis and Management, 3th edition. Victoria, **Blackwell Publishing Asia Pty Ltd**. 161:1–188

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

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

ROSSKOPF, W; WOERPEL, R. Diseases of cage and aviary birds. 3rd ed. Baltimore: **Williams and Wilkins**, 1997.

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

RUSSEL, M.; HOLCOMB, J; BERKNER, A. 30-Years of Oiled Wildlife Responses Statistics. *In: Proceedings: 7th International Effects of Oil and Wildlife Conference.* Hamburg, Germany 2003; pp.1-18.
<http://wildpro.twycrosszoo.org/S/00Ref/ProceedingsContents/p14.htm>

SABALLS-RADRESA, P; LOPEZ-COLOMES, J.L; GIMENO-COBOS, J; KNOBEL, H. 2000. Invasive aspergillosis: treatment. *Rev Iberoam Micol* 17(3): S93-6.

SAITO, M; TSURUTA, O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. **Proc Japan Mycotoxicolog Soc** 1993; 37: 31_36.

SAMARAKOON, P; SOUBANI, A.O. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. **Chron Respir Dis.** 2008; 5:19-27.

SAMSON, R.A; PITT, J.I. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Amsterdam: **Harwood Academic Publishers**, 2000.

SAMSON, R.A; HONG, S.B; FRISVAD, J.C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* September 2006, 44, S133_S148

SANCHEZ, P.P; COUTINHO, S.D.A. Aspergilose em cães- Revisão. **Rev Inst Ciênc Saúde** 2007; 25(4):391-7

SANTOS, J.A; FARIA, J.F. 1959. Aspergilose do aparelho respiratório de bezerros. **Arqs Inst. Biol. Animal**, Rio de J., 2:15-20.

SAUNDERS, J.H; CLERCX, C; SNAPS, F.R; SULLIVAN, M; DUCHATEAU, L; BREE, J.H, *et al.* Radiographic, magnetic resonance imaging, computed tomographic, and rhinoscopic features of nasal aspergillosis in dogs. **J Am Vet Med Assoc.** 2004;225(11):1703-12.

SCHUSTER, E; DUNN-COLEMAN, N; FRISVAD, J.C; VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger*- a review. **Appl Microbiol Biotechnol** 2002; 59: 426_435.

SEVERO, L. C; BOHRER, J.C; GEYER, G.R; FERREIRO, L. 1989. Invasive aspergillosis in an alpaca (*Lamos pacos*). **Journal of Medical and Veterinary Mycology** 27: 193–195.

SHARMA, O. P; CHWOGULE, R. 1998. Many faces of pulmonary aspergillosis. **Eur Respir J** 12(3): 705-15.

SHARP, N.J.H. Canine nasal aspergillosis-penicilliosis. *In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and the cat.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1998. p.404-9.

SHARP, N.J.H; BURRELL, M.H; SULLIVAN, M. et al. 1984 Canine nasal aspergillosis: serology and treatment with ketoconazole. **Journal of Small Animal Practice** 25:149-158.

SHOHAM, S; LEVITZ, S.M. The immune response to fungal infections. **Br J Haematol.**129:569. 2005

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

SILVA-FILHO, RP; RUOPPOLO, V. Sphenisciformes (Pinguim). *In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária.* São Paulo, SP: Roca, 2006: 309-323.

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

SLAVIN, M; FASTENAU, J; SUKAROM, I; MAVROS, P; CROWLEY, S; GERTH, WC. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. **Int J Infect Dis.** 2004; 8:111-20

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **J Chromatogr A** 1997; 760: 264_270.

SMITH, L.N; HOFFMAN, S.B. 2010. A case series of unilateral orbital aspergillosis in three cats and treatment with voriconazole. **Vet. Ophthalmol.** 13: 190-203.

SMITS, J. E., BORTOLOTTI, G. R; TELLA, J. L. 1999 Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. **Funct. Ecol.** 13, 567± 572.

STEVENS, D.A.; KAN, V.L.; JUDSON, M.A.; MORRISON, V.A.; DUMMER, S.; STONE W.B; OKONIEWSKI J.C. Necropsy findings and environmental contaminants in common loons from New York. **J Wildl Dis.** 2001; 37 (1): 178-184.

STYNEN, D; GORIS, A; SARFATI, J; LATGE, J.P. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. **J Clin Microbiol.** 1995; 33:497-500

TASKER S; KNOTTENBELT C.M; MUNRO E.A.C; STONEHEWER J; SIMPSON J.W; MACKINT A.J. Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. **J Small Anim Pract.** 1999;40(10): 473-8.

TEKAIA, F; LATGÉ, J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Cur Opin Microbiol.**, v.8, p 1-8, 2005.

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

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

TSUJITA, H; PLUMMER, C.E. Corneal stromal abscessation in two horses treated with intracorneal and subconjunctival injection of 1% voriconazole solution. **American College of Veterinary Ophthalmologists, Veterinary Ophthalmology** (2012) 1-8.

VARGA, J; FRISVAD, J.C; KOCSUBÉ, S; BRANKOVICS, B; TÓTH, B; SZIGETI, G; SAMSON, R.A. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Mycology** 69: 1-17, 2011

VARGA, J; VIDA, Z; TOTH, B; DEBETS, F; HORIE, Y. 2000. Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species. **Antonie Leeuwenhoek** 77: 235–239.

WALSH, T. J., V; PETRAITIS, R; PETRAITIENE, A; FIELD-RIDLEY, D; SUTTON, M; GHANNOUM, T; SEIN, R; SCHAUFLE, J; PETER, J; BACHER, H; CASLER, D; ARMSTRONG, A; ESPINEL-INGROFF, M; RINALDI, G; LYMAN, C.A. 2003. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin **B. J. Infect. Dis.** 188:305–319.

WANG, L; UOKOYAMA, K; MIYAJI, M; NISHIMURA, K. Mitochondrial cytochrome b gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. **J Clin Microbiol** 2000; 38: 1352_1358.

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

XAVIER M.O; SOARES M.P; CABANA A.L; SILVA-FILHO R.P; RUOPPOLO V; MEIRELES M.C.A; SEVERO L.C. 2011. Clinical and pathological findings of aspergillosis in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Cie. Anim. Bras.** v.12, n.3, p. 520-524, jul./set. 2011

XAVIER, M.O; PASQUALOTTO, A.C. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Vol. 1, n1. Janeiro / fevereiro / março. 2011

XAVIER, M. O; FARIA, R.O. Aspergilose. In: Mário Carlos Araújo Meireles; Patrícia da Silva Nascente. (Org.). Micologia Veterinária. 1ed.Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009, v. , p. 205-223.

XAVIER, M.O; PASQUALOTTO, A.C; SOARES, M.P; SILVA-FILHO, R.P; MEIRELES, M.C.A; SEVERO, L.C. 2008a. Aspergillosis in penguins: gross lesions in 15 cases. **3rd Advances Against Aspergillosis**, Miami, Florida, USA, 132

XAVIER, M.O. Aplicações e limitações do método de detecção do antígeno galactomanana para o diagnóstico de aspergilose. 104f., 2008b **Tese (doutorado em ciências pneumológicas- área de conhecimento: Ciências pneumológicas- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**

XAVIER, M.O; SOARES, M.P; MEINERZ, A.R.M; NOBRE, M.O; OSÓRIO, L.G; SILVA-FILHO, R.P; MEIRELES, M.C.A. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2007; 38: 480-484.

XAVIER, M.O. Aspergilose em Pingüins em Cativeiro: Diagnóstico, Prevenção e Controle em Centro de Recuperação de Animais Marinhos. 94f. 2007. **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). Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

YAMAZAKI, T; KUME, H; MURASE, S; YAMASHITA, E; ARUSAWA, M. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in anual of the pathological autopsy cases in Japan. **J Clin Microbiol**. 1999; 37: 1732-8

YOUNG, E.A; CORNISH, T.E; LITTLE, S.E. Concomitant mycotic and verminous pneumonia in a blue jay from Georgia, **J Wildl Dis**. 1998; 34 (3): 625-628.

ZOOK, B.C; MIGAKI, G. 1985. Aspergillosis in animals, p. 207-256. In: Al-Doory Y. & Waagner G.E. (ed.) Aspergillosis. **Charles C. Thomas Publisher**, Springfield, Illinois.

APÊNDICES

Apêndice A

Artigo publicado na revista A hora Veterinária (Julho/Agosto 2012)

A Hora Veterinária – Ano 32, nº 188, julho/agosto/2012

Aspergilose sinonasal canina

Ângela Leitzke Cabana, MV, Mestranda do PPG em Veterinária, UFPel – cabanangela@gmail.com;
(53) 32757140; Rua Alcides Maia, 152, Fragata. CEP: 96040-220, Pelotas, RS

Melissa Orzechowski Xavier, MV, MSc, Dra. Profa. de Micologia, Universidade Federal de Rio Grande, FURG – melissaxavier@ig.com.br; (53) 32338871.

Luiza da Gama Osório, MV, MSc, Doutoranda do PPG em Ciências Veterinárias, UFRGS – luizaosorio@yahoo.com; (53) 32757140; Rua Benjamim Constant, 1708 apto.304 CEP:96010-020

Josiara Furtado Mendes, Bióloga, Mestranda do PPG em Ciências Veterinárias, UFRGS-- josiara.mds@hotmail.com, (53) 91095048, Rua Cônego Siqueira Canabarro, 641 A Apto 401 Cep96030-280

Caroline Bohnen de Matos, M.V. Mestranda do PPG em Veterinária, UFPel- bohnencarol@gmail.com; (53)91065597; Rua Adolfo Aveiro, 304, Areal, CEP: 96077-520, Pelotas, RS.

Mário Carlos Araújo Meireles, MV, MSc, Dr. Prof. Associado de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, UFPel – meireles@ufpel.edu.br; (53) 32757140

Resumo

A aspergilose sinonasal canina é uma infecção fúngica crônica que culmina com rinite e sinusite destrutiva. Alguns fatores relacionados ao hospedeiro aumentam a predisposição à colonização por *Aspergillus* spp. e desencadeamento da micose. Esta enfermidade fúngica se caracteriza por três principais sinais clínicos: dor facial, secreção crônica unilateral passando à bilateral e despigmentação/ulceração externa da narina. Estes sinais são de extrema importância para o diagnóstico presuntivo de aspergilose sinonasal, cuja confirmação requer associação de exames micológico, histopatológico e/ou sorológico. A micose apresenta um prognóstico de reservado a bom, sendo o tratamento tópico com antifúngicos indicado como primeira escolha. Aspectos referentes à etiologia, patogenia, diagnóstico e tratamento desta enfermidade são abordados nesta revisão.

Palavras-chave: Micose; *Aspergillus*; rinite; sinusite.

Abstract

Canine sinonasal aspergillosis is a chronic fungal infection that promotes destructive rhinitis and sinusitis. Some factors related to the hosts increase the predisposition to *Aspergillus* colonization and consequent mycosis development. Three most important clinical signs are described: nasal pain, chronic nasal discharge unilateral to bilateral, discoloration/ulceration of external nostril. The association of these three clinical signs is extremely important to the presumptive diagnostic of sinonasal aspergillosis. Laboratorial exams are necessary to the diagnostic confirmation, as direct examination, mycological cultive, histopathology and/or serology. The disease has a reserved to good prognosis, and the topical treatment with antifungal drugs is indicated as the first choice. Aspects concerning the etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment of this illness are discussed in this review.

Keywords: *Aspergillus*; rhinitis; sinusitis; mycosis.

Resumen

Canino sinonasal aspergilosis es una infección fúngica crónica que promueve la rinitis y la sinusitis destructiva. Factores relacionados con el animal aumentan la predisposición a la colonización por *Aspergillus* spp. y la consiguiente desarrollo de la enfermedad. Esto básicamente se caracteriza por tres más importantes signos clínicos: dolor facial, secreción nasal crónica unilaterales y bilaterales, y despigmentación / ulceración de la nariz externa. Esta triada clínica es de suma importancia para el diagnóstico presuntivo, cuya confirmación requiere pruebas de laboratorio como el examen directo, la cultura micológica, histopatología y / o serología. La enfermedad, tiene el pronóstico reservado a bueno, y el tratamiento tópico con antimicótico es indicado como primera opción. Aspectos relativos a la etiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad se discuten en esta revisión.

Palabras clave: *Aspergillus*; rinitis; sinusitis; micosis.

Résumé

L'aspergillose nasosinusienne canine est une infection fongique qui culmine en rhinite chronique et sinusite destructrice. Certains facteurs liés à l'hôte augmentent la prédisposition à la colonisation par *Aspergillus* spp. et le déclenchement de la mycose. Cette maladie fongique se caractérise par trois principaux signes cliniques: douleur faciale, sécrétion chronique unilatérale et puis bilatérale et dépigmentation/ulcération externe de la narine. Ces signes sont extrêmement importants pour le diagnostic présomptif de l'aspergillose nasosinusienne, dont la confirmation nécessite des tests de laboratoire tels que l'examen direct, culture mycologique, l'histopathologie et /ou sérologie. La maladie présente un pronostic qui varie de réservé à bon et le traitement topique avec antifongique est indiqué comme premier choix. Aspects liés à l'étiologie, la pathogenèse, le diagnostic et le traitement de cette maladie sont abordés dans cette revue.

Mots-clés: Mycose; *Aspergillus*, rhinite, sinusite.

Introdução

A aspergilose constitui um grupo de doenças causadas por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo o mais importante deles o *A. fumigatus* (fig.1). Dentre as formas clínicas da enfermidade se encontram a asma alérgica, rinite micótica sinonasal, aspergilose broncopulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva [1,2].

A aspergilose sinonasal é uma doença relativamente comum em cães adultos jovens, especialmente dolicocefálicos [3,4], correspondendo a uma taxa de 7 a 34% dos casos de doença nasal crônica [5,6]. Esta é uma enfermidade grave e de caráter lento e progressivo, que consiste em uma infecção fúngica localizada no trato respiratório superior, especialmente seios frontais e cavidade nasal, levando a rinite e sinusite destrutiva [3,4,6,7].

Etiologia

A aspergilose sinonasal canina é uma doença causada por fungos do gênero *Aspergillus*, os quais possuem distribuição mundial. Estes são considerados ubíquos e retiram os nutrientes de que necessitam a partir dos mais variados substratos, podendo ser isolados do solo, água, ar, alimentos, superfícies, entre outros [8,9].

Aspergillus spp são fungos filamentosos que possuem como característica uma estrutura de esporulação composta por hifas diferenciadas em célula pé, conidióforo, vesícula e células conidiogênicas chamadas de fiálides, as quais dão origem aos conídios (fig.2). Algumas espécies de *Aspergillus* apresentam ainda uma camada de células entre a vesícula e as fiálides, conhecidas como métulas [8]. Apenas 20 das 100 espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas patogênicas, sendo a principal envolvida em quadros clínicos nos animais, *A. fumigatus*, representando mais de 90% dos casos [3,4,7,8,10].

Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados oportunistas, não possuindo a capacidade de causar doença primária [3,10]. Os fatores que favorecem a patogenicidade destes agentes fúngicos são, a produção de enzimas (lipases, fosfolipases e proteases), as adesinas, o rápido crescimento das hifas, a termotolerância e a produção de toxinas. Dentre as toxinas destaca-se a gliotoxina, produzida principalmente por *A. fumigatus*, que inibe o sistema mucociliar do hospedeiro e a fagocitose dos macrófagos, e bloqueia a ativação de células T e B, tanto LT auxiliares como LT citotóxicas [1,7,11,12].

Epidemiologia

A aspergilose sinonasal canina tem sua distribuição relacionada à ocorrência do fungo [8,9]. Acomete principalmente cães adultos jovens, especialmente de um a sete anos de idade, dolicocefálicos ou mesocefálicos [3,4]. Pastor Alemão, Rottweiler, Retriever do Labrador, Golden Retriever e Collie são as raças mais suscetíveis [3,5,7].

Outros fatores como neoplasias e/ou uso de quimioterápicos, tratamento prolongado com corticosteróides, doenças imunossupressoras e doenças virais podem predispor a aspergilose canina. Porém, a imunossupressão sistêmica não parece ser o principal fator predisponente para aspergilose sinonasal em cães,

sendo relacionada com uma disfunção imune local, tais como rinites/sinusites alérgicas ou presença de corpo estranho [14,13].

Patogenia

Por serem fungos anemófilos, todos os seres vivos inalam dezenas a centenas de conídios (propágulo infectante) de *Aspergillus* spp., o que permite que este fungo possa fazer parte da microbiota transitória do trato respiratório de todos os animais, sendo debelado pelo sistema mucociliar, células de defesa e IgA, o que impede a colonização pelo fungo e formação de hifas [3,10,11,12,15].

A rinite destrutiva ocorre devido ao agravamento do processo inflamatório associado à produção de enzimas e toxinas fúngicas, que culminam com destruição tecidual (especialmente de cornetos nasais) e formação de granulomas e placas micóticas na cavidade nasal, que progride para seios paranasais, especialmente frontais [6,7]. A lesão permanece localizada, mas se ocorrer invasão da placa cribiforme, pode atingir o sistema nervoso central [4]. Em cães, o padrão de citocinas liberado durante o processo inflamatório modula uma resposta humoral sobreposta à celular. Estas citocinas suscitam uma resposta Th1 ineficaz na resolução da infecção, porém capaz de prevenir a invasão e a disseminação do agente, mantendo a infecção localizada no trato respiratório superior, através da função imunorregulatória da IL-10 que é secretada em grande quantidade na espécie canina [7,16].

Sinais clínicos

Os cães apresentam inicialmente secreção nasal serosa unilateral, a qual progride para mucopurulenta, podendo se tornar bilateral. A manutenção da secreção nasal por período prolongado (geralmente mais de três meses) ocasiona despigmentação ou até mesmo ulceração das narinas [3,4,10]. A ocorrência de episódios de epistaxe é outro sinal comumente encontrado em cães acometidos [3,10], assim como dor facial à palpação devido a destruição dos cornetos nasais [4,10]. Em casos mais graves e avançados, pode ser evidenciada distorção facial ou deformação do plano nasal, bem como epífora devido a obstrução do canal lacrimal [5,7].

Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da aspergilose sinonasal canina depende da associação de resultados de exames clínicos, laboratoriais e de imagem, considerando a similaridade a outras alterações [7,10]. O histórico do animal é importante, com maior atenção em cães com alterações crônicas na cavidade nasal e seios nasais [14].

No exame radiológico observa-se como principais alterações o aumento na radioluscência da cavidade nasal e perda de detalhes dos cornetos nasais [3,5,7]. Granulomas fúngicos em cavidade nasal e seios frontais podem mimetizar neoplasia demonstrando uma lesão com densidade de massa de tecido mole [6,7]. A rinoscopia permite visualizar a presença de granulomas fúngicos, bem como de placas micóticas na mucosa nasal, que podem apresentar coloração branca, amarelada ou esverdeada [3,5,7].

A secreção nasal colhida por *swabs* intranasais, apresenta baixa sensibilidade e especificidade, porém constitui um método rápido e prático de coleta. Já o lavado nasal, escovado de mucosa nasal ou biópsias da lesão são mais consistentes. Nesse sentido, uma amostra ideal consiste em biópsia guiada por rinoscopia, procedimento este invasivo e que requer anestesia geral do animal examinado [5].

Cabe ressaltar que um cultivo positivo para *Aspergillus* spp. não é sinônimo de aspergilose, sendo muitas vezes um falso-positivo devido à característica anemófila do gênero, que o capacita a ser um dos principais contaminantes de cultivos laboratoriais [3]. A confirmação diagnóstica se dá pela associação do isolamento fúngico com a visualização de estruturas fúngicas no tecido (por histologia ou exame micológico direto) e/ou com resultados positivos em testes sorológicos [5,17].

Os métodos sorológicos mais utilizados para diagnóstico de aspergilose sinonasal canina se baseiam na detecção de IgG anti-*Aspergillus* spp. em amostras séricas, a partir da técnica de imunodifusão radial dupla em gel de ágar (IDGA) ou de ELISA [3,7,14,17]. Estas técnicas são simples e de fácil execução, fornecendo resultado rápido com altas taxas de sensibilidade e especificidade, sendo a IDGA mais específica e o ELISA mais sensível [14,17]. Os resultados destes testes devem ser interpretados no contexto clínico do paciente, pois a presença de anticorpos pode não indicar doença em alguns casos [3,14,17].

Tratamento

O tratamento da aspergilose sinonasal canina deve ser realizado especialmente com antifúngicos tópicos, como enilconazol 2 a 5% ou clotrimazol 1% [3,7,13]. Basicamente, este tratamento pode ser realizado por cateteres cirurgicamente implantados nos seios frontais através de trepanação e instilação do fármaco, duas vezes ao dia, durante sete a 14 dias. Em geral, com esta conduta, a cura clínica chega a 80-90% [3].

Outra forma de tratamento é por instilação intranasal, ou intrasínusal direta - Nesta técnica, o animal deve ser anestesiado e intubado para disposição dos cateteres no meato dorsal nasal e realização de infusão de 0,5g de clotrimazol 1% por narina durante 1 hora, totalizando 1g dissolvido em 1dL de PEG200 [3, 18].

Como principais desvantagens da técnica estão a necessidade de intervenção cirúrgica para trepanação, o período prolongado de tratamento, e a ocorrência de enfisema subcutâneo pós-operatório, bem como de sinais de ptialismo, inapetência e anorexia durante o tratamento [3,4].

Além da infusão intranasal realizada com cateteres dispostos no meato dorsal nasal, outra técnica similar consiste em administração intrasínusal de enilconazol via cateteres guiados por endoscopia. No entanto, nestes casos, é essencial que seja realizado previamente um debridamento extensivo da lesão por rinoscopia [7].

Vantagens importantes são atribuídas a estes dois últimos tratamentos quando comparados com o tratamento a partir de cateteres cirurgicamente implantados, como mínimas infusões antifúngicas (geralmente de 1 a 3 infusões são suficientes), melhor distribuição do medicamento nos seios e menores complicações comparadas com as decorrentes da trepanação [7,19].

O tratamento sistêmico pode ser realizado, no entanto é extremamente prolongado e a taxa de insucesso terapêutico é elevada [19]. Sua principal indicação é em casos de cães com acometimento de placa cribriforme [3,4]. Nestes casos pode-se utilizar itraconazol (5 mg/kg), cetoconazol (5-10 mg/kg) ou tiabendazol (10-20 mg/kg), via oral, duas vezes ao dia, durante no mínimo 10 semanas, sendo o itraconazol o antifúngico que possui maior taxa de sucesso terapêutico dentre os citados (até 70%) [3,7,19].

Em casos graves ou recidivantes é indicada a realização de procedimento cirúrgico para debridar a lesão, juntamente com uma irrigação local com enilconazol

durante a intervenção [3,10]. Nestes casos de abordagem cirúrgica da lesão por *Aspergillus*, pode ser instituído o uso de itraconazol pós-operatório durante cerca de 30 dias como profilaxia de possível disseminação sistêmica fúngica após manipulação [19]. Epistaxe pode ocorrer como complicação no período pós-operatório [3,10,19].

A diminuição significativa da lesão por *Aspergillus* culminará com melhora ou mesmo ausência de sinais clínicos pós-tratamento. Porém, é possível que a cura completa não ocorra e assim, a chance de recidiva seja alta. Por outro lado, mesmo após a cura total da doença, é possível que os animais permaneçam ou retornem a apresentar secreção nasal referente a infecções bacterianas secundárias. Contudo, a rinoscopia subsequente ao tratamento é essencial, buscando diferenciar ou evidenciar rinite/sinusite bacteriana e placas micóticas remanescentes, através da avaliação macroscópica, bem como da colheita de amostra para exame e confirmação laboratorial [19]. O prognóstico da aspergilose sinonasal canina é de reservado a bom [7].

Considerações finais

A distribuição mundial de fungos do gênero *Aspergillus*, bem como de fatores predisponentes para o desencadeamento da aspergilose sinonasal canina não permite justificar a inexistência de relatos da doença no Brasil. É possível que, em nosso país, a falta de suspeição clínica esteja impossibilitando a confirmação diagnóstica, visto que esta requer exames laboratoriais. Por fim, salienta-se a necessidade de inclusão da aspergilose sinonasal canina como potencial diagnóstico em cães com descarga nasal crônica, juntamente com outras possíveis causas, como neoplasias, fístula oronasal, corpo estranho, rinites e sinusites bacterianas, rinite crônica linfoplasmocítica, rinosporidiose, criptococose e esporotricose.

Agradecimentos

Micvet- Centro de diagnóstico e pesquisa em micologia veterinária, CAPES, CNPq, FAPERGS, Marlete Brum Cleff, MV, MSc, Dra. Profa. Adjunta de Terapêutica, UFPel, Patrícia da Silva Nascente, MV, MSc, Dra. Profa. Adjunta de Microbiologia e Imunologia, UFPel, e Isabel Martins Madrid, MV, MSc, Dra. Veterinária, UFPel.

Referências

- [1]BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRÓN, J.; CABALLERO, J.; GARCÍA, M.E. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 10-15, 1998.
- [2]SPREABURY, C.; HOLDEN, D.; AUFAUFRE-BROWN, A.; BAINERIDGE, B.; COHEN, J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol** 1993; 31:615-621.
- [3]BENITAH, N. Canine nasal aspergillosis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v. 21, n. 2, p. 82-88, 2006.
- [4]TELL, L.A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**.v. 43,suppl. 1, p. 71-73, 2005.
- [5]KNOTEK, Z.; FICHTEL, T.; KOHOUT, P.; BENAK, J. Diseases of the nasal cavity in the dog. Aetiology, symptomatology, diagnostics. **Acta Veterinaria Brunensis**. v. 70, p. 73-82, 2001.
- [6]SAUNDERS, J.H.; ZONDERLAND, J.L.; CLERCX, C.; GIELEN, I.; SNAPS, F.R.; SULLIVAN, M.; VANBREE, H.; DONDELINGER, R.F. **Computed tomographic findings in 35 dogs with nasal aspergillosis**.v. 43, n. 1, p. 5-9, 2002.
- [7]PEETERS, D.; CLERCX, C. L'aspergillose nasale dans l'espèce canine. **Annual Médecine Vét.** v. 148, p. 168-173, 2004.
- [8]KLICH, M.A. **Identification of Common Aspergillus Species**. Utrecht: Centraal bureau voor Schimmel cultures, 2002. 116p.
- [9]WARD, O.P.; QIN, W.M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v.58, 75p., 2006.

- [10]WHITE, D. Canine nasal mycosis – light at the end of a long diagnostic and therapeutic tunnel. **Journal of Small Animal Practice**. v. 47, p. 307, 2006
- [11]LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.
- [12]LATGÉ, J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **TRENDS in Microbiology**. v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001
- [13]PEETERS, D.; DAY, M. J.; CLERCX, C. An Immunohistochemical Study of Canine Nasal Aspergillosis. **Journal of Comparative Pathology**. v. 132, p. 283-288, 2005.
- [14]GARCIA, M.E.; CABALLERO, J.; CRUZADO, M.; ANDRINO, M.; GONZALEZ-CABO, J. F.; BLANCO, J. L. The Value of the Determination of Anti-*Aspergillus*IgG in the Serodiagnosis of Canine Aspergillosis: Comparison with Galactomannan Detection **Journal of Veterinary Medicine**.B. v. 48, p. 743-750, 2001.
- [15]SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M..The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 569-582, 2005
- [16] PEETERS, D.; PETERS, I.R.; CLERCX, C.; DAY, M.J. Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in nasal biopsies from dogs with sinonasal aspergillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 318-326, 2006.
- [17]BILLEN, F.; PEETERS, D.; PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; HUYNEN, P.; DE MOL, P.; MASSART, L.; DAY, M.J.; CLERCX, C. Comparison of the value of measurement of serum galactomannan and *Aspergillus*-specific antibodies in the diagnosis of canine sinonasal aspergillosis. **Veterinary Microbiology**. v. 133, p. 358-365, 2009.
- [18]MATHEWS, K.G.; KOBLIK, P.D.; RICHARDSON, E.F.; DAVIDSON, A.P.; PAPPAGIANIS, D. Computed tomographic assessment of noninvasive intranasal infusions in dogs with fungal rhinitis. **Veterinary Surgery**. v. 25, p. 309-319, 1996

[19]CLAEYS, S.; LEFEBVRE, J.B.; SCHULLER, S.; HAMAIDE, A.; CLERCX, C. Surgical treatment of canine nasal aspergillosis by rhinotomy combined with enilconazole infusion and oral itraconazole. **Journal of Small Animal Practice**. v. 47, p. 320-324, 2006.

Figura 1. *Aspergillus fumigatus* (macro e microscopia)

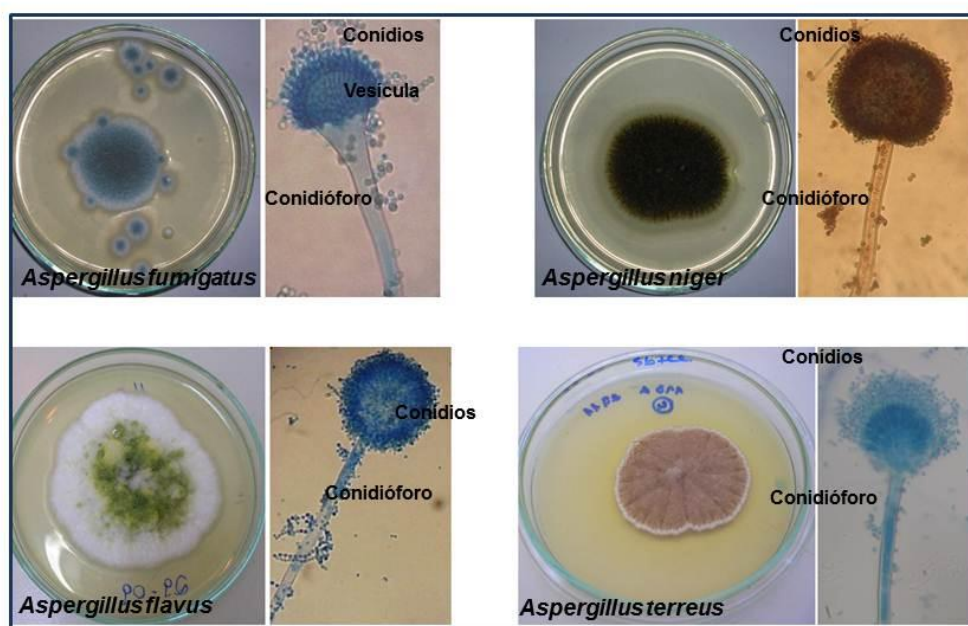


Figura 2. Estruturas fúngicas

Apêndice B

Artigo submetido a revista Avian Diseases (Dezembro 2012)

Lethal concurrent avian malaria and aspergillosis in a Magellanic penguin

(*Spheniscus magellanicus*)

Ângela Leitzke Cabana,^{A,F} Ralph Eric Thijl Vanstreels,^B Melissa Orzechowski Xavier,^C Luiza da Gama Osório,^A Andréa Corrado Adornes,^D Alice Meirelles Leite,^D Mauro Pereira Soares,^E Rodolfo Pinho da Silva-Filho,^D José Luiz Catão-Dias,^B Mário Carlos Araújo Meireles^A

^A Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

^B Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

^C Laboratório de Micologia, Área Interdisciplinar de Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande

^D Centro de Recuperação de Animais Marinhos, Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de Carvalho Dias, Universidade Federal de Rio Grande

^E Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

^F Corresponding author. E-mail: cabanangela@gmail.com

SUMMARY

Avian malaria (*Plasmodium* sp) and aspergillosis (*Aspergillus fumigatus*) are considered the two most relevant infectious diseases for captive penguins. Here we report the case of an adult Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) that died while undergoing rehabilitation. Necropsy findings were characteristic of aspergillosis and suggestive of avian malaria, both were later confirmed through histopathology, histochemistry, mycological culture and electron microscopy. The relative significance of the pathogens and the implications for their diagnosis are discussed

Key words: blood parasite, co-infection, hemosporidian, mycosis, seabird.

Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) are native to Argentina, Chile and the Falkland Islands, and during winter they may swim northwards towards the Uruguayan and Brazilian coast (41). Every year, a fraction of these penguins becomes beach-cast in Argentina, Uruguay and Brazil, particularly if oiled or injured, being then sent to rehabilitation centers (15,16). During rehabilitation as well as when maintained in permanent captivity, these penguins are susceptible to a number of

infectious diseases, among which avian malaria and aspergillosis are considered the most relevant (7,8,11,14,31).

Avian malaria results from the infection by *Plasmodium* sp, protozoans that are transmitted to birds by mosquitoes (Culicidae). Although *Plasmodium* infections tend to be relatively harmless for most birds, some taxa such as penguins are highly susceptible (24,27). The two most commonly reported species infecting penguins are *P. relictum* and *P. elongatum* (7,25), however there also reports involving *P. juxtannucleare* (19), *P. cathemerium* (28) and *P. tejerai* (32). Pathogenesis of avian malaria is complex, and develops from the infection of circulating cells (erythrocytes) and tissues (endothelial cells, hemopoietic system, lymphoid-macrophage system), and the secondary effects associated to the hemolysis, vascular rupture and thromboembolism (2,3,33-36).

Aspergillosis is a fungal infection acquired through the inhalation of *Aspergillus* sp. conidia; this fungal genus is a ubiquitous, saprophytic and opportunist mold (1). Infection is generally thought to be opportunistic, being mostly limited to individuals with impaired immunity (39,40). *A. fumigatus* is the species most frequently reported infecting penguins, but *A. flavus* also occurs occasionally (5,26,42,43). Pathogenesis of aspergillosis is associated to the fungal colonization of the air sacs, lungs, trachea, bronchi and/or nasal cavity, with associated heterophilic and granulomatous responses (10,23,39,43). In some cases, hematogenous dissemination to non-respiratory tissues may also occur (43).

CASE REPORT

An adult female Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) was found beach-cast in the coast of Rio de Janeiro, Brazil, and was transferred for rehabilitation at the Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-FURG – 32°02'S 52°05'W), Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de Carvalho Rios, Universidade Federal do Rio Grande (Rio Grande - RS, Brazil). The penguin had not been oiled and did not present external lesions. Upon admission to CRAM-FURG on 13/11/2005, the bird was molting and had a body mass of 2.9 kg, whereas healthy free-ranging adult Magellanic penguins molt in February-April and weight approximately 4 kg (9,41). Standard rehabilitation protocols (31) were applied during the following two months, however hyporexia and progressive weight lost were observed. On 30/01/2006, with

a body mass of 2.6 kg, the penguin presented apathy, pale mucosa, anorexia and dyspnea, dying within 24 hours.

Necropsy findings included: a large blood clot was contained within the omentum and the serosa of the spleen and syntopic organs (approx. 15 x 6 x 3 cm) (Figure 1a and 1b); marked spleen enlargement (approx. 7 x 4 cm) and with fissures of rupture; marked hepatomegaly; marked lung congestion and edema; mildly thickened (≤ 1 mm) cranial thoracic air sacs with multifocal small white firm nodules (≤ 5 mm) (Figure 1c); a white firm nodule (approx. 25 mm) was also attached to the air sac adjacent to the splenic blood clot (Figure 1a).

Histological examination revealed (Figure 2): severe granulocytic diffuse fibrino-hemorrhagic splenitis, with large areas of hemorrhage; moderate to severe granulocytic interstitial pneumonia, with moderate to severe lung congestion and edema; presence of occasional tissue meronts compatible with *Plasmodium* in the lung; moderate mixed multifocal to coalescent periportal hepatitis, with multifocal foci of extra-medullar hematopoiesis; mild granulocytic myocarditis; mild multifocal tubular renal necrosis. Furthermore, air sacs were thickened by large layers of necrotic-granulocytic material, surrounded by giant cell formation and heterophilic infiltrate (piogranuloma); silver staining (Gomori-Grocott) revealed the presence of abundant fungal hyphae branching at 45° angles within the necrotic material.

Ultrastructural examination of the blood clot revealed the presence of intracytoplasmatic inclusions inside the erythrocytes, which were compatible with early parasitic stages of *Plasmodium* (Figure 3). Swabs were retrieved from the nodular air sac lesions and were cultured at 37 °C in Sabouraud dextrose; after 48 hours, fungal colonies consistent with *A. fumigatus* were observed (macroscopy: filamentous green-bluish surface; microscopy: pyriform vesicle and uniseriate phialides).

DISCUSSION

Avian malaria and aspergillosis are considered the two most relevant infectious diseases for captive penguins (9,31). Their epidemiology, however, is profoundly distinct: avian malaria is a vector-borne protozoan infection that produces sporadic outbreaks with high mortality over a short period of time (4,11,13,37), whereas aspergillosis is an opportunistic fungal respiratory infection that produces chronic and progressive clinical disease and mortality over relatively large periods (12,42,43).

In the studied case, blood volume lost associated to hemorrhage from the spleen rupture was considerable and in association to the pulmonary congestion and splenic parenchymal hemorrhage, rendered hypovolemic/distributive circulatory shock syndrome the most likely cause of death. Moreover, oxygenation was likely severely compromised by the extensive interstitial pneumonia and also, to a lesser extent, due to the thickening and fungal colonization of the air sacs. Red blood cell counts, hemoglobin concentration or hematocrit could not be determined, but anemia is also likely to have occurred due to parasite-induced hemolysis (2,17,33-36). Considering the apparent relative importance of these factors, it seems likely that avian malaria played a more decisive role in leading to death than did aspergillosis.

Concurrent aspergillosis in penguins deceased due to *Plasmodium* infection has been described occasionally. Both Scott (30) and Rewell (29) reported cases of avian malaria in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) at the London Zoological Gardens which had concurrent mycosis; although the etiological agent was not specified, it is fair to presume the authors referred to aspergillosis. Grünberg & Kutzer (21) found that two of the eighteen penguins (*Spheniscus humboldti* and *S. demersus*) from the Schönbrunn Zoo that died during an outbreak of avian malaria also had lesions associated to aspergillosis. While examining 38 Magellanic penguins (*S. magellanicus*) deceased during the summer at the Blank Park Zoo, Fix and colleagues (11) found that 11 (29%) had lesions compatible with both avian malaria and aspergillosis, whereas another 11 (29%) had only signs of avian malaria and 12 (31%) had only lesions of aspergillosis. Because of the gravity of the lesions associated with avian malaria and the celerity with which this disease can produce mortality in penguins, the concurring *Aspergillus* infections in these cases were generally interpreted as secondary necropsy findings. Our necropsy and histopathological findings are coherent with the interpretation that aspergillosis had a longer term and more chronic development than avian malaria. As such, it may be speculated that the animal would have had a slow and progressive *A. fumigatus* infection until the much more abrupt *Plasmodium* sp infection developed and produced death.

The potential role of *Aspergillus* as a predisposing condition, however, should not be disregarded. Even though *Plasmodium* is highly pathogenic to penguins and may cause the death of healthy individuals, subclinical infections are known to occur, particularly in individuals that were previously exposed to the pathogen (8,18). There are also a number of cases of non-vaccinated juvenile Magellanic penguins at

CRAM-FURG in which malarial infection was clinically asymptomatic and failed to produce mortality (R.E.T. Vanstreels, pers. comm.). Furthermore, considering that experimental vaccines may reduce the severity of avian malarial infections in penguins (20) and that corticoid treatment may induce parasite recrudescence (8), it is clear that immune status plays a role in determining the susceptibility of penguins to avian malaria. Because *Aspergillus* elicits a strong immune response, with a marked involvement of heterophils and macrophages (10,23,39), it is likely that a corresponding shift in cytokine secretion and immune cell recruitment/proliferation occurs in the infected penguins, as is known to occur in human and murine aspergillosis (6,22). In this sense, the immune modulation associated to the chronic aspergillosis could result in increased susceptibility to malarial parasites, in an interaction analogous to that demonstrated between nematode infection and malarial parasites in mice (38).

The studied case presented a splenic rupture, a finding that is atypical in aspergillosis and that called attention on the possibility of a concurrent pathological process. In most cases, however, the textbook necropsy findings of avian malaria – splenomegaly, hepatomegaly and lung edema (9,11,31) – are non-specific and may be relatively subtle. In these cases, because the gross findings of aspergillosis are exuberant and promptly detected, institutions sometimes bypass histopathology or complementary diagnostic tests and conclude aspergillosis was the cause of death, thus potentially underestimating the prevalence of avian malaria and other pathological processes. This case therefore illustrates and emphasizes the importance of conducting histopathology and complementary diagnostic tests regardless how exuberant the aspergillosis necropsy findings.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to our colleagues and volunteers at CRAM-FURG, to the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2009/53956-9, 2010/51801-5) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (485489/2012-0, Universal 14/2012).

REFERENCES

1. Ainsworth, G. C., and R. E. Rewell. The incidence of aspergillosis in captive wild birds. J. Comp. Path. 59:213-224. 1949.

2. Atkinson, C. T., and C. Van Riper III. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Bird-parasite interactions: ecology, evolution, and behaviour. Loe, J. E., and M. Kuz, eds. Oxford University Press, Oxford, England. pp. 19-48. 1991.
3. Atkinson, C. T. Avian malaria. In: Parasitic diseases of wild birds. Atkinson, C. T., N. J. Thomas, D. B. Hunter, eds. Wiley-Blackwell, Ames, United States of America. pp. 35-53. 2008.
4. Bueno, M. G., R. P. G. Lopez, R. M. T. Menezes, M. J. Costa-Nascimento, G. F. M. C. Lima, R. A. S. Araújo, F. J. V. Guida, and K. Kirchgatter. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. Vet. Parasitol. 173:123-127. 2010.
5. Carrasco, L., J. S. Lima Jr, D. C. Halfen, F. J. Salguero, P. Sánchez-Cordón, and G. Becker. Systemic aspergillosis in an oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). J. Vet. Med. 48:551-554. 2001.
6. Cenci, E., A. Mencacci, C. F. d'Ostiani, G. Del Sero, P. Mosci, C. Montagnoli, A. Bacci, and L. Romani. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. J. Infect. Dis. 178:1750-1760. 1998.
7. Clarke, J.R., and K. R. Kerry. Disease and parasites of penguins. Korean J. Polar Res. 4:79-96. 1993.
8. Cranfield, M. R., T. K. Graczyk, F. B. Beall, D. M. Ialeggio, M. L. Shaw, and M. L. Skjoldager. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. J. Wildl. Dis. 30:372-376. 1994.
9. Cranfield, M. R. Sphenisciformes (Penguins). In: Fowler, M. E., and R. E. Miller, eds. Zoo and Wild Animal Medicine. W. B. Saunders, Philadelphia, United States of America. pp. 103-110. 2003.
10. Femenia, F., J. J. Fontaine, S. Lair-Fullerger, N. Berkova, D. Huet, N. Towanou, F. Rakotovao, O. I. Granet, G. Le Loc'h, P. Arné, and J. Guillot. Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. Avian Path. 36:213-219. 2007.
11. Fix, A. S., C. Waterhouse, E. C. Greiner, and M. K. Stoskopf. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). J. Wildl. Dis. 24:610-619. 1988.

12. Flach, E. J., M. F. Stevenson, and G. M. Henderson. Aspergillosis in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964 to 1988. *Vet. Rec.* 126:81-85. 1990.
13. Fleischman, R. W., W. J. L. Sladen, and E. C. Melby. Malaria (*Plasmodium elongatum*) in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Am. Vet. Med. Associat.* 153:928-935. 1968.
14. Fowler, G. S., and M. E. Fowler. Order Sphenisciformes (Penguins). In: Fowler, M. E., and Z. S. Cubas, eds. *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press, Ames, United States of America, pp.53-64. 2001.
15. García-Borboroglu, P., P. D. Boersma, V. Ruoppolo, L. Reyes, G. A. Rebstock, K. Griot, S. R. Heredia, A. C. Adornes, and R. P. Silva. Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the Southwest Atlantic. *Mar. Poll. Bull.* 52:193-198. 2006.
16. Garcia-Borboroglu, P., P. D. Boersma, V. Ruoppolo, R. Pinho-da-Silva-Filho, A. Corrado-Adornes, D. Conte-Sena, R. Velozo, C. Myiaji-Kolesnikovas, G. Dutra, P. Maracini, C. Carvalho-do-Nascimento, V. Ramos-Júnior, L. Barbosa, and S. Serra. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. *Mar. Poll. Bull.* 60:1652-1657.
17. Graczyk, T. K., M. L. Shaw, M. R. Cranfield, and F. B. Beall. Hematologic characteristics of avian malaria cases in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) during the first outdoor exposure season. *J. Parasitol.* 80:302-308. 1994.
18. Graczyk, T. K., M. R. Cranfield, T. F. McCutchan, and E. J. Bicknese. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol. Res.* 80:634-637. 1994.
19. Grim, K. C., E. V. Merwe, M. Sullivan, N. Parsons, T. F. McCutchan, and M. Cranfield. *Plasmodium juxtanucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *J. Zoo Wildl. Med.* 34:250-255. 2003.
20. Grim, K. C., T. McCutchan, J. Li, M. Sullivan, T. K. Graczyk, G. McConkey, and M. Cranfield. Preliminary results of an anticircumsporozoite DNA vaccine trial for protection against avian malaria in captive African Black-footed penguins. *J. Zoo Wildl. Med.* 35:154-161. 2004.

21. Grünberg, W., and E. Kutzer. Infektionen mit *Plasmodium praecox* bei Humboldt- (*Spheniscus humboldti*) und Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*). Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, und Hygiene 189:511-520. 1963.
22. Hebart, H., C. Bollinger, P. Fisch, J. Sarfati, C. Meisner, M. Baur, J. Loeffler, M. Monod, J. P. Latgé, and H. Einsele. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. Blood 100:4521-4528. 2002.
23. Jensen, H. E., J. P. Christensen, M. Bisgaard, and O. L. Nielsen. Immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis in Turkey poults. Avian Path. 26:5-18. 1997.
24. Jones, H. I., and G. R. Shellam. Blood parasites in penguins, and their potential impact on conservation. Mar. Ornithol. 27:181-184. 1999.
25. Jones, H. I., and G. R. Shellam. The occurrence of blood-inhabiting protozoa in captive and free-living penguins. Polar Biol. 21:5-10. 1999.
26. Khan, Z. U., M. Pal, D. K. Paliwal, and V. N. Damodaran. Aspergillosis in imported penguins. Sabouraudia 15:43-45. 1977.
27. LaPointe, D. A., C. T. Atkinson, and M. D. Samuel. Ecology and conservation biology of avian malaria. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1249:211-226. 2012.
28. Luera-Carbo, R. El parasitismo en el zoo. Revista Veterinaria Venezolana 18:185-188. 1965.
29. Rewell, R. E. Report of the Pathologist for the Year 1947. Proc. Zool. Soc. Lond. 118:501-514. 1948.
30. Scott, H. H. Report on the deaths occurring in the Society's Gardens during the year 1926. Proc. Zool. Soc. Lond. 90:173-198. 1927.
31. Silva-Filho, R. P., and V. Ruoppolo. Sphenisciformes (Pingüim). In: Cubas, Z. S., J. C. R. Silva, J. L. Catão-Dias, eds. Tratado de animais selvagens - medicina veterinária. Roca, São Paulo, Brazil. pp. 309-323. 2007.
32. Silveira, P., N. O. Belo, G. Lacorte, C. K. M. Kolesnikovas, R. E. T. Vanstreels, M. Steindel, J. L. Catão Dias, G. Valkiūnas, and E. M. Braga. A malaria parasite *Plasmodium tejeraei* in South American penguins: parasitological and molecular characterization. Parasitol. Int., in press.
33. Soni, J. L., and H. W. Cox. Pathogenesis of acute avian malaria- I. Immunologic reactions associated with anemia, splenomegaly, and nephritis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:577-585. 1974.

34. Soni, J. L., and H. W. Cox. Pathogenesis of acute avian malaria- II. Anemia mediated by a cold-active autohemagglutinin from the blood of chickens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:206-213. 1975.
35. Soni, J. L., and H. W. Cox. Pathogenesis of acute avian malaria- III. Antigen and antibody complexes as a mediator of anemia in acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:423-430. 1975.
36. Soni, J. L., and H. W. Cox. Pathogenesis of acute avian malaria- IV. Immunologic factors in nephritis of acute *Plasmodium gallinaceum* infections of chickens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:423-430. 1975.
37. Stoskopf, M. K., and J. Beier. Avian malaria in African black-footed penguins. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 175:944-947. 1979.
38. Su, Z., M. Segura, K. Morgan, J. C. Loredó-Osti, and M. M. Stevenson. Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. *Infect. Immun.* 73:3531-3539. 2005.
39. Tsai, S. S., J. H. Park, K. Hirai, and C. Itakura. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Path.* 21:699-709. 1992.
40. Verstappen, F. A. L. M., and G. M. Dorrestein. Aspergillosis in Amazon parrots after corticosteroid therapy for smoke-inhalation injury. *J. Avian Med. Surg.* 19:138-141. 2005.
41. Williams, T. D., and P. D. Boersma. *Spheniscus magellanicus*. In: Williams, T. D., ed. *The penguins Spheniscidae*. Oxford University Press, Oxford, England. pp. 249-257. 1995.
42. Xavier, M. O., M. P. Soares, A. R. M. Meinerz, M. O. Nobre, L. G. Osório, R. P. Silva-Filho, and M. C. A. Meireles. Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive Magellanic penguins. *Braz. J. Microbiol.* 38:480-484. 2007.
43. Xavier, M. O., M. P. Soares, A. L. Cabana, R. P. Silva-Filho, V. Ruoppolo, M. C. A. Meireles, L. C. Severo. Clinical and pathological findings of aspergillosis in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *C. Animal Brasileira* 12:520-524. 2011.

Fig. 1. Gross necropsy findings. (a) A large blood clot (BC) surrounds the spleen, with a white nodule is attached to its surface (arrow); the intestines (IN) and caudal stomach (ST) are also visible. (b) Dissection of the large blood clot (BC) reveals it surrounds the spleen (SP), which has numerous areas of hemorrhage are visible on the cut surface of the spleen (arrow); parts of the omentum (OM) may also be seen. (c) Mildly thickened right cranial thoracic air sac (AS), with a white nodule compatible with fungal colonization (arrow); an area of the liver (LV) may also be seen. Scale bars represent 2 cm.

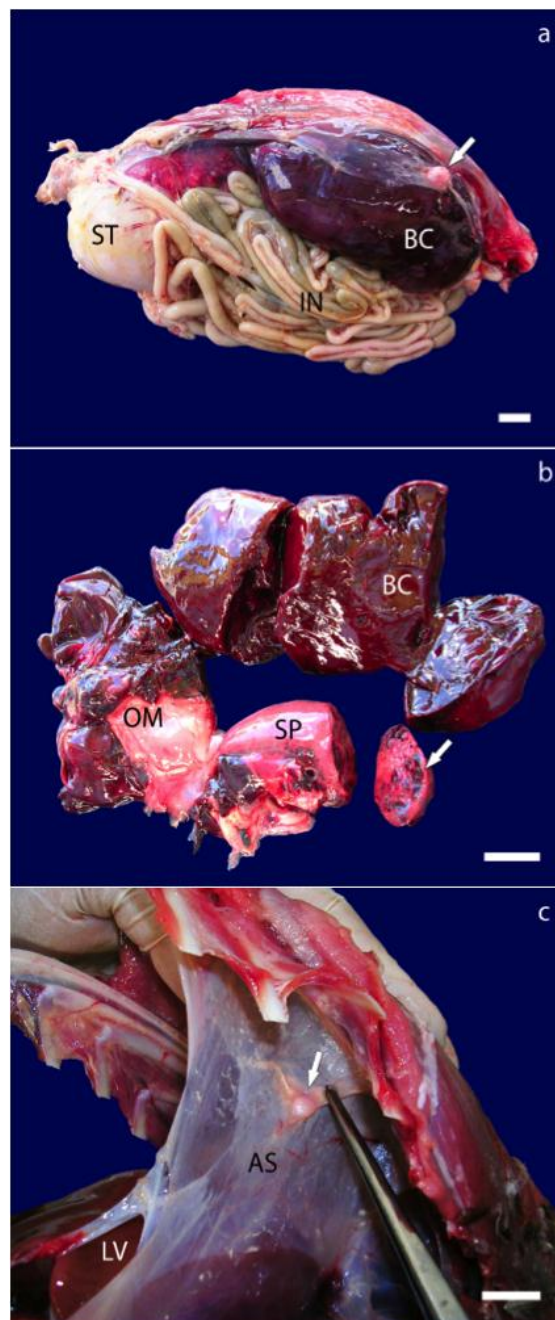


Fig. 2. Select histopathological findings. (a) Spleen (H.E., 40x) with numerous areas of hemorrhage (H) and fibrin deposits (F); fibrin deposit are shown on the detail (H.E., 400x). (b) Lung (H.E., 40x) with marked diffuse congestion and edema. (c) Lung (H.E., 1000x) with a tissue meront (arrow). (d) Air sac

(Gomori-Grocott, 100x) with numerous fungal hyphae (stained in black) within the layers of necrotic tissue.

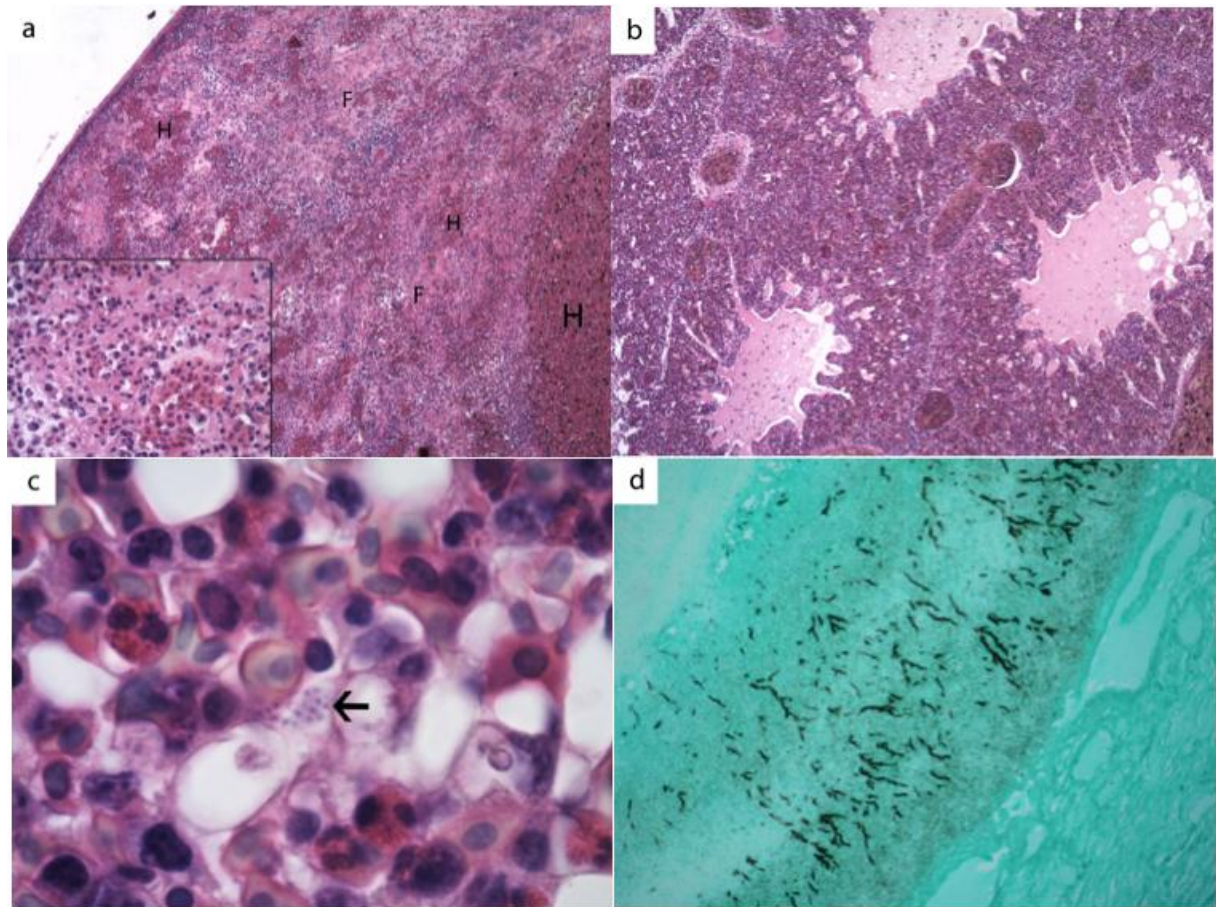
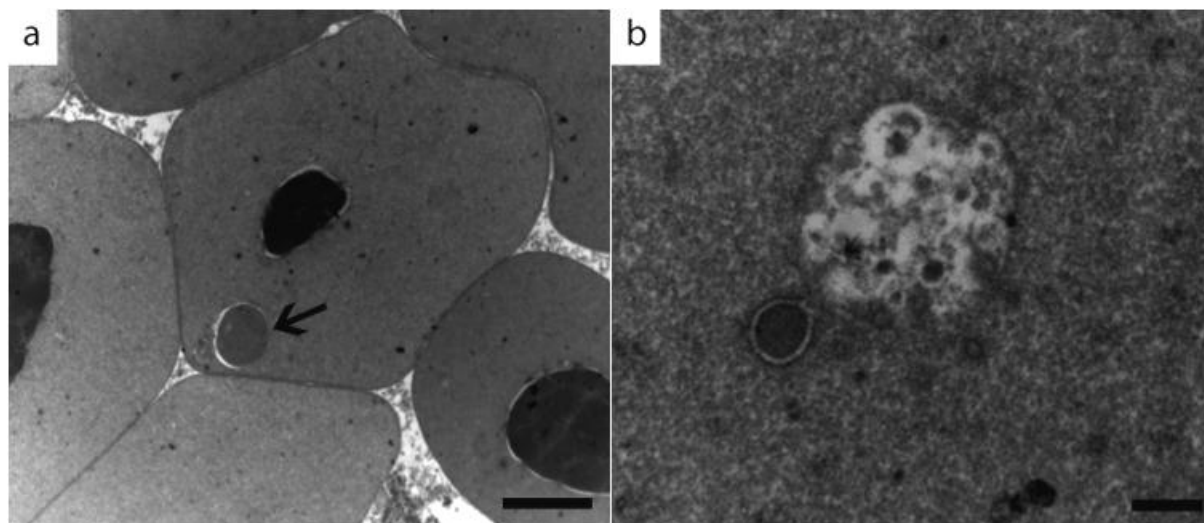


Fig. 3. Ultrastructural examination. (a) Parasitized red blood cell with an intracytoplasmic merozoite (arrow) (scale bar = 2 μ m). (b) Internalized merozoite and in the early stages of parasitophorous vacuole formation (scale bar = 200 nm).



Anexos

Anexo A**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal**

Pelotas, 02 de janeiro de 2012

De: Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)

Para: Professor (a) Mário Carlos de Araújo Meireles

Faculdade de Veterinária

Senhor(a) Professor(a):

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Técnicas diagnósticas para detecção precoce da aspergilose em pinguins-de-Magalhães em reabilitação”**, processo nº23110.006919/2011-26, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 6919).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho

Presidente da CEEA

Anexo B

Normas da Revista Medical Micology

Medical Mycology/Norms

Official journal for The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)

2011	Impact	Factor:	2.457
5-year	Impact	Factor:	2.327
Ranking:	8/24 (Mycology),	5/143 (Vet	sciences)

© Thomson Reuters, Journal Citation Reports® 2011

Aims & Scope

As an official publication of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Medical Mycology, is an international journal, which focuses on original and innovative studies of all aspects of medical, veterinary and environmental mycology. The topics include, but are not limited to, mycological, biochemical and molecular investigations of etiological agents of mycoses; aspects of pathogenesis, immunology, and epidemiology of mycoses; laboratory approaches to the identification of fungal pathogens; antifungal susceptibility, therapy and prophylaxis; mode of antifungal action; pharmacokinetics and assessments of new antifungal agents; and investigations of the mycological aspects of the indoor environment, with a focus on human and animal health. The aim of the journal is to present the preeminent scientific reports on these aspects of mycology to provide a comprehensive reference base for medical mycologists, microbiologists, clinicians, and environmental specialists.

Abstracting & Indexing

Medical Mycology is covered by BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, Current Contents,

Instructions for Authors

The official publication of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Medical Mycology, is an international journal, which focuses on original and innovative studies of all aspects of medical, veterinary and environmental mycology. The topics include, but are not limited to mycological, biochemical and molecular investigations of etiological agents of mycoses; aspects of pathogenesis,

immunology, and epidemiology of mycotic diseases; case reports of unusual medical or veterinary fungal infections; laboratory approaches to the identification of fungal pathogens, antifungal therapy and prophylaxis; mode of action, pharmacokinetics and assessments of new antifungal agents; investigations of the mycological aspects of the indoor environment, with a focus on human and animal health. The aim of the journal is to present the best scientific reports from around the world and in so doing to provide a comprehensive reference base for medical mycologists, microbiologists, clinicians, and environmental specialists.

Types of Papers Considered for Publication

Types of Papers

1.1 Original Papers. Manuscripts must have: (a) a Cover-Page that includes the full title and a short title, name(s) and affiliation(s) of all author(s), the name, telephone/fax numbers and email address of the designated corresponding author, and a list of up to five keywords; (b) a separate page for a Summary or Abstract of up to 250 words prepared without sub headers; (c) text consisting of Introduction, Materials and methods, Results, Discussion and References; (d) References must be numbered sequentially in the order in which they first appear in the text, the numbers cited in the text within non-superscript, square brackets, e.g., [1] and included in the same numerical order in the Reference section; (e) each Table should be submitted as a separate page and should have footnoted descriptions of all abbreviations contained in the Table (see section below on Tables for more detailed information); (f) each Figure should be submitted as a separate file (page), with appropriate figure legends allowing a reader to understand their contents without reference to the text (see section below on Figures for more detailed information). Manuscripts **MUST** be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, without line numbering and up to approximately 30 manuscript pages (10-12 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.

1.2 Reviews. Authors must first electronically submit an outline of their proposed article for evaluation by the journal. The outline should be no more than two, double-spaced pages in 12 point, in which the authors describe the objectives and contents of the report. The outline must be submitted to the Reviews Editor, Wiley Schell: wiley.schell@duke.edu. Once the proposal has been evaluated, the authors will be informed of the results of the Review Editor's initial consideration of their proposal. Reviews are NOT restricted by the formatting or length requirements of Original Papers.

1.3 Case Reports. Such articles should be submitted to Medical Mycology Case Reports via www.ees.elsevier.com/mmcr from which all information pertaining to this on-line, open access ISHAM journal may be obtained.

1.4 Short Communications. These manuscripts are to provide an opportunity for the presentation of preliminary or brief observations that do not warrant an original paper. The manuscript should be prepared as an original paper, except they may be no more than 12–15 manuscript pages (approximately 5–7 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.

1.5 Letters to the Editor. Letters are to allow readers the opportunity to discuss issues related to previously published original articles, short communications, and reviews in *Medical Mycology*. Letters are NOT to be used for the presentation of the authors' preliminary data from their own investigations. Letters should be no more than 5 double-spaced manuscript pages including references (approximately 2 print pages), in no less than size 12 point.

2. Submission of Manuscripts

All submissions MUST be uploaded as Word files to the Medical Mycology ScholarOne Manuscript site at mc.manuscriptcentral.com/tmmy. Users who have not previously submitted work through this site must create an account from the link on the login page. Assistance with this and all other areas of the site is available in the User Guide, which is accessed via the 'Get Help Now' button at the top right corner of all ScholarOne Manuscript web pages.

Manuscript Structure

Preparation of Manuscripts

Manuscripts MUST be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, organized as appropriate for the manuscript type and have one inch margins all around. Statistics and measurements should be given in numerals when followed by a unit, e.g., mg, ml, etc. In contrast, numerals employed in other circumstance, e.g., two patients, should be spelled out if less than ten (10). ALL abbreviations, even those commonly used in medical mycology, e.g., Sabouraud glucose agar (SGA), must be defined when first used in the abstract and text. Please NOTE that the inability of authors to clearly present the contents of their submissions in English may constitute grounds for the immediate rejection of the papers or their return to authors so that they can correct their English usage prior to assignment to an associate editor.

For authors who require professional assistance with English usage, there are companies that will provide assistance for a fee. A list of these companies and contact information may be obtained from the Editor-in-Chief.

2. References

In preparing your citations please note that software programs available to format references MAY OR MAY NOT contain a format style option for *Medical Mycology* or for the use of the Vancouver system. Consequently, such programs should be used cautiously and should be carefully reviewed by the authors to ensure that citations

meet the style/format requirements of the journal. References must be numbered sequentially in the order in which they first appear in the text, the numbers cited in the text within square brackets, i.e., [1], at the end of the sentences in which they appear, before the punctuation. They should be included in the same numerical order in the Reference section. Citation numbers **MUST NOT** be indicated in superscript. Articles with six or more authors are to be cited by the names of the first three authors, with the remaining authors replaced by et al. Journal names must be abbreviated, without the use of periods, in italic font. The volume number must be in bold font, issue numbers are not to be included and all page numbers must appear for each citation (e.g. 105-107, NOT 105-7).

2.1 Journal article

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if six or more] Title of paper. J Title Abbrev 1995; 00: 000–000. If the title is in a language other than English, the authors should provide the English translation. The name of the original language should be included within a bracket, e.g., [in Spanish], after pagination at the end of the citation.

2.2 Book chapter

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if six or more] Chapter title. In: Editor AB, Editor CD, eds. Book Title With Initial Uppercase Letters (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995: 000–000.

2.3 Book

Author AB, Author CD (eds). Book Title With Initial Uppercase Letters (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995.

2.4 Thesis

Author AB. Paper title with lowercase initials to all words, except the first word. PhD thesis, University of X, 1995.

2.5 Conference proceedings/Supplements

Author AB. Paper title. In: Editor AB, ed. Proceedings Title, place, date. Place: publisher, 1995: 000–000.

102

2.6. Meeting abstracts Abstracts of works presented at scientific meetings should be cited in brackets within the text of the manuscripts rather than in the Reference sections. The citations should be formatted as: Author AB. Abstract title. Name of meeting, its location, the date and abstract number.

2.7 Personal communications, Unpublished results etc.

References to personal communications, unpublished results and papers submitted for publication (but not yet accepted) should only appear in brackets in the text, and in the following form: [A. B. Author, unpublished results] or [C. D. Author, personal communication].

2.8 Journal article on the Internet Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>>

2.9 Monograph on the Internet Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: ¹⁰³<<http://www.nap.edu/books/0309074029/html>>

2.10 Homepage/Web site Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [site updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org>

2.11 Part of a homepage/Web site American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995–2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736>>

2.12 Database on the Internet Open database: Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. C2000-[cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>_<http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database: Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). C1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html>

2.13 Part of a database on the Internet MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002-[cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about

3 p.]. Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser_/www.www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser>

Files updated weekly.

3. Tables

Tables should present only essential data, must be numbered sequentially in the order in which they are first referenced in the text, and all MUST be referred to in the text. Each table should be supplied as a separate file (page) and not imbedded within the body of the text. The table header should be brief and self explanatory. If it contains generic and species names, these must be spelled out in full, e.g., *Candida albicans*, not *C. albicans*. Column headings should be brief and include units in parentheses where applicable. Only horizontal rule lines should be used and then only for headers and footers. Tables should be considered as ‘stand alone’ documents through which data are summarized for presentation to readers. As such, all abbreviations employed in the tables MUST be defined by footnotes included directly below the tables.

4. Figures/Images

Images should be submitted as TIF, EPS, PDF or JPG (preferred) files. Scanned images should be of a sufficient resolution, i.e., 300 dpi for halftones/color, 500 dpi for combination halftones and 1000–1200 dpi for line art. Illustrations should be submitted as individual files, separate from the manuscript text file. The journal has a limited number of free color pages within its annual page allowance provided by the publisher. Therefore, authors may be required to pay USD 1150 for color reproduction in the print version of the journal. However, any figure submitted as a color original may appear in color in the journal’s on-line edition, without any charges being assessed to the authors. NO part of any image may be enhanced, removed, relocated, introduced or manipulated in any manner after the capture of the original image unless the authors provide the editor with a clear and accurate description of the nature of the image manipulation.

Figures, like Tables, should be considered as ‘stand alone’ components of the manuscript. As such, authors should provide legends at the end of the text, following the Reference section, which clearly describe the significant features of the illustrated objects. In addition, authors may employ, as warranted, arrows or similar indicators in the figures to assist readers.

5. Supplementary Files

Supplementary information, including extensive data sets, large figures, audio and DVD/video material, can be made available as part of the on-line version of your manuscript. Please do not include supplementary information within the main manuscript file, but upload the material as separate file(s), 104 ndeavo as

‘Supplemental Digital Content’. Please include a sequential number (S1, S2 etc) for each file and a brief description of the content at the appropriate position in the text and a list of the files at the end of the discussion. Please note that supplementary files are not copy-edited and will be presented as submitted.

6.Nomenclature

Proposals of new fungal taxa MUST conform to the requirements outlined in the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants. Some of the provisions are effective as of January 1, 2012, while others will subsequently become effective. The proposed taxon must be supported by deposition of cultures and/or the unique nucleotide and/or amino acid sequences in appropriate collections or databases, along with the new binomial. The identifier assigned to the taxon by these recognized repositories, e.g., Mycobank, must be included in the text, tables and figures. In addition, binomials should appear in italics, must be spelled out in full when first used in the abstract, text, figures/tables. Thereafter, a generic name may be abbreviated to the first initial only, e.g., *Candida albicans* when first cited and *C. albicans* in the remainder of the abstract and text, except at the beginning of a sentence where the genus should be spelled out in entirety. Species names may NEVER be used without the generic full name or abbreviation combined with the full name of the species. For example, it must be *Candida albicans* or *C. albicans*, but never *albicans*, or *C. neoformans* var. *grubii* but never var. *grubii*. The use of abbreviations of generic and species names, e.g., (Ca) for *C. albicans*, in the text is NOT permitted.

7. Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Data

Nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited in a freely accessible database. The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers should be included in the Materials and Methods Section of the manuscript. However, in a figure of a phylogenetic tree, the numbers should be shown along with species names (e.g., *Malassezia globosa* AB099880) (No descriptions are needed in the Materials and Methods Section in this case).

Required Statements

1.Humans in Research

When reporting investigations involving human subjects, authors must indicate in the manuscript if the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation within their institutions and/or with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

2. Animals in Research

Manuscripts containing information related to the experimental use of animals must clearly state that the studies complied with relevant professional and institutional animal welfare policies. Specifically, that procedures involving animals conformed to the ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011 or later editions) of the Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council (www.nap.edu/catalog/5140.html).

3. Authorship Contributions

Please note that in submitting this manuscript you and your co-authors are confirming that all authors have, in accord with the Committee on Publication Ethics guidelines, (a) made a substantial contribution to the conception and design, acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data, (b) participated in the drafting of the article or revising it critically for important intellectual content, (c) have read and approved the final manuscript, AND (d) that the manuscript is not, either in whole or in part, currently under consideration by any other scientific journal and has not been previously published in either hard copy or electronic format. Except for those submitting the manuscript, members of Study Groups should not be individually cited as authors.

Submissions with ten or more authors will ONLY be considered if the corresponding authors provide, in their cover letters, descriptions of each of the author's contributions. Manuscripts drafted or written, in whole or part, by individuals other than those indicated as authors will NOT be considered for publication unless the contributions of these individuals are clearly and accurately presented in the Acknowledgment section of the paper.

4. Acknowledgements

The work of other individuals who assisted in the studies or in the preparation of the submission must be specifically indicated in the Acknowledgment section of the paper.

5. Disclosures of Potential Conflicts of Interest

Although there is no standard definition of Conflict of Interest, the United States National Institutes of Health has published the following statement:

It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership) that may be perceived as potentially affecting the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure (i.e., when in doubt, provide full disclosure).

In addition, a conflict of interest may be perceived to exist in such situations as when authors are affiliated with or employed by a private enterprise whose product or competitor's product, e.g., drug, device or diagnostic kit, is the focal point of the paper.

Information about potential conflict of interest must be clearly stated at the point of submission. This may be made available to reviewers and may be published with the manuscript at the discretion of the Editors and Publisher. The journal recommends that you and your co-authors include the sub header, 'Conflict of Interest', in the Acknowledgment section at the end of your manuscript. If no such conflict exists, simply respond 'None'. If you or your co-authors have received funding that meets the criteria described in the paragraph above, the source(s) of the funds must be declared (NOTE – you are NOT required to disclose the amounts of funding that you or your co-authors have received). Furthermore, authors must indicate their employment if describing their or other companies' products.

The intent of this policy is not to prevent authors with these relationships from publishing work, but rather to adopt transparency such that readers can make objective judgments on conclusions drawn.

Post Acceptance Information

1. Electronic Proofs

When proofs are ready, corresponding authors will receive e-mail notification with a password and Web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will NOT be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned, within 48 hours of receipt.

2. Offprints

Corresponding authors will receive an email with information on how to, at no expense, download a PDF of the final published version of the paper. Additionally, authors are also able to order fifty complimentary offprints.

3. Copyright

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights of their articles, including abstracts, to ISHAM. However, special provisions are made for government employees who are not allowed to assign copyright for work conducted as part of their official functions. The second page of the copyright release form clearly describes these provisions. In all other instances, the release of copyright to the society allows it to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after

publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgment is given to the journal as the original source of publication, and that Informa Healthcare is notified so that records show that its use was properly authorized. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. Rights policies documents.

4. NIH Public Access Policy

In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Trust Public Access Policies, Informa Healthcare acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research benefits future scientific endeavor. Because we value the contribution our journals make to the body of scientific knowledge, our policies accommodate authors who wish to submit to PubMed Central/UK PubMed Central.

1. Informa Healthcare will deposit funded work to PubMed Central/UK PubMed Central for public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in electronic form.
2. 'Funded work' shall be defined as the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review.
3. This embargo period begins upon final publication of the article in print or electronic form (whichever is sooner)

Anexo C

Confirmação da Submissão do Artigo

Page 1 of 16

Medical Mycology

Short title: DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE PENGUINS

SEROLOGICAL MONITORING OF ANTIBODIES TO AN EARLY DIAGNOSIS
OF ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE PENGUINS

Ângela Leitzke Cabana^{1*}, Melissa Orzechowski Xavier², Vanice Poester², Andreia
Corrado Adomes¹, Pedro Luis Bruno-Filho¹, Paula Carabarro¹, Aryse Martins¹,
Rodolfo Pinho da Silva-Filho¹, and Mário Carlos Araújo Meireles¹.

¹Myiology Laboratory/ Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas
(UFPel), ²Myiology Laboratory / Faculty of Medicine, Federal University of Rio
Grande (FURG), ³Center for Recovery of Marine Animals of the Federal University of
Rio Grande (CRAM/FURG), Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Ângela Leitzke Cabana

Address: Rua Alcides Maya, 152, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 96040-220.

Phone: (+55) 53-32757140/ 91013067/84364983

Email: cabarangela@gmail.com or arjinka_kbana@hotmail.com

Key words: *Sphenisciformes*; captivity; *Aspergillus* spp.; antibody; immunodiffusion.

02/02/13

ScholarOne Manuscripts

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#)

Medical Mycology

informa healthcare

SCHOLARONE Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Angela Cabana

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Medical Mycology*.

Manuscript ID: TMMY-0031-2013

Title: SEROLOGICAL MONITORING OF ANTIBODIES TO AN EARLY DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE PENGUINS

Authors: Cabana, Angela
Xavier, Melissa
Poester, Vanice
Adornes, Andrea
Bruno-Filho, Pedro Luis
Canabarro, Paula
Martins, Aryse
Silva-Filho, Rodolfo

Date Submitted: 02-Feb-2013

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.11.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

mc.manuscriptcentral.com/tmmy

1/1