

## ***Aspergillus fumigatus stricto sensu* E *A. flavii* COMO AGENTES DE ASPERGIOSE EM ALBATROZES DURANTE REABILITAÇÃO**

ARYSE MARTINS MELO<sup>1,2</sup>; GABRIEL BARACY KLAFKE<sup>3</sup>;  
ANGELA LEITZKE CABANA<sup>4</sup>; VANICE RODRIGUES POESTER<sup>5</sup>; RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO<sup>6</sup>; CRISTINA GEVHER FERNANDES<sup>4</sup>; ANDREA VON GROLL<sup>5</sup>; MELISSA ORZECHOWSKI XAVIER<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas – arysemartins@gmail.com*

<sup>2</sup>*Centro de Recuperação de Animais Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande*

<sup>3</sup>*Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande – gabrielklafke@yahoo.com.br*

<sup>4</sup>*Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – cabangela@gmail.com, crisgevf@yahoo.com.br*

<sup>5</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande – melissaxavierfurg@gmail.com, avongrol@hotmail.com, vanicerp@gmail.com*

<sup>6</sup>*Aiuká Consultoria em Soluções Ambientais - rodolfo.silva@aiuka.com.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

A aspergilose é uma doença fúngica de importância reconhecida em aves marinhas de cativeiro, principalmente em pinguins durante a reabilitação, sendo responsável por até 50% dos casos de óbitos nesses animais (SILVA-FILHO et al., 2015). A infecção ocorre principalmente a partir da inalação de propágulos fúngicos, e *Aspergillus* seção *Fumigati* caracteriza-se como o principal agente etiológico responsável pela doença (XAVIER et al., 2007).

Inseridas na seção *Fumigati*, espécies como *A. fumigatus stricto sensu*, *A. lentulus* e *A. felis* são apontadas como as principais causas de aspergilose em humanos, não havendo dados na literatura sobre as espécies causadoras desta micose em aves marinhas. Atualmente a identificação de espécies de *Aspergillus* só é possível por métodos moleculares, uma vez que espécies da mesma seção possuem características fenotípicas muito semelhantes (LAMOTH, 2016). O conhecimento do agente causal da aspergilose tem relevância não somente epidemiológica, como também devido ao fato de que diferentes espécies pertencentes a uma mesma seção apresentam características distintas de virulência e resistência a antifúngicos (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2014; HOF; KUPFAHL, 2009).

Apesar de haver extensa literatura sobre a aspergilose em aves, ainda não há relatos dessa doença em albatrozes. Albatrozes são aves marinhas de vida longa, tendo expectativa de vida de até 60 anos, sendo que a espécie *Talassarche melanophrys* (albatroz-de-sobrancelha-negra) não se reproduz no litoral brasileiro, somente utiliza as águas no litoral sul do Rio Grande do Sul para alimentação, inclusive durante o período reprodutivo, realizando longas viagens para forrageio (BUGONI et al., 2008).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi relatar casos de aspergilose durante a reabilitação de albatrozes e realizar a identificação molecular dos principais agentes causais de *Aspergillus* seção *Fumigati*.

### **2. METODOLOGIA**

Foi realizado um estudo retrospectivo, incluindo todos os albatrozes que morreram durante a reabilitação no Centro de Recuperação de Animais Marinhos

da Universidade Federal do Rio Grande (CRAM-FURG) (32°01'34" S, 52°06'21" O), a partir do ano de 2015.

Avaliando o resultado dos exames *post-mortem* no banco de dados do CRAM-FURG, foram considerados casos de aspergilose os animais que durante a necropsia apresentaram lesões em trato respiratório compatíveis com a doença, com demonstração de invasão tecidual por hifas hialinas septadas em ângulo de 45° em cortes histopatológicos corados com Hematoxilina-Eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) e Prata (Grocott). A confirmação do agente etiológico se deu por isolamento em cultivo realizado em Ágar Sabouraud Dextrose a 30°C por sete dias.

Para identificação do agente causal, foram recuperados os isolados desses albatrozes armazenados na micoteca do Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande. As colônias foram classificadas em seções a partir de características fenotípicas macro e microscópicas. Para a identificação molecular da espécie dos isolados classificados como *Aspergillus* seção *Fumigati*, foi realizada a extração do DNA genômico conforme WOODS et al., (1993) para a amplificação de uma região de 492 pares de bases do gene *benA* pela reação em cadeia da polimerase de acordo com STAAB et al., (2009). O produto amplificado foi purificado e sequenciado utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer. Para confirmação da espécie, foi realizado BLAST das sequências a partir do *GenBank*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período estudado, 14 albatrozes foram a óbito durante a reabilitação no CRAM-FURG, sendo inseridos no estudo. Destes, a aspergilose foi diagnosticada em três albatrozes-de-sobrancelha-negra (*T. melanophris*), representando uma mortalidade atribuída de 21%. Embora essa mortalidade atribuída seja menor que a descrita em pinguins-de-Magalhães em recuperação no mesmo Centro (48,5%) (SILVA-FILHO et al., 2015), o estudo se destaca pela descrição inédita da doença neste outro grupo de aves marinhas. De fato, não há dados na literatura sobre a importância da aspergilose como *causa-mortis* de albatrozes em recuperação, ao contrário do que ocorre com pinguins, para os quais a doença é considerada um fator limitante na reabilitação (XAVIER et al., 2011).

As lesões macroscópicas observadas foram granulomas branco-amarelados variando entre 0,1 e 0,5cm de diâmetro, distribuídos difusamente pelos pulmões e sacos aéreos. Duas aves apresentaram colônias fúngicas nos brônquios, e uma ave apresentou a forma disseminada da doença, com presença de granulomas nos rins. Nas análises histopatológicas foram observados granulomas imaturos, constituídos por amplos focos de necrose e em torno dessa, infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos e heterófilos. A cápsula fibrosa era discreta ou ausente. No interior dessas lesões foram observadas hifas fúngicas, as quais foram visualizadas no HE e evidenciadas pelo PAS e Grocott. As lesões macro e microscópicas observadas nessas aves foram compatíveis com o descrito na literatura para outras espécies de aves, e os infiltrados inflamatórios predominantemente de macrófagos e heterófilos são observados com frequência em hospedeiros imunocompetentes (JONES; OROSZ, 2000, XAVIER et al., 2011).

De acordo com a classificação a partir de características macro e micro morfológicas, *Aspergillus* seção *Flavii* foi responsável pela doença em um dos exemplares de albatroz acometidos, enquanto *Aspergillus* seção *Fumigati* foi o agente

etiológico dos outros dois exemplares. A análise do sequenciamento genético demonstrou que as sequências dos dois isolados de *Aspergillus* seção *Fumigati* obtidos foi 100% homólogo a *Aspergillus fumigatus stricto sensu* (sequencia de referência nº LC377774.1 do Genebank). Apesar de não estarem estabelecidas as implicações clínicas relacionadas às diferentes espécies da seção *Fumigati*, estudos experimentais demonstram características que devem ser exploradas, como exemplo, a menor suscetibilidade ao itraconazol apresentada por *A. lentulus* quando comparado a *A. fumigatus stricto sensu* (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2014), e a produção de metabólitos secundários, como a gliotoxina, o que compete maior fator de virulência a algumas espécies dessa seção, como por exemplo, *Aspergillus fumigatus stricto sensu* (HOF; KUPFAHL, 2009).

Dessa forma, considerando que as aves são particularmente suscetíveis a gliotoxina (TELL et al., 2005) a investigação molecular das principais espécies envolvidas nas infecções por *Aspergillus* em aves marinhas é importante para o levantamento epidemiológico da doença, a partir do qual poderão ser traçadas as implicações clínicas das infecções causadas pelas diferentes espécies.

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo relata pela primeira vez casos de aspergilose em albatrozes-de-sobrancelha-negra, e demonstra a importância da doença como responsável por cerca de 20% dos óbitos ocorridos nestas aves durante a reabilitação. Em adição, a identificação molecular do agente etiológico em nível de espécie, contribui para um melhor conhecimento do perfil epidemiológico da doença.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of aspergillus. *Mycopathologia*, v. 178, n. 5–6, p. 427–433, 2014.

BUGONI, L.; MANCINI, P. L.; MONTEIRO, D. S.; NASCIMENTO, L.; NEVES, T. S. Seabird bycatch in the Brazilian pelagic longline fishery and a review of capture rates in the southwestern Atlantic Ocean. *Endangered Species Research*, v. 5, n. 2-3, p. 137-147, 2008.

HOF, H.; KUPFAHL, C. Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: An example that mycotoxins are potential virulence factors. *Mycotoxin Research*, v. 25, n. 3, p. 123–131, 2009.

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

LAMOTH, Frédéric. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. MAY, p. 1–8, 2016.

STAAB, J. F.; BALAJEE, S. A.; MARR, K. A. *Aspergillus* section *Fumigati* typing by PCR-restriction fragment polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 7, p. 2079–2083, 2009.

SILVA FILHO, R. P.; XAVIER, M. O.; MARTINS, A. M.; RUOPPOLO, V.; MENDOZA-SASSI, R. A.; ADORNES, A. C.; CABANA, A.L.; MEIRELES, M. C. A. Incidence density, proportionate mortality, and risk factors of aspergillosis in Magellanic penguins in a rehabilitation center from Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v.46, n.4, p.667-674, 2015.

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

WOODS, J. P.; KERSULYTE, D.; GOLDMAN, W. E.; BERG, D. E. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: Methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.463–464, 1993.

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

XAVIER, M. O., MEINERZ, A. R. M., CLEFF, M. B., OSÓRIO, L. G., SCHUCH, L. F. D., NOBRE, M. O., MEIRELES, M. C. A. Eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.60, n.4, p.873–877, 2008.

XAVIER, M. O.; SOARES M.P.; CABANA A.L.; SILVA-FILHO R.P.; RUOPPOLO V.; MEIRELES M.C.A; SEVERO L.C. Clinical and pathological findings of aspergillosis in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.3, p.520–524, 2011.