UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
TESE DE DOUTORADO

ANDRÉIA SPANAMBERG DORNELES

Aspergilose em frango de corte: diagnóstico, identificação e caracterização da diversidade genética de *Aspergillus fumigatus*

PORTO ALEGRE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
TESE DE DOUTORADO

ANDRÉIA SPANAMBERG DORNELES

Aspergilose em frango de corte: diagnóstico, identificação e caracterização da diversidade genética de *Aspergillus fumigatus*

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Subárea: Microbiologia
Especialidade: Micologia
Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

PORTO ALEGRE
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Spanamberg Dorneles, Andréia
Aspergilose em frango de corte: diagnóstico, identificação e caracterização da diversidade genética de Aspergillus fumigatus / Andréia Spanamberg Dorneles. -- 2014.
32 f.

Orientador: Laerte Ferreiro.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Aspergillus fumigatus. 2. aerossaculite. 3. frangos. 4. aspergilose. I. Ferreiro, Laerte, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

_____

Dr. Sandro Antonio Pereira (FIOCRUZ)

_____

Dr. David Driemeier (UFRGS)

_____

Dr. Flávio Mattos de Oliveira (IPD)

AGRADECIMENTOS

- À minha família, especialmente minha mãe Aracy Maria Spanamberg e meu marido Daniel Real;

- Ao meu orientador Laerte Ferreiro: obrigada por tudo! pela disposição, orientação, paciência, amizade e constante motivação. Obrigada por ter me aberto portas desde 2006...e por ter me ensinado que "viajar" é preciso... buscar novos horizontes...para a vida pessoal e acadêmica.

- Aos professores David Driemeier, Luiz Gustavo Corbellini, Jacques Guillot, Jean Phillipe Bouchara, Gerard Larcher e Ricardo Araujo por terem dividido comigo seus conhecimentos e por terem aberto seus laboratórios, sem os quais esse trabalho não existiria.

- Aos professores Cláudio Canal, Ana Paula Ravazzolo, José Luiz Rodrigues, Sérgio Ceroni pela cooperação;

- Aos meus colegas Renata de Assis Casagrande e Gustavo Machado pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela amizade;

- À Edna Maria Cavallini Sanches, amiga de todas as horas, para todos os assuntos;

- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Veterinária por oportunizar a realização deste trabalho;

- Ao IPATIMUP (Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto) por ter me recebido de braços abertos para a realização de uma etapa fundamental do trabalho;

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CnpQ) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

Aspergilose é uma das principais causas de mortalidade em aves imunocompetentes e imunodeprimidas. A manifestação clínica aguda da doença é geralmente observada em aves jovens, com episódios de surtos em aviários, enquanto a forma crônica é mais frequentemente observada em aves adultas. A inspeção das carcaças é fundamental para a detecção e monitoramento da prevalência de doenças. Os objetivos do trabalho foram avaliar a ocorrência de aspergilose causada por *Aspergillus fumigatus* em aves comerciais através do diagnóstico micológico e histopatológico e verificar a possibilidade de associação causal entre os critérios de diagnóstico de aspergilose e condenação por aerossaculite em frangos de corte através de um estudo de caso-controle. O estudo foi realizado com 380 amostras pulmonares. Foram coletados pulmões de frangos condenados (95) por aerossaculite e não condenados (285), diretamente na linha de abate de um frigorífico. Quarenta e seis (12%) amostras de pulmão foram positivas na cultura micológica. Do total de amostras, 177 (46,6%) apresentaram alterações histopatológicas, sendo as mais frequentes pneumonia fibrinoheterofílica necrótica, pneumonia heterofílica e hiperplasia linfóide. Do total de 380 pulmões analisados, 30 (65,2%) apresentaram concomitantemente alterações histopatológicas e isolamento fúngico. A relação entre a presença de lesões histopatológicas e isolamento de *A. fumigatus* testada por McNemar indicou que houve associação significativa entre a presença de alterações histopatológicas e o isolamento de *A. fumigatus.* A identificação molecular foi realizada em 44 isolados, sendo todos confirmados como sendo *A. fumigatus* através dos genes β-tub e rodA. O cultivo micológico e o exame histopatológico aumentam as chances de se detectar alterações pulmonares em aves condenadas pelo Sistema de Inspeção Final do que nas aves normais, sugerindo que tais critérios de diagnóstico são eficazes para aprimorar a avaliação e condenação de aves por aerossaculite. O perfil genético entre os isolados foi variado, mostrando que isolados de aves normais podem ser potencialmente causadores de aspergilose em aves suceptíveis.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, aerossaculite, frangos, aspergilose.

ABSTRACT

Aspergillosis is one of the main causes of mortality in both immunocompetent and immunodepressed birds. The clinical manifestation of acute aspergillosis is usually observed in young birds, often with episodes of outbreaks in poultry farms, whereas chronic aspergillosis is more frequently observed in adult birds. The inspection of carcasses is fundamental for the detection of diseases and for monitoring their prevalence. The objectives of this study were to evaluate the occurrence of aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* in poultry through mycological and histopathological diagnosis and to verify the possibility of a causal association between the criteria for aspergillosis diagnosis and carcass condemnation due to airsacculitis in broilers through a case-control study. The study was made with 380 lung samples. Lungs were collected from condemned (95) and not condemned (285) broilers due to airsacculitis, directly from the slaughter line of a slaughterhouse. Forty-six (12%) lung samples were positives in mycological culture. From the total samples, 177 (46.6%) showed histopathological alterations, the most frequent being necrotic, fibrinous, heterophilic pneumonia, heterophilic pneumonia and lymphoid hyperplasia. Of the 380 lungs analyzed, 30 (65.2%) showed histopathological alterations and isolation of fungi. The relation between the presence of histopathological lesions and the isolation of *A. fumigatus,* as observed with the McNemar test, indicated the significant association between the presence of histopathological alterations and the isolation of *A. fumigatus.*The molecular identification was made in 44 isolates, and all of them were confirmed to be *A. fumigatus* through analysis of the β-tub and rodA. The mycological cultivation and the histopathological test increase the chances of detecting pulmonary alterations in birds condemned by the Final Inspection System than in normal birds, suggesting that such diagnostic criteria are efficient to improve the assessment and condemnation of birds affected by airsacculitis. There were different genetic profiles among the isolates, which shows that isolates obtained from normal birds can potentially cause aspergillosis in those susceptible.

Keywords: *Aspergillus fumigatus,* airsacculitis, poultry, aspergillosis.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

FIGURA 1- Hyaline, branching septate hyphae of *Aspergillus fumigatus*. Grocott staining, obj.20x.....19

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1- Results of mycological culture for *Aspergillus fumigatus*.....19

TABELA 2- Frequency of histopathological alterations (HE staining) in lung 19

TABELA 3- Histopathological results (HE staining) and *Aspergillus fumigatus* isolation.....19

TABELA 4- Multivariate logistic regression analysis between mycological cultures and histopathology results.....19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 11
OBJETIVOS..... 12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 13
2.1 Generalidades sobre aspergilose..... 13
2.2 Condições predisponentes nas aves..... 13
2.3 Aspergilose em aves..... 14
2.4 Diagnóstico laboratorial de aspergilose..... 15
2.5 Identificação e diversidade genética de isolados de *Aspergillus* spp..... 16
CAPÍTULO 1..... 18
ARTIGO 1..... 19
3 DISCUSSÃO..... 25
4 CONCLUSÕES..... 28
REFERÊNCIAS 29

1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Aspergillus* estão amplamente distribuídas entre os fungos filamentosos sapróbicos, sendo encontradas no solo, materiais orgânicos, água, ambientes internos e em muitos outros locais (AL-ALAWI *et al*., 2005, ZMEILI & SOUBANI, 2007). Embora o gênero contenha mais de 250 espécies (KRENKE & GRABCZAK, 2011), somente um número limitado delas tem sido implicado em infecções oportunistas de animais e humanos.

Apesar de não totalmente compreendido, o clima e as condições geográficas do ambiente local são fatores muito importantes na prevalência e distribuição de *Aspergillus* spp. no ar (CHARLTON *et al*., 2008; PASQUALOTTO, 2009). Outro aspecto importante refere-se ao tamanho dos conídios (propágulos assexuais) dispersos no ambiente. Eles variam de 2 a 6 mm, sendo o menor encontrado na espécie *A. fumigatus,* a mais frequentemente isolada de casos de aspergilose pulmonar (RECCO & LINAS, 1994).

Na medicina humana, infecções causadas por *Aspergillus* spp. têm crescido em importância na última década. Essa situação provavelmente ocorre em decorrência de um maior número de pacientes em risco, incluindo receptores de orgãos transplantados, indivíduos neutropênicos, alérgicos e aqueles tratados com corticosteróides ou com outros imunossupressores (PASQUALOTTO, 2009).

Aspergilose, causada principalmente por *A. fumigatus*, é a micose mais comum das aves, sendo uma doença respiratória economicamente importante nas criações (CHARLTON *et al*., 2008). A doença ocorre em uma grande variedade de espécies, sendo estas consideradas como potenciais hospedeiros suscetíveis à infecção por *Aspergillus* (TELL, 2005; CHARLTON *et al*., 2008). As manifestações da doença dependem dos órgãos ou sistemas envolvidos, porém frequentemente acomete o sistema pulmonar, com lesões nos sacos aéreos e pulmões (CHARLTON *et al*., 2008).

Seja na medicina humana ou na veterinária, apesar de um melhor entendimento da epidemiologia da infecção por *Aspergillus*, ainda persistem importantes limitações no diagnóstico (STEVENS, 2002; FERNS, 2006). Diversos trabalhos abordam a doença tanto em aves silvestres como em aves de criação (ISLAN *et al*., 2003; MUKARATIRWA, 2006; MARTIN *et al*., 2007; ZIÓLKOWSKA & TOKARZEWSKI, 2007). No Brasil, algumas pesquisas são realizadas visando o diagnóstico de aspergilose em aves recém eclodidas (LIMA *et al*., 2001; TESSARI *et al*., 2004; VILELA *et al*.,

2004), como parte de monitoramento sanitário dos incubatórios, porém pouco se sabe sobre a real situação e impacto econômico nas criações comerciais, tampouco quais características das espécies envolvidas.

OBJETIVOS

Geral

Diagnosticar aspergilose em aves comerciais, identificar e avaliar a diversidade genética de *Aspergillus fumigatus*.

Específicos

a) Diagnosticar aspergilose pulmonar em frango de corte.

b) Verificar da associação causal entre os critérios de diagnóstico de aspergilose e condenação por aerossaculite em frangos de corte através de um estudo de caso-controle.

c) Identificar as espécies de *Aspergillus* seção *Fumigati* isoladas de pulmão de frango de corte.

d) Avaliar a diversidade genética de *Aspergillus* seção *Fumigati* isolados de amostras pulmonares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades sobre Aspergilose

Espécies de *Aspergillus* produzem uma grande quantidade de conídios que podem se difundir para todo o meio ambiente. São ubíquos e como fungos saprotróficos ou comensais, coexistem sem causar efeito nocivo e raramente tornam-se patogênicos em indivíduos saudáveis (LATGÉ, 1999; SHIN *et al*., 2004).

O mecanismo de liberação dos conídios no ambiente ocorre através de fortes correntes aéreas. No caso do *A. fumigatus*, devido ao pequeníssimo tamanho dos conídios (entre 2 a 3,5 μm), os mesmos alcançam facilmente os alvéolos pulmonares. Estudos ambientais indicam que diariamente todos os seres humanos inalam centenas de conídios de *A. fumigatus* (LATGÉ, 1999; PASQUALOTTO, 2009).

Para a maioria dos hospedeiros, a principal porta de entrada e sítio de infecção por *A. fumigatu*s é o trato respiratório, com consequente colonização das vias aéreas superiores. Posteriormente, os propágulos podem progredir até as vias aéreas inferiores, instalando-se ao nível de alvéolos e promovendo o desenvolvimento de um foco infeccioso pulmonar (PASQUALOTTO, 2009). Mamíferos imunocompetentes, ao contrário de aves, raramente desenvolvem um quadro de aspergilose pulmonar, a menos que estejam expostos a uma imensa dose infectante de conídios (CHARLTON *et al*., 2008).

2.2 Condições predisponentes em aves

Em contraste com os mamíferos, as aves são particularmente sensíveis às infecções causadas por espécies do gênero *Aspergillus*, especialmente por *A. fumigatus* e *A. flavus* (TELL, 2005).

A onipresença dos organismos sugere que as aves possam ser portadoras dos fungos, embora não desenvolvam a doença, a menos que ocorra uma diminuição da resistência imunológica associada a algum estresse, como uma doença infecciosa, uma substância tóxica e/ou desnutrição (GARCIA *et al*., 2007). Outros fatores, tais como condições ambientais desfavoráveis (ventilação reduzida, umidade e calor elevados), estresse da criação ou de habitat, esforço físico (no caso das aves migratórias) e administração de corticosteróides exógenos favorecem a ocorrência da doença.

O estresse parece ser um fator adicional no desenvolvimento de infecções fúngicas. Esse fator pode ser associado com o cativeiro, manejo inadequado, tratamento prolongado com antimicrobianos ou outras condições debilitantes. Também pode estar associado a um estado fisiológico ruim, o qual pode ser agravado em determinados momentos do ano, como durante a época de inverno/verão, quando as condições ambientais são extremas (REDIG *et al*, 1980; CORK *et al*., 1999).

Características anatômicas das aves também contribuem para a enfermidade, tais como presença de sacos aéreos; falta de uma epiglote para impedir a entrada de partículas no trato respiratório inferior; falta de um diafragma que resulta na incapacidade de produzir um forte reflexo tosse e uma distribuição limitada de epitélio ciliado pseudoestratificado através do trato respiratório (TELL, 2005).

A ocorrência de aspergilose parece ser mais significativa em situações de confinamento, onde o estresse associado à condições indesejáveis, como ração e cama do aviário contaminados por uma grande quantidade de fungos (CHARLTON *et al*., 2008). A adequada ventilação reduz a formação excessiva de poeira nas instalações avícolas, fator que ocasiona um decréscimo no desencadeamento de doenças fúngicas. A diminuição da contaminação fúngica na ração, água e no ambiente, juntamente com o manejo adequado do lixo contribuem para uma menor ocorrência da aspergilose (CHARLTON *et al*., 2008).

2.3 Aspergilose em aves

A aspergilose é uma infecção fúngica reconhecida como doença aviária desde 1815, envolvendo frequentemente o trato respiratório (ALL-DORRY & WAGNER, 1985).

A forma pulmonar da doença ocorre em uma ampla variedade das espécies de aves, caracterizando-as como potenciais hospedeiros suscetíveis à infecção por *Aspergillus* spp. . Casos de aspergilose já foram relatados em frangos, perus, avestruzes, ema, pinguins e gansos; assim como em outras diversas espécies (CARRASCO *et al*., 2001; LAIR-FULLERINGER *et al*., 2003; PAIXÃO *et al*., 2004; COPETTI *et al*., 2004; XAVIER *et al*., 2006; ZIÓLKOWSKA & TOKARZEWSKI, 2007; CRAY *et al*., 2009; ISLAN 2009; SPANAMBERG *et al*. 2012).

A aspergilose é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em aves, imunocompetentes e imunodeprimidas. A enfermidade ocorre nas formas aguda e

crônica. A primeira acomete geralmente aves jovens, sendo observada sob forma de surtos nas criações, e a segunda ocorre mais frequentemente em aves adultas (TELL, 2005; CHARLTON *et al*., 2008).

Os sinais clínicos são geralmente não-específicos (letargia, inapetência e anorexia) ou podem estar relacionados com alterações do trato respiratório (rinite, mudança de vocalizações, dispnéia) (TELL, 2005). As formas da doença relatadas até agora em aves incluem aspergiloma focal e/ou multifocal além de infecções disseminadas. Tipicamente os pulmões e sacos aéreos são afetados, com formação de nódulos caseosos ou placas, e granulomas com áreas necróticas (TELL, 2005).

Em relação a cadeia produtiva de frango de corte, o monitoramento relativo à aspergilose ocorre através da avaliação sanitária dos incubatórios, a partir de amostras pulmonares e do ambiente (ANDREATTI-FILHO, 2000; TESSARI *et al*., 2004). Em trabalho realizado por Tessari *et al*. (2004), análises micológicas dos fragmentos dos pulmões de 66 lotes de pintos de um dia de idade, mostraram que 22 lotes (33,33%) estavam contaminados com fungos da espécie *Aspergillus* spp. Em relação ao ambiente, *A. fumigatus* correspondeu a 66,88% dos isolados (CARDOSO *et al*., 2009).

O prejuízo financeiro causado pela aspergilose é mais evidente na produção de perus na fase de engorda. A ocorrência na forma crônica não é alta, mas em criações de aves comerciais, existem elevadas perdas econômicas quando as aves adultas são acometidas (CHARLTON *et al*., 2008).

Prevenção é, atualmente, o meio preferencial de controle que ocorre através do monitoramento do incubatório. Outras medidas também são fundamentais, tais como limpeza, desinfecção dos utensílios e dos equipamentos usados nas criações para evitar o acúmulo de matéria orgânica e lixo.

2.4 Diagnóstico Laboratorial da Aspergilose

O diagnóstico laboratorial é realizado através da cultura (isolamento de *Aspergillus* spp. de secreções respiratórias, fragmentos de tecido, sangue e outros fluídos corpóreos), da citologia, da histopatologia pelas colorações de hematoxilina e eosina (HE) e Grocott (procura de hifa hialina septada, ramificada em ângulo de 45°) e da imuno-histoquímica (uso de anticorpo mono ou policlonal). Além disso, o teste sorológico de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e a detecção de galactomanana (polissacarídeo da parede do *Aspergillus* spp.) contribuem como marcador para

diagnóstico na ausência da cultura. A utilização de PCR (reação em cadeia da polimerase) é promissora, mas ainda está sem padronização. Cabe ressaltar que a interpretação dos achados laboratoriais deve estar correlacionada com a história clínica-epidemiológica do paciente. (STEVENS, 2002).

Na medicina veterinária o diagnóstico laboratorial é feito rotineiramente através do exame microscópico direto do espécime clínico, cultura micológica (Ágar Sabouraud glicose 2% acrescido de cloranfenicol) e histopatologia (coloração de Grocott / HE).

A presença do agente fúngico nos tecidos é fundamental para definir o diagnóstico de micoses oportunistas, pois confirma que o fungo isolado no cultivo não corresponde a uma eventual contaminação. A associação da cultura fúngica e da histopatologia é geralmente considerada o padrão de referência para o diagnóstico das micoses, como a aspergilose, mucormicoses, hialo-hifomicoses e feo-hifomicoses (STEVENS, 2002).

2.5 Identificação e diversidade genética de isolados de *Aspergillus* spp.

Atualmente, a identificação e a classificação de *Aspergillus* baseiam-se, principalmente, nas características morfológicas e nos perfis bioquímico e molecular. Técnicas moleculares apresentam grande potencial para estudos de identificação e diversidade de microrganismos, contribuindo para um melhor esclarecimento sobre os agentes envolvidos nas doenças.

Erros de identificação de espécies fúngicas dentro da seção *Fumigati* têm sido cada vez mais relatado por laboratórios clínicos, quando utilizada a metodologia convencional de classificação. Espécies como *Aspergillus lentulus, A. viridinutans, A. fumigatiaffinis, A. fumisynnematus, Neosartorya pseudofischeri, N. hiratsukae* e *N. udagawae,* pertencentes à Seção *Fumigati*, são frequentemente relatados como *A. fumigatus* (BALAJEE *et al*., 2005; BALAJEE *et al*., 2006; HONG *et al*., 2008) .

Aspergillus lentulus, *A. viridinutans*, *Neosartorya pseudofischeri* e *N. Udagawae* têm sido descritos como patógenos humanos, particularmente. Além disso, muitas espécies apresentam resistência *in vitro* aos antifúngicos itraconazol, miconazol, posaconazol, ravuconazol e/ou voriconazol (ALCAZAR-FUOLI *et al*., 2008). Por esse motivo, a identificação molecular é atualmente recomendada para a correta identificação dentro do "complexo *A. fumigatus*".

O sequenciamento de genes, como actina, calmodulina, ITS, rodlet A (rodA) e/ou β-tubulin (βtub), tem sido utilizado para distinguir *A. fumigatus* de outras espécies da Seção *Fumigati* (SAMSON et al. 2007; BALAJEE *et al*., 2007) .

Estudos de variabilidade genética ajudam a discriminar isolados de *A. fumigatus* clínicos e ambientais. Técnicas de tipagem molecular já foram descritas e avaliadas para isolados oriundos de humanos (VANHEE *et a*l., 2008; VANHEE *et al*., 2010) e de aves (LAIR-FULLERINGER *et al*., 2003; THIERRY et al., 2010). Todos os métodos desenvolvidos podem ser usados para estudos de epidemiologia molecular de *A. fumigatus* em diferentes situações, incluindo granjas avícolas e hospitais onde surtos de aspergilose invasiva pode ocorrer (THIERRY et al., 2010; ARAUJO et al., 2012).

CAPÍTULO 1

Aspergillus fumigatus FROM NORMAL AND CONDEMNED CARCASSES WITH AIRSACCULITIS IN COMMERCIAL POULTRY

ARTIGO 1

Aspergillus fumigatus from normal and condemned carcasses with airsacculitis in commercial poultry

Artigo publicado na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Pesq. Vet. Bras. 33(9):1071-1075, setembro 2013

Aspergillus fumigatus from normal and condemned carcasses with airsacculitis in commercial poultry[1]

Andréia Spanamberg[2,3*], Gustavo Machado[4,3], Renata Assis Casagrande[5,3], Gabriela Miller Sales[2], Cibele Floriano Fraga[2], Luís Gustavo Corbellini[4], David Driemeier[5] and Laerte Ferreiro[2]

ABSTRACT.- Spanamberg A., Machado G., Casagrande R.A., Sales G.M., Fraga C.F., Corbellini L.G., Driemeier D. & Ferreiro L. 2013. ***Aspergillus fumigatus* from normal and condemned carcasses with airsacculitis in commercial poultry**. *Pesquisa Veterinária Brasileira 33(9):1071-1075.* Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: andreiaspanamberg@yahoo.com.br

Carcass inspection is important for the detection of certain diseases and for monitoring their prevalence in slaughterhouses. The objective of this study was to assess the occurrence of aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* in commercial poultry, through mycological and histopathological diagnosis, and to verify the causal association between the aspergillosis diagnosis criteria and condemnation due to airsacculitis in broilers through a case-control study. The study was carried out with 380 samples. Lungs were collected from broilers that were condemned (95) or not condemned (285) due to airsacculitis directly from the slaughter line. Forty-six (12%) lung samples were positive for *A. fumigatus* in mycological culture. Among all samples, 177 (46.6%) presented histopathological alterations, with necrotic, fibrinous, heterophilic pneumonia; heterophilic pneumonia and lymphoid hyperplasia being the most frequent. Out of the 380 lungs analyzed, 65.2% (30) showed histopathological alterations and isolation of fungi. The statistical analysis (McNemar's chi-square test) indicated a significant association between the presence of histopathological lesions and the isolation of *A. fumigatus.* Mycological cultivation and histopathological diagnosis increase the probability of detecting pulmonary alterations in birds condemned by the Final Inspection System, which suggests that such diagnostic criteria can improve the assessment and condemnation of birds affected by airsacculitis.

INDEX TERMS: Aspergillosis, pulmonary aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, respiratory disease, airsacculitis.

RESUMO.- [Pesquisa de *Aspergillus fumigatus* em carcaças de frango de corte normais e condenadas por aerossaculite.] Nos abatedouros, a inspeção das carcaças é fundamental para a detecção e monitoramento da prevalência de certas doenças. Os objetivos do trabalho foram avaliar a ocorrência de aspergilose causada por *Aspergillus fumigatus* em aves comerciais através do diagnóstico micológico e histopatológico e verificar a possibilidade de associação causal entre os critérios de diagnóstico de aspergilose e condenação por aerossaculite em frangos de corte através de um estudo de caso-controle. O estudo foi realizado com 380 amostras. Foram coletados pulmões de frangos condenados (95) e não condenados (285) por aerossaculite, diretamente na linha de abate de um frigorífico. Quarenta e seis (12%) amostras de pulmão foram positivas na cultura micológica. Do total de amostras, 177 (46,6%) apresentaram alterações histopatológicas, sendo os mais frequentes pneumonia fibrinoheterofílica necrótica, pneumonia heterofílica e hiperplasia linfóide. Do total de 380 pulmões analisados, 65,2% (30) apresentaram al-

[1] Received on June 24, 2013.
Accepted for publication on July 24, 2013.

[2] Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. *Corresponding author: andreiaspanamberg@yahoo.com.br

[3] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS.

[4] Laboratório de Epidemiologia Veterinária, FaVet-UFRGS, Porto Alegre, RS.

[5] Setor de Patologia Veterinária (FaVet-UFRGS), Porto Alegre, RS.

terações histopatológicas e isolamento fúngico. A relação entre a presença de lesões histopatológicas e isolamento de *A. fumigatus* testada por McNemar indicou que houve associação significativa entre a presença de alterações histopatológicas e o isolamento de *A. fumigatus*. O cultivo micológico e o exame histopatológico aumentam as chances de se detectar alterações pulmonares em aves condenadas pelo Sistema de Inspeção Final do que nas aves normais, sugerindo que tais critérios de diagnóstico são eficazes para aprimorar a avaliação e condenação de aves por aerossaculite.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Aspergilose, aspergilose pulmonar, *Aspergillus fumigatus*, doença respiratória, aerossaculite.

INTRODUCTION

Aspergillosis is one of the main causes of mortality in both immunocompetent and immunodepressed birds. The clinical manifestation of acute aspergillosis is usually observed in young birds, often with episodes of outbreaks in poultry farms, whereas chronic aspergillosis is more frequently observed in adult birds (Tell 2005, Charlton et al. 2008). Its clinical signs depend on the organs or systems involved. The pulmonary system is most frequently affected, with lesions observed in the air sacs and lungs of a wide variety of bird species, which leave the hosts potentially susceptible to infections by *Aspergillus* spp. (Charlton et al. 2008). Clinical cases of aspergillosis have already been diagnosed in chickens (Islan 2009, Ceolin et al. 2012), turkeys (Lair-Fulleringer et al. 2003), ostriches (Paixão et al. 2004), rheas (Copetti et al. 2004), penguins (Carrasco et al. 2001, Xavier et al. 2006), geese (Ziólkowska & Tokarzewski 2007), and many other species (Cray et al. 2009, Spanamberg et al. 2012).

Aspergillosis is most frequently observed in commercial poultry, in which the disease causes stress. This stress is usually associated with poor conditions, such as inadequate ventilation and feed and poultry litter contaminated by large amounts of fungal propagules (Charlton et al. 2008). Several international studies describe the disease both in wild birds and poultry (Islan et al. 2003, Mukaratirwa 2006, Martin et al. 2007, Ziólkowska & Tokarzewski 2007).

In slaughterhouses, carcass inspection is extremely important for the detection of certain diseases and for monitoring their occurrence, as well as for the subsequent inspection of the areas from which the batches originated. Carcass condemnation due to airsacculitis in birds is mostly caused by bacterial and/or viral diseases; however, fungi can also be the cause.

In Brazil, some studies have focused on the diagnosis of aspergillosis in newly hatched birds (Lima et al. 2001, Tessari et al. 2004, Vilela et al. 2004), as part of the sanitary monitoring of hatcheries. However, little is known about the real situation and economic impact of this mycosis in commercial farming.

The objective of this study was to assess the occurrence of aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* in commercial poultry, through mycological and histopathological diagnosis. Additionally, this study attempted to verify the possibility of a causal association between aspergillosis diagnosis criteria and condemnation due to airsacculitis in broilers through a case-control study.

MATERIALS AND METHODS

Collection of lungs. The samples (n = 380) came from 56 flocks located in the State of Rio Grande do Sul, RS, Brazil. Lungs were collected from broilers that were condemned (95) or not condemned (285) due to airsacculitis and taken directly from the slaughter line of a slaughterhouse in the above state. The lungs were kept under refrigeration (4°C). The evaluation and condemnation of carcasses were performed by personnel from the sanitary inspection department. All animal welfare requirements in force were observed in the slaughter process, in accordance with the respective inspection department.

Anatomopathological Diagnosis. Part of the lungs (under refrigeration) was sent for mycological examination, and the remaining part was fixed in 10% buffered formalin. These samples were then processed and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Grocott (EasyPath®) (Artal 2004).

Mycological diagnosis. Lung fragments were streaked onto Sabouraud Dextrose and Malt Extract Agar (37-40°C/7 days) containing chloramphenicol for the isolation of *Aspergillus* spp. The fungal isolates were picked onto Czapeck-Dox agar for final macroscopic and microscopic identification of the species (Stevens 2002).

Definition of cases and controls. The lungs of birds condemned due to airsacculitis were defined as "case", and the lungs obtained from normal birds from the same batch were defined as "control". In airsacculitis, total condemnation occurs when widespread lesions are observed in the carcass (emaciation or cachexia), and partial condemnation occurs when the carcass is not impaired (the legs, wings and breast can be used).

Calculation of sample sizes. The size of the samples was calculated for an unmatched case-control study, corrected by the Kelsey method (Kelsey et al. 1996). The study was planned for the identification of the odds ratio, with a magnitude of 2 and a power of 80% at a 95% significance level (Kelsey et al. 1996):

$$n1 = \frac{(Z_{\alpha/2} \pm Z_{1-\beta})^2 \bar{p}\bar{q}\,(r \pm 1)}{r\,(p_1 - p_2)^2}$$

and

$$n_2 = rn_1$$

where n_1= number of exposures; n_2=number of non-exposures; $Z_{\alpha/2}$= normal standard deviation for the two-tailed test, based on the alpha level; Z_{β}=normal standard deviation for the one-tailed test, based on the beta level; r=ratio of non-exposures in relation to the exposures; p_1=proportion of exposures with the disease and q_1=1-p_1, p_2=proportion of non-exposures with the disease and q_2=1-p_2.

The minimum sample for this purpose was 95 cases and 285 controls. The study considered an *m:n* (1:3) rate of cases and controls. The independent variables were first analyzed for data consistency. Variables with missing values (>10%) or with variability (<20%) were not considered for later analysis.

Statistical analysis. The data were stored in Excel spreadsheets and analyzed by descriptive statistics, frequency distribution and contingency tables. McNemar's chi-square test was used to assess the association between the presence of histopathological lesions and the isolation of *Aspergillus fumigatus*.

All analyses were made in R (packagedEpiCalc) and SAS (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Logistic regression was used to verify the relation between the dependent variable (cases

- presence of airsacculitis/with carcass condemnation; and controls - absence of airsacculitis/without carcass condemnation) and the independent variables (HE microscopic alterations; macroscopic alterations, mycological results and Grocott staining) (Hosmer & Lemeshow 2000).

The remaining variables were individually analyzed by logistic regression, and those with p<0.15 were selected. Then, all variables with $p<0.15$ were submitted to correlation analysis (with $r=0.70$ being critical). The remaining variables were studied using the multivariable model, constructed manually *forward* and with *backward* elimination of those variables with p>0.05. The control for confounding variables was verified by monitoring the alterations in the estimator values. The discriminatory power of the model was measured by the area under the ROC curve, and the adjustment verification of the model was made by the Hosmer and Lemeshow test (Hosmer & Lemeshow 2000).

Table 1. Results of mycological culture for *Aspergillus fumigatus*

Mycological culture	Absolute frequency	Relative frequency (%)
Positive	46	12
Negative	334	88
TOTAL	380	100

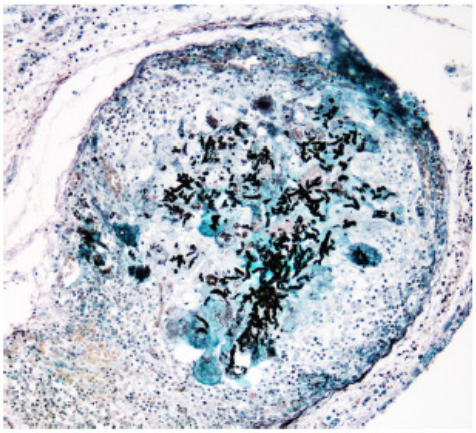

Fig.1. Hyaline, branching septate hyphae of *Aspergillus fumigatus*. Grocott staining, obj.20x.

RESULTS

Forty-six (12%) lung samples were positive for *Aspergillus fumigatus* in mycological culture (Table 1). These isolates came from 23 flocks located in different counties.

Among all samples, 177 (46.6%) presented histopathological alterations, among which the most frequent were necrotic, fibrinous, heterophilic pneumonia, heterophilic pneumonia and lymphoid hyperplasia (Table 2). Only in one sample were fungal elements detected by HE and Grocott staining (Fig. 1). Fifty-nine (15.52%) lung samples showed macroscopic alterations.

Of the 380 lungs analyzed, 65.2% (30) showed histopathological alterations and isolation of fungi (Table 3). The statistical analysis (McNemar's chi-square test, $\chi^2=7,28/p<0,05$) indicated a significant association between the presence of histopathological lesions and the isolation of *A. fumigatus*. Additionally, *A. fumigatus* was 2.3 times more likely to be isolated in animals with histopathological lesions than in those with no lesions. The logistic regression model identified a significant association of the following assays with condemnation due to airsacculitis (i.e., cases): mycological culture (OR = 11,17; $CI_{95\%}$ = 4,17-30,27; $p< 0,001$)

Table 2. Frequency of histopathological alterations (HE staining) in lung samples

Histopathologic diagnosis	Lesion intensity			Total
	Mild	Moderate	Severe	
Fibrinous heterophilic bronchopneumonia	0	1	2	3
Necrotic fibrinous heterophilic bronchopneumonia	0	1	1	2
Fibrinous heterophilic bronchitis	0	3	3	6
Necrotic fibrinous heterophilic bronchitis	3	2	0	5
Heterophilic bronchitis	3	0	2	5
Chronic pleuritis	1	1	0	2
Fibrinous heterophilic pleuropneumonia	0	1	0	1
Necrotic fibrinous heterophilic pleuropneumonia	0	0	2	2
Fibrinous heterophilic pneumonia	1	6	1	8
Necrotic fibrinous heterophilic pneumonia	0	6	11	17
Granulomatous pneumonia	0	1	0	1
Heterophilic pneumonia	13	2	0	15
Lymphoid hyperplasia	107	22	1	130
Normal				203
TOTAL				380

Table 3. Histopathological results (HE staining) and *Aspergillus fumigatus* isolation

Mycological culture	Histopathology (HE)			
	With alterations	Without alterations	Total	Relative frequency (%)
Positive	30*	16	46	65,2
Negative	147	187	334	44
TOTAL	177	203	380	46,6

* Detection of fungal elements (Grocott staining): hyaline, branching septate hyphae (n=1).

Table 4. Multivariate logistic regression analysis between mycological cultures and histopathology results

Variable	Estimate (β)	Standard error	*p*-value	Odds (CI: 95%)
Mycological culture				
Positive	2.41	0.50	<0.001	11.17(4.17-30.27)
Negative	-	-	-	-
Histopathology (HE)				
With alterations	1.26	0.29	<0.001	3.53(1.97-6.32)
Without alterations	-	-	-	-

and histopathological testing (OR =3,53; $CI_{95\%}$ =1,97-6,32; p<0,001) (Table 4). The discriminatory power of the model identified by the ROC curve was 70%, and the adequacy of the model was verified using the Hosmer-Lemeshow test (p=0.80).

DISCUSSION

The widespread distribution of fungal propagules with tiny diameters, particularly in the case of *Aspergillus fumigatus*, which is found on the anemophilous flora of all continents, constantly exposes the respiratory tract of both humans and animals to fungal colonization.

Tashiro et al. (2011) observed a fungal colonization rate of 45% (62) in 139 human lungs, with *A. fumigatus* being the most frequently isolated fungus (41%). Similarly, Lass-Flörl et al. (1999) found that *A. fumigatus* prevailed in 41.07% of 74 positive samples.

In broilers under suspicion of aspergillosis, Sajid et al. (2006) and Islan et al. (2003) isolated *A. fumigatus* in 48.43% and 17.53% of the cultures, respectively. In this study, 46 (12%) of the lungs analyzed contained *A. fumigatus*. Specifically in the case of birds, conditions that favor the development of fungi in confinement buildings expose commercial poultry to a higher risk of inhaling conidia of *A. fumigatus* during the farming period. This is a condition that frequently results in the isolation of the fungus from the lungs of healthy birds (Arné et al. 2011).

Even though only one case was clearly characterized as aspergillosis through histopathological testing and mycological cultivation, we verified that there was a significant association between the two variables. The literature shows that in some cases, cultures of fungi and cytopathological examination of respiratory specimens often yield negative results and a lack sensitivity for detecting fungal elements in an early stage of infection (Tarrand et al. 2003). *Aspergillus fumigatus* is also frequently isolated from straw and straw particles in animal housing for pigs, cattle and poultry, where repeated exposure can cause outbreaks of invasive disease in poultry flocks and respiratory problems in other animals (Arné et al. 2011). Among animals that are affected by aspergillosis, birds are among the species that can naturally acquire infection in the absence of immunodepression (Clemons & Stevens 2005).

A small number of samples with macroscopic alterations (15.52%) was found in the study. In a study of the anatomopathological aspects of aspergillosis in birds, Cacciuttolo et al. (2009) suggest that the presence of conidia in their respiratory system may lead to a latent infection without clinical symptoms and macroscopic lesions. Recovery of *Aspergillus* spp. in respiratory samples in the absence of signs of pneumonia suggests that birds may only be carriers of the fungi unless stimulated by a decreased resistance of the host elicited by some stress such as an infectious disease, a toxin or malnutrition (Garcia et al. 2007).

Respiratory infections are common among the chicken population. The histopathological diagnosis of the lung sections showed several alterations in 46,6% of the samples (lymphoid hyperplasia, pneumonia, bronchitis and bronchopneumonia) with variable lesion intensity most likely associated with bacterial and/or viral agents (Zafra et al. 2008). However, our results concur with the findings of Steinlage et al. (2003), which indicate that *A. fumigatus* may not be the primary cause of respiratory infection. The histological alteration observed most frequently was lymphoid hyperplasia. This change is often nonspecific and quite frequently occurs in the respiratory system in response to any injury (Fletcher 2008).

Regarding the logistic regression results, it is possible to suggest that both the mycological cultivation and the histopathological testing increase the probability of detecting pulmonary alterations in birds condemned by the Final Inspection System, which suggests that such diagnostic criteria can improve the assessment and condemnation of birds affected by airsacculitis. Fungal isolation from respiratory samples has been regarded as being of limited usefulness in the *ante mortem* diagnosis of aspergillosis in human patients. However, in livestock, this is a widely used tool for monitoring batches and may point to possible corrective measures for risk factors found in the properties in question.

Acknowledgements.- Financial support was received from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors thank Everton Fauth of the Federal Inspection Service, RS, for access to the data presented in this study.

REFERENCES

Arné P., Thierry S., Wang D., Deville M., Le Loc'h G., Desoutter A., Féménia F., Nieguitsila A., Huang W., Chermette R. & Guillot J. 2011. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. Int. J. Microbiol. Article ID 746356. Doi:10.1155/2011/746356. 14p.

Artal E.M. 2004. Diagnóstico histopatológico de las micosis. Revta Iberoam. Micol. 21:1-9.

Cacciuttolo E., Rossi G., Nardoni S., Legrottaglie R. & Mani P. 2009. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. Vet. Res. Commun. 33:521-527.

Carrasco L., Lima J.S., Halfen D.C., Salguero F.J., Sanchez-Cordon P. & Becker G. 2001. Systemic aspergillosis in an oiled magallanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health 48:551-554.

Ceolin L.V., Flores F., Oliveira I.M.C., Lovato M., Galiza G.J.N., Kommers G.D., Risso N. & Santurio J.M. 2012. Macroscopic and Microscopic Diagnosis of Aspergillosis in Poultry. Acta Scient. Vet. 40(3):1061.

Charlton B.R., Chin R.P. & Barnes H.J. 2008. Fungal infections, p.989-1001. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E. (Eds), Diseases of Poultry. Blackwell Publishing. Ames, Iowa.

Clemons K.V. & Stevens D.A. 2005. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. Med. Mycol. 43(1):S101-S110.

Copetti M.V., Segabinazi S.D., Flores M.L., Alves S.H. & Santurio J.M. 2004. Pulmonary aspergillosis outbreak in *Rhea americana* in Southern Brazil. Mycopathologia 157:269-271.

Cray C., Watson T. & Arheart K. 2009. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. Avian Dis. 53:491-494.

Fletcher O.J. 2008. Avian Histopathology. 3rd ed. Omni Press, Madison. 438p.

Garcia M.E., Lanzarot P., Rodas V.L., Costas E., J.L. & Blanco. 2007. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. Vet. Med.-Czech. 52(10):464-470.

Hosmer D.W. & Lemeshow S. 2000. Applied Logistic Regression. Wiley, New York. 392p.

Islan M.N., Rashid M.H., Juli M.S.B., Rima U.K. & Khatun M. 2009. Pneumomycosis in chickens: clinical, pathological and therapeutical investigation. Int. J. Sustain. Crop Prod. 4:16-21.

Islan M.R., Das B.C., Hossain K., Lucky N.S. & Mostafa M.G. 2003. A study on the occurrence of poultry diseases in Sylhet region of Bangladesh. Int. J. Sustain. Crop Prod. 2:354-356.

Kelsey J.L. 1996. Methods in Observational Epidemiology. 2nd ed. Oxford University Press, New York. 432p.

Lair-Fulleringer S., Guillot J., Desterke C., Seguin D., Warin S., Bezille A., Chermette R. & Bretagne S. 2003. Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. J. Clin. Microbiol. 41:1798-1800.

Lass-Flörl C., Salzer G.M., Schmid T., Rabl W., Ulmer H. & Dierichi M.P. 1999. Pulmonary *Aspergillus* colonization in humans and its impact on management of critically ill patients. Brit. J. Haematol. 104(4):745-747.

Lima Jr J.S., Pinto D.M., Carrasco L.O., Salgueiro F.J.B. & Meireles M.C.A. 2001. Incidência de fungos na produção de pintos de corte de um dia de idade. Revta Bras. Agrociência 7:73-77.

Martin M.P., Bouck K.P., Helm J., Dykstra M.J., Wages D.P. & Barnes J. 2007. Disseminates *Aspergillus flavus* infection in broiler breeder pullets. Avian Dis. 51:626-631.

Mukaratirwa S. 2006. Outbreak of disseminated zygomycosis and concomitant pulmonary aspergillosis in breeder layer cockerels. J. Vet. Med. 53:51-53.

Paixão T.A., Nascimento E.F., Parra P.N.S. & Santos R.L. 2004. Aspergilose em avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil. Ciência Rural 34:573-576.

Sajid M.A., Khan I.A. & Rauf U. 2006. *Aspergillus fumigatus* in commercial poultry flocks, a serious threat to poultry industry in Pakistan. J. Anim. Plant Sci. 16:79-81.

Spanamberg A., Casagrande R.A., Ferreiro L., Rolim V.M., Souza S.O., Gonçalves I.C.M., Oliveira L.G.S., Wouters F., Wouters A.T.B., Fontana C.S. & Driemeier D. 2012. Aspergillosis in green-winged saltators (*Saltator similis*) participants in bird singing competitions. Acta Scient. Vet. 40(4):1089.

Steinlage S.J.T., Sander J.E., Brown T.P., Lobsinger C.M., Thayer S.G. & Martinez A. 2003. Disseminated mycosis in layer cockerels and pullets. Avian Dis. 47:229-233.

Stevens D.A. 2002. Diagnosis of fungal infections: current status. J. Antimicrob. Chemother. 49:11-19.

Tarrand J.J., Lichterfeld M., Warraich I., Luna M., Han X.Y., May G.S. & Kontoyiannis D.P. 2003. Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. Am. J. Clin. Pathol. 119:854-858.

Tashiro T., Izumikawa K., Tashiro M., Takazono T., Morinaga Y., Yamamoto K., Imamura Y., Miyazaki T., Seki M., Kakeya H., Yamamoto Y., Yanagihara K., Yasuoka A. & Kohno S. 2011. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. Med. Mycol. 49:581-587.

Tell L.A. 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. Med. Mycol. 43:71-73.

Tessari E.N.C., Cardoso A.L.S.P., Castro A.G.M., Kanashiro A.M.I. & Zanatta G.F. 2004. Prevalência de aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 71:75-77.

Vilela S.M.O., Mota R.A., Santos A.P.F., Silva L.B.G. & Silva J.S.A. 2004. Surto de Aspergilose ocular em pintos de corte (*Gallus gallus domesticus* Linneaus, 1758). Ciênc. Vet. Tróp. 7:145-147.

Xavier M.O., Leite A.T.M. & Soares M.P. 2006. Aspergilose em pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) - relato de caso. Vet. Zootec. 13:28-32.

Zafra R., Pérez J., Pérez-Écija R.A., Borge C., Bustamante R., Carbonero A. & Tarradas C. 2008. Concurrent aspergillosis and ascites with high mortality in a farm of growing broiler chickens. Avian Dis. 52:711-713.

Ziólkowska G. & Tokarzewski S. 2007. Occurrence of moulds in reproductive goose flocks in southern-eastern Poland. Bull. Vet. Inst. Pulawy 51:553-561.

DISCUSSÃO

Dentre os agentes fúngicos, *Aspergillus fumigatus* é o patógeno mais envolvido nos casos de aspergilose em aves. Outras espécies como *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. terreus* também podem causar a enfermidade, muitas vezes em infecções mistas, mas são menos freqüentes em relação ao *A. fumigatus* (TELL, 2005; ARNÉ *et al*. 2011).

A utilização de métodos moleculares para a identificação micológica é importante e recomendada, já que muitas espécies são macro e microscopicamente semelhantes, fato que pode levar a erros de identificação fúngica. No caso das espécies pertencentes à seção *Fumigati*, frequentemente erros de identificação ocorrem, sendo as espécies, na prática laboratorial, identificadas como *A. fumigatus*. Algumas espécies pertencentes à seção *Fumigati* têm sido descritas como patógenos humanos, particularmente *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *N. pseudofischeri* e *N. Udagawae* (SERRANO *et al*., 2011). Baseado nesses relatos, espécies da seção *Fumigati* podem estar envolvidas em casos de aspergilose e/ou podem estar presentes, como colonizadoras, nos pulmões de aves sadias.

Nesse trabalho, 44 isolados foram identificados como *A. fumigatus* e também foram genotipados, apresentando perfis genéticos variados entre eles. Estudos de genotipagem mostram que isolados ambientais podem ser potencialmente causadores de aspergilose em aves susceptíveis. Resultados similares foram obtidos por Van Waeyenberghe *et al*. (2011) (57 de 65 isolados; 87,7%). Por outro lado, Alvarez-Perez *et al*. (2010) reportaram 13 (39,4%) genótipos distintos de 33 isolados obtidos de aves doentes, e Lair-Fulleringer *et al*. (2003) reportaram 17 (15%) genótipos distintos em 114 isolados de perus sadios e com aspergilose. Nossos resultados podem ser explicados pelo uso de oito marcadores moleculares combinados para a genotipagem de *A. fumigatus*

A ampla distribuição dos pequenos conídios de *A. fumigatus* presente no ar faz com que o trato respiratório de humanos e animais esteja constantemente exposto à colonização, por esse motivo, o significado do isolamento de *Aspergillus* spp. em amostras do trato respiratório não é simples, principalmente por causa das dificuldades em distinguir colonização e doença. Além disso, os conídios inalados mostram uma pequena parcela da (LATGÉ, 1999; PASQUALLOTO, 2009) diversidade de isolados

presentes no ambiente. Consequentemente, é esperada uma alta diversidade genética de isolados inalados pelas aves.

No presente estudo todos os isolados foram obtidos de aves criadas em diferentes aviários, porém quatro isolados foram idênticos. Genótipos iguais podem ocorrer ao acaso em isolados não relacionados, as prováveis explicações para esse resultado são eventuais contaminações no incubatório por *Aspergillus* sp., ou ainda a exposição das aves a uma fonte comum como o ambiente dos aviários ou os alimentos, incluindo rações e volumosos (CHARLTON, 2008; ARNÉ *et al*. 2011). O clima, temperatura e umidade são fatores que estimulam a propagação de *Aspergillus* sp., especialmente quando matéria orgânica está acumulada.

Quanto ao isolamento de *A. fumigatus*, Tashiro *et al.* (2011) detectaram 45% (62 de 139) de amostras pulmonares de humanos colonizadas, sendo *A. fumigatus* o mais isolado (41%), enquanto que LASS-FLÖRL *et al.* (1999), encontraram 40,5% (30 de 74) amostras positivas, sendo *A. fumigatus* predominante em 41,07%.

Em frangos suspeitos de aspergilose, Sajid *et al.* (2006) e Islan *et al.* (2003) detectaram, respectivamente, 48,43% e 17,53% culturas positivas para *A. fumigatus.* No presente estudo, 46 (12,1%) dos pulmões analisados foram positivos na cultura micológica, apresentando crescimento de *A. fumigatus.* No caso das aves, condições favoráveis do ambiente dos galpões de confinamento, fazem com que as criações comerciais tenham risco de inalar conídios de *A. fumigatus* durante o período criação, condição que resulta frequentemente no isolamento do fungo em pulmões de aves saudáveis (ARNÉ *et al*., 2011).

Apesar de somente um caso ter sido caracterizado através do padrão de referência de diagnóstico para aspergilose, verificou-se a correlação entre a cultura micológica positiva e a presença de alterações histopatológicas. A literatura mostra que em muitos casos, a cultura fúngica e exame citopatológico de amostras respiratórias frequentemente apresentam resultado negativo, em virtude da baixa sensibilidade de detecção de elementos fúngicos (hifas) nos primeiros estágios de infecção (TARRAND *et al*. 2003). *A. fumigatus* é frequentemente isolado da palha, cama de aviários e outros resíduos do ambiente de confinamento de bovinos, suínos e aves. A exposição contínua aos conídios pode causar surtos da doença em aviários e /ou problemas respiratórios em outros animais (ARNÉ *et al*., 2011). Entre os animais que são afetados pela aspergilose, as aves estão entre as espécies que podem naturalmente adquirir a infecção na ausência de imunossupressão (CLEMONS & STEVENS, 2005).

Um baixo número de amostras com alterações macroscópicas (15,52%) foi encontrado nesse estudo. Cacciuttolo *et al.* (2009) em uma pesquisa sobre aspectos anatomopatológicos de aspergilose em aves descreve que a presença de conídios no sistema respiratório pode levar a uma infecção latente sem sintomas clínicos e lesões macroscópicas. O isolamento de *Aspergillus* spp. em amostras respiratórias, na ausência de sinais de pneumonia, sugere que as aves podem ser apenas portadoras de *Aspergillus*, embora não desenvolvam a doença, a menos que ocorra uma diminuição da resistência imunológica associada a algum estresse, como uma doença infecciosa, uma substância tóxica e/ou desnutrição (GARCIA *et al*., 2007).

Infecções respiratórias são comuns em aves. O diagnóstico histopatológico dos pulmões mostrou alterações em 46,6% das amostras, sendo hiperplasia linfóide, pneumonia, bronquite e broncopneumonia as mais frequentes, com intensidade da lesões variáveis. Outros resultados obtidos indicam que dentre 380 pulmões analisados, 30 (65,2%) apresentaram alterações anatomopatológicas e cultura positiva, enquanto que, em somente um caso (0,26%) coloração de grocott foi positiva, embora sem relação com aerossaculite e/ou lesão macroscópica. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Steinlage *et al*. (2003), os quais indicam que *A. fumigatus* pode não ser a causa primária da infecção respiratória e que as alterações possam estar associadas com agentes bacterianos e/ou virais (ZAFRA *et al*. 2008). A alteração histopatológica mais frequente foi hiperplasia linfóide. Esse achado é geralmente não específico e ocorre no sistema respiratório contra qualquer injúria (FLETCHER, 2008).

Com relação aos resultados da regressão logística, é possível sugerir que tanto o cultivo micológico quanto o exame histopatológico aumentam a probabilidade de detectar alterações pulmonares em aves condenadas pelo Sistema de Inspeção Final, o que sugere que tais critérios de diagnóstico podem melhorar a avaliação e condenação de aves afetadas por aerossaculite. O isolamento de fúngico de amostras respiratórias tem sido considerado como sendo limitado no diagnóstico *ante mortem* de aspergilose em pacientes humanos. No entanto, em animais de criação, isso é amplamente utilizado como ferramenta de monitoramento de lotes e pode indicar medidas corretivas para fatores de risco nas propriedades.

4 CONCLUSÕES

a) Embora apenas uma amostra tenha apresentado aspergilose, houve associação positiva entre cultura e histopatologia.

b) O estudo caso-controle indicou que houve associação significativa, além, de que animais com lesões histopatológicas tiveram 2,3 mais chances de isolamento de *A. fumigatus* do que aqueles sem lesões. O modelo de regressão logística identificou associação significativa das seguintes variáveis: cultivo micológico e o resultado do exame histopatológico.

c) Todos os isolados foram identificados como *Aspergillus fumigatus*.

d) Houve alta diversidade genética entre os isolados de *Aspergillus fumigatus.*

REFERENCIAS

AL-ALAWI, A. et al. Aspergillus-related lung disease. **Canadian Respiratory Journal.** v. 12, p. 377–387, 2005.

ALCAZAR-FUOLI, L. et al. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.52, p.1244-1251, 2008.

AL-DOORY, Y. & WAGNER, G.E. **Aspergillosis**. Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1985. p. 43-78.

ALVAREZ-PEREZ, S. et al. Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. **Veterinary Microbiology.** v. 144, p. 444-449, 2010.

ANDREATTI FILHO, R.L. Enfermidades micóticas. In: BERCHIERI JÚNIOR. A. & MACARI, M. (Eds.) **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000p. p. 369-378.

ARAUJO, R., AMORIM, A., GUSMAO, L. Diversity of microsatellites within *Aspergillus* section *Fumigati*. **BMC Microbiology.** v.12, p.154, 2012.

ARNÉ, P. et al. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. **International Journal of Microbiology.** v. 2011, Article ID 746356, doi:10.1155/2011/746356, 14 páginas, 2011.

BALAJEE, S.A. et al. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. **Eukaryotic Cell**. v. 6, p. 1392–1399, 2007.

BALAJEE, S.A. et al. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, p. 5996-5999, 2005.

BALAJEE, S.A. et al. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. **Eukaryot Cell**. v. 5, p.1705-1712, 2006.

CACCIUTTOLO, E. et al. Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. **Veterinary Research Communications.** v. 33, p. 521–527, 2009.

CARDOSO, A.L.S.P. et al. Avaliação da qualidade sanitária de incubatório por meio de placas de sedimentação. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo).** v. 76, n. 2, p. 279-283, 2009.

CARRASCO, L. et al. Systemic aspergillosis in an oiled magallanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health.** v. 48, p. 551-554, 2001.

CHARLTON, B.R.; CHIN, R.P.; BARNES, H.J. Fungal Infections. In: SAIF, Y.M.(Ed.). **Diseases of Poultry**. 12th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. pp. 989-1001.

CLEMONS, K.V. & STEVENS, D.A. The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. **Medical Mycoly**. v.43, p.101-110, 2005.

COPETTI, M.V. et al. Pulmonary aspergillosis outbreak in *Rhea americana* in Southern Brazil. **Mycopathologia.** v. 157, p. 269–271, 2004.

CORK, S.C. et al. Aspergillosis and other causes of mortality in the stitchbird in new Zealand. **Journal of Wildlife Diseases.** v. 35, p. 481–486, 1999.

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

FERNS, R.B. Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. **Leukemia & Lymphoma.** v. 47, n. 1, p. 15-20, 2006.

FLETCHER, O.J. **Avian Histopathology.** 3ed. Omni Press: Madison, 2008. 438 p.

GARCIA, M.E. et al. Fungal flora in the trachea of birds from a wildlife rehabilitation centre in Spain. **Veterinarni Medicina.** v. 52, n. 10, p. 464-470, 2007.

HONG, S.B. et al. New taxa of Neosartorya and Aspergillus in Aspergillus section Fumigati. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.93, p.87-98, 2008.

ISLAN, M.N. et al. Pneumomycosis in chickens: clinical, pathological and therapeutical investigation. **International Journal of Sustainable Crop Production.** v.4, p. 16-21, 2009.

ISLAN, M.R. et al. A study on the occurrence of poultry diseases in Sylhet region of Bangladesh. **International Journal of Poultry Science.** v. 2, p. 354-356, 2003.

KRENKE, R. & GRABCZAK, E. Tracheobronchial Manifestations of Aspergillus Infections. **The Scientific World Journ**al. v. 11, p.2310–2329, 2011.

LAIR-FULLERINGER, S. et al. Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from Breeding Turkeys and Their Environment by Genotyping with Microsatellite Markers. **Journal of clinical Microbiology.** v. 41, p. 1798–1800, 2003.

LASS-FLÖRL, C. et al. Pulmonary Aspergillus colonization in humans and its impact on management of critically ill patients. **British Journal of Haematology**. v.104, p.745-747, 1999.

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

LIMA, J.S.JR. et al. Incidência de fungos na produção de pintos de corte de um dia de idade. **Revista Brasileira de Agrociência.** v.7, p.73-77, 2001.

MARTIN, M.P.; BOUCK, K.P.; HELM, J.; DYKSTRA, M.J.; WAGES, D.P.; BARNES, J. Disseminates *Aspergillus flavus* infection in broiler breeder pullets. **Avian diseases.** v. 51, p. 626-631, 2007.

MUKARATIRWA, S. Outbreak of Disseminated Zygomycosis and Concomitant Pulmonary Aspergillosis in Breeder Layer Cockerels. **Journal of Veterinary Medicine.** v. 53, n. 1, p. 51-53, 2006.

PAIXÃO, T.A. et al. Aspergilose em avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil. **Ciência Rural.** v. 34, n. 2, p. 573-576, 2004.

PASQUALOTTO, A.C. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. **Medical Mycology.** v. 47, p. S261-S270, 2009.

RECCO, P. & LINAS, M.D. Aspergillus: Données Mycologiques et Immunologiques. In: LABORATOIRES JANSSEN-CILAG (Ed.). **Aspergillus et Pathologie Respiratoire**. Edité par Platoon, 1994. p. 9-21.

REDIG, P.T.; FULLER, M.R.; EVANS, D.L. Prevalence of *Aspergillus fumigates* in free-living goshawks (*Accipiter gentilis atricapillus*). **Journal of Wildlife Diseases.** v. 16, p. 168-174, 1980.

SAJID, M.A.; KHAN, I.A.; RAUF, U. *Aspergillus fumigatus* in commercial poultry flocks, a serious threat to poultry industry in Pakistan. **The Journal of Animal and Plant Sciences.** v.16, p.79-81, 2006.

SAMSON, R.A. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph Neosartorya. **Studies in Mycoly.** v.59, p.147-203, 2007.

SERRANO, R. et al. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. **BMC Microbiology**. v.11, p. 82, 2011.

SHIN, S.H. et al. Chronic rhinosinusitis: An enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.** p. 1-7, 2004.

SPANAMBERG, A. et al. Aspergillosis in Green-winged Saltator (*Saltator similis*) subject of bird-singing competition: three cases. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 40, p.1089, 2012.

STEINLAGE, S.J.T. et al. Disseminated mycosis in layer cockerels and pullets. **Avian Diseases.** v. 47, p. 229–233, 2003.

STEVENS, D.A. Diagnosis of fungal infections: current status. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 49, p. 11-19, 2002.

TARRAND, J.J. et al. Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. **American Journal of Clinical Pathology.** v.119, p.854 -858, 2003.

TASHIRO, T. et al. Diagnostic signifi cance of *Aspergillu*s species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. **Medical Mycology.** v. 49, p. 581–587, 2011.

TELL, L.A. Aspergillosis in mammals and birds: impacto n veterinary medicine. **Medical Mycology.** v. 43, p. S71-S73, 2005.

TESSARI, E.N.C. et al. Prevalência de Aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo).** v.71, n. 1, p. 75-77, 2004.

THIERRY, S. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. **BMC Microbiology.** v.10, p. 315, 2010.

VAN WAEYENBERGHE L. *et al*. Microsatellite typing of avian clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Avian Pathology**. v. 40, p. 73-77, 2011.

VANHEE, L.M. What can be learned from genotyping of fungi?. **Medical Mycology**. v. 48, p. 60–69, 2010.

VANHEE, L.M.E. High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** v. 27, p. 1005–1007, 2008.

VILELA, S.M.O. et al. Surto de Aspergilose ocular em pintos de corte (*Gallus gallus domesticus*). **Ciência Veterinária nos Trópicos.** v. 7, p. 145-147, 2004.

XAVIER, M.O. et al. Aspergilose em pingüim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) – relato de caso. **Veterinária e Zootecnia.** v. 13, p. 28-32, 2006.

ZAFRA, R. et al. Concurrent aspergillosis and ascites with high mortality in a farm of growing broiler chickens. **Avian Diseases.** v. 52, p. 711–713, 2008.

ZIÓLKOWSKA, G. & TOKARZEWSKI, S. Occurrence of moulds in reproductive goose flocks in southern-eastern Poland. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.** v. 51, p.553-561, 2007.

ZMEILI, O.S. & SOUBANI, A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. **Quarterly Journal of Medicine.** v. 100, p. 317–334, 2007.