

LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO (LTB) EM PINGUINS DE MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*): UMA FERRAMENTA ÚTIL PARA DIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSE COMO FORMA DE TRIAGEM

Jennifer Hauschildt Dias¹; Ângela Leitzke Cabana²; Melissa Orzechowski Xavier³; Aryse Moreira Martins²; Alessandra Jacomelli Teles²; Mário Carlos Araújo Meireles⁴

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, Bolsista de IC CNPq-Demanda Universal – jennifer.hauschildt@gmail.com;

² Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UFPel – – cabanangela@gmail.com; ale.teles@gmail.com; arysemartins@gmail.com

³ Prof^a. Adjunta – Departamento De Microbiologia e Parasitologia – Medicina Veterinária - Universidade Federal de Rio Grande;

⁴ Prof^o Associado – Departamento Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária – UFPel meireles@ufpel.edu.br;

1. INTRODUÇÃO

A aspergilose é uma doença infecciosa não contagiosa de caráter oportunista, causada pelo fungo *Aspergillus* spp. que acomete animais de todas as espécies e tem distribuição mundial. Sua predisposição está ligada a fatores de imunossupressão ou a fatores inerentes ao animal. A infecção por *Aspergillus* spp. ocorre através da inalação dos conídios infectantes (STEVENS et al, 2001).

Os pinguins apresentam maior susceptibilidade aspergilose devida 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 (TELL, 2005)

Nos pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) a doença ocorre em animais cativos ou naqueles que se encontram debilitados em centros de recuperação, já que se tornam mais suscetíveis devido à imunossupressão causada pelo estresse associado à captura, manejo e/ou reabilitação (CUBAS; SILVA; CATÃO, 2006). Nestes animais a manifestação dos sinais é essencialmente respiratória, ocorrendo de forma crônica, com manifestação tardia dos sinais clínicos como dispneia, emaciação, letargia, anorexia e/ou frequentemente morte súbita. (XAVIER et al., 2008 a, b).

O diagnóstico da aspergilose é multivariado, sendo a técnica padrão ouro a cultura fungica realizada através de amostras clínicas como sangue e lavado traqueobrônquico, seguido do exame direto das culturas para avaliar a presença de fungos do gênero *Aspergillus*, (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Uma vez que animais em cativeiro para reabilitação, estão sujeitos a aspergilose e apresentam principalmente dispneia como único sinal clínico, amostras clínicas provenientes do trato respiratório são ideais para identificar a presença do agente para diagnóstico em um primeiro momento, em animais imunossuprimidos, assim como em outras espécies (CABANA, 2013; XAVIER; SEVERO, 2009).

Como complemento a utilização do lavado traqueobrônquico como forma de triagem em pinguins com suspeita de aspergilose, necessitamos ainda, da confirmação histopatológica e culturas positivas do espécime de material estéril coletado (HERBRECHT et al., 2002).

Com isso, o objetivo do nosso estudo foi demonstrar a ocorrência de casos de aspergilose através do isolamento de *Aspergillus* sp. em pinguins-de-Magalhães em cativeiro que apresentavam sinais clínicos respiratórios, como dispnéia com a utilização de lavado traqueobrônquico (LTB) como amostra clínica.

2. METODOLOGIA

Entre os anos de 2009 a 2011 foram coletadas amostras através de lavado traqueobrônquico em 30 animais que se encontravam no Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM – FURG) para reabilitação.

As colheitas de lavado traqueobrônquico foram feitas nos animais que apresentaram os sinais clínicos respiratórios compatíveis com aspergilose durante o período de monitoramento e reabilitação, bem como naqueles que apresentaram resultado positivo para a enfermidade nos testes sorológicos realizados com o sangue coletado destes animais, procedimentos estes, que fazem parte do protocolo internacional de reabilitação de animais marinhos que o CRAM representa.

Coletou-se material proveniente do trato respiratório de forma aséptica através de sonda urinária rígida estéril (número 06) e seringa estéril de 05 ml preenchida com água destilada estéril (3 ml- até 1 ml/kg de PV animal). Então instilou-se a água destilada estéril através da introdução da sonda na traquéia do animal, tomando cuidado para evitar lesões à traquéia na sua bifurcação, e após recuperou-se o fluido instilado sem remover a sonda o mais rápido possível, evitando assim possíveis contaminações e desconforto ao animal.]

As amostras foram acondicionadas em frasco estéril e mantidas sob refrigeração a 4°C por até 24 horas ou congeladas a -20°C até o envio para o processamento laboratorial.

O processamento das amostras foi realizado junto ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina/ FAMED/FURG e foi realizado em capela de fluxo laminar para que todo procedimento fosse o mais asséptico possível. Todas as amostras foram semeadas (na quantidade de 10 microlitros) em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose antes de serem centrifugadas (3.000 rpm/10 minutos) e após separadas em alíquotas em microtubos, devidamente identificados e congelados para testes posteriores a -20°C.

As placas semeadas foram incubadas em estufa á 37°C por até 7 dias com observação diária para posterior avaliação e identificação do crescimento fúngico. O exame microscópico direto das amostras clínicas foi realizado a fresco, com ou solução de hidróxido de potássio (KOH) 10-30%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de 2009 a 2011 dos 30 animais incluídos no estudo, 17 (56,7%) apresentaram óbito por aspergilose; 7 (23,3%) tiveram óbito por outra causa e 7 (23,3%) foram liberados sem sinais clínicos de doença (Tabela 1). Além disso, observaram-se nas coletas de lavado traqueobrônquico, que entre os óbitos pela enfermidade, 14 (82,3%) apresentaram crescimento fúngico da espécie *Aspergillus fumigatus*, dois (11,7%) houve crescimento bacteriano e um (5,8%) não apresentou crescimento de micro-organismo (Tabela 2).

Tabela 1: Óbito de Pinguins-de-Magalhães em cativeiro para reabilitação no CRAM/FURG com sinais clínicos respiratórios, os quais foram coletadas amostras de lavado traqueobrônquico para diagnóstico

Causa do óbito	Percentagem (n=30)
Aspergilose	56,7%
Outras causas	23,3%
Liberação	23,3%

Tabela 2: Crescimento fúngico observado nas amostras de lavado traqueobrônquico coletadas de Pinguins-de-Magalhães com sinais clínicos respiratórios

Crescimento	Percentagem (n=17)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	82,3%
Bacteriano	11,7%
Sem crescimento	5,8%

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, concordando com temas já relatados, pode-se deduzir que o uso de lavado traqueobrônquico como forma de diagnóstico de triagem para os pinguins, é uma forma profilática e eficaz para o diagnóstico, uma vez que 56,7% dos animais que vieram a óbito neste estudo tiveram cultura micológica de espécime respiratório positiva. Sabendo-se da importância do estudo de secreções do trato respiratório de pinguins com suspeita de aspergilose, doença causadora de curso clínico respiratório e de grande importância em cativeiro de reabilitação, bem como as técnicas de colheita, já padronizadas e estabelecidas, tanto para confirmação etiológica do espécime causador da doença como para quantificar esse agente causal é que se considera a técnica de lavado traqueobrônquico útil para diagnóstico e prognóstico de aspergilose em pinguins.

Porém, vale ressaltar a importância da utilização desta técnica apenas como triagem, pois, é necessário o preenchimento de critérios como fatores de risco do hospedeiro; manifestações clínicas; e a evidência microbiológica (cultura/antigenemia) para fechar o diagnóstico, que em nosso trabalho foi comprovada pelas culturas positivas do espécime respiratório, isolando em 82,3%, *Aspergillus fumigatus* como agente causal da enfermidade, conforme já descrito anteriormente em diferentes espécies (BARNES; MARR, 2006).

Concordando com o encontrado na literatura, quando outros autores relatam que *A. fumigatus* é responsável por 90-95% dos casos de aspergilose em aves, neste estudo encontramos também *A. fumigatus* causando 82,3% dos casos de aspergilose isoladas a partir de amostras de lavado traqueobrônquico coletados de pinguins-de-Magalhães em cativeiro para reabilitação (TELL, 2005). Isso indica ainda, que a técnica de LTB é capaz de recuperar amostras de diferentes locais das vias aéreas proximais e distais, uma vez que todas as coletas foram realizadas através de sonda estéril inserida na traqueia dos pinguins e que o número recuperado de amostras positivas apresentou-se expressivo.

4. CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado evidenciou-se que a aspergilose é uma enfermidade fatal para pinguins-de-Magalhães que se encontram debilitados e que o lavado traqueobrônquico como exame de triagem em animais com suspeita de aspergilose associado a acompanhamento sorológico se torna ferramenta útil e importante para diagnóstico definitivo mais rápido e eficaz da doença. Além disso,

demonstra que maiores estudos são necessários para detecção de prognóstico de aspergilose em pingüins.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- BARNES P.D, MARR K.A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):545-61, vi.
- 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 pinguins: avaliação da precocidade e eficácia do teste de imunodifusão radial dupla (IDGA). **XIV Encontro de pós graduação/UFPel.** Out 2012. Pelotas.2012
- CUBAS, Z.S; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária.** Ed.Roca,. 1354p., 2006.
- HERBRECHT R, DENNING, D.W, PATTERSON, T.F, BENNETT, J.E, GREENE, R.E, OESTMANN, J. W, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. **N Engl J Med.**; 347(6):408-15., 2002.
- 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 2013.
- SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, . 388p., 2004.
- 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.** ; 37 (1): 178-184., 2001.
- TELL, L.A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology.**; 43 Suppl 1:71-73., 2005.
- XAVIER, M.O; PASQUALOTTO, A.C; SOARES, M.P; SILVA-FILHO, R.P; MEIRELES, M.C.A; SEVERO, L.C. . Aspergillosis in penguins: gross lesions in 15 cases. **3rd Advances Against Aspergillosis**, Miami, Florida, USA, 132., 2008a
- XAVIER, M.O. Aplicações e limitações do método de detecção do antígeno galactomanana para o diagnóstico de aspergilose. 104f., **Tese (doutorado em ciências pneumológicas- área de conhecimento: Ciências pneumológicas- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.**, 2008b
- XAVIER, M.O; SEVERO, L.C. Diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. Curso de atualização em Micoses. **J Bras Pneumol.**; 35(9):907-919., 2009.