



DESINFECÇÃO AMBIENTAL NO CONTROLE DE ASPERGILLUS spp. NO CENTRO DE RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS MARINHOS

Autor(es): OSÓRIO, Luiza da Gama; XAVIER, Melissa Orzechowski; CABANA, Ângela Leitzke; MEINERZ, Ana Raquel Mano; ALBANO, Ana Paula; MEIRELLES-LEITE, Alice; SILVA-FILHO, Rodolfo Pinho; MEIRELES, Mário Carlos Araújo

Apresentador: Luiza da Gama Osório

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Revisor 1: Isabel Martins Madrid

Revisor 2: Renata Osório de Faria

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

DESINFECÇÃO AMBIENTAL NO CONTROLE DE ASPERGILLUS spp. NO CENTRO DE RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS MARINHOS

OSÓRIO, Luiza da Gama¹; Xavier, Melissa Orzechowski²; CABANA, Ângela Leitzke¹; MEINERZ, Ana Raquel Mano¹; ALBANO, Ana Paula¹; MEIRELLES-LEITE, Alice³; SILVA-FILHO, Rodolfo Pinho³; MEIRELES, Mário Carlos Araújo¹

1 – Universidade Federal de Pelotas – UFPel

2 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

3 – Centro de Recuperação de Animais Marinhos – CRAM – do Museu Oceanográfico Professor Eliézer de Carvalho Rios, da Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG

INTRODUÇÃO

A aspergilose é uma micose oportunista por excelência, causada por diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. fumigatus* (CLARKE & KERRY, 1993; RITCHIE et al., 1994; LATGÉ, 1999; CARRASCO, 2001; FOWLER & CUBAS, 2001). Pingüins, entre outras aves, são particularmente suscetíveis à aspergilose (RITCHIE et al., 1994). Apesar desta micose raramente acometer estas aves marinhas em vida livre, é considerada a doença fúngica mais comum em pingüins de cativeiro (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003) correspondendo a cerca de 30% das causas de mortalidade destas aves em centros de reabilitação e zoológicos, conforme já foi descrito em estudos realizados por OSÓRIO et al. (2005) e ABUNDIS-SANTAMARIA (2003).

A principal forma clínica da aspergilose em aves é respiratória, sendo a fonte infectante, os conídios de *Aspergillus* provenientes do ambiente, os quais penetram no organismo do hospedeiro principalmente por via aérea, afetando, assim, o sistema respiratório destes animais (LACAZ et al, 1984; GRACZYK & CRANFIELD, 1995; BERCHIERI & MACARI, 2000). A doença é geralmente,

secundária à eventos imunossupressores, associados ao cativeiro e ventilação inadequada, o que favorece o aumento da concentração de conídios no ambiente (CLARKE & KERRY, 1993; RITCHIE et al., 1994).

Apesar dos fármacos antifúngicos estarem padronizados para aves, na maioria dos casos a terapia não é eficaz, devido ao estágio avançado em que a doença normalmente é diagnosticada e à característica progressiva da enfermidade (REDIG, 1993; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Assim, a prevenção é a melhor forma de controle da aspergilose em pingüins em cativeiro (ANDREATTI FILHO, 2000; FOWLER & CUBAS, 2001).

Uma vez que a prevenção é a principal ferramenta para controlar a ocorrência da aspergilose aviária, e dada a importância desta micose em pingüins em cativeiro, o presente estudo objetivou avaliar a ação da desinfecção ambiental no controle de fungos do gênero *Aspergillus* spp. no ambiente de reabilitação do Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM).

MATERIAL E MÉTODOS

Durante dois anos foi avaliada a contaminação ambiental do CRAM por *Aspergillus* spp. através de colheitas de ar, isolamento e identificação de espécies. No segundo ano foi implementada uma rotina de desinfecção ambiental com um agente químico selecionado através de teste “in vitro”. Ao final do experimento foi realizada análise estatística para comparação da qualidade do ar do primeiro ano com o segundo ano, após estabelecida a rotina de desinfecção.

As amostras de ar foram colhidas através da técnica de plaqueamento, que consistiu em distribuir seis placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol no ambiente interno do CRAM em cada dia de coleta. Os plaqueamentos foram realizados duas vezes ao dia, dispondo-se três placas às 8h30min, da manhã (início do expediente) e as outras três às 11h30min, após a limpeza do local. As placas foram deixadas abertas por 15 minutos e após foram remetidas ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, para incubação à 25°C por até 7 dias com observação diária. As colônias foram avaliadas quanto à macromorfologia, segundo características do verso e anverso, e tempo de crescimento, e quanto à micromorfologia, através do exame direto com Lactofenol azul de algodão em lâmina sobreposta de lamínula. Microscopicamente, o material foi avaliado segundo a disposição de conídios, fiálides e formato dos conidióforos e das vesículas.

O teste “in vitro” dos desinfetantes foi realizado frente a 23 amostras de *Aspergillus* spp.: *A. fumigatus* (8), *A. niger* (8), *A. flavus* (6) e *A. terreus* (1), pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com NCCLS M-38. Foram utilizadas 12 placas de microdiluição (96 orifícios) estéreis, preenchidas com o inóculo fúngico e com os desinfetantes. Todas as amostras de *Aspergillus* spp. foram testadas em duplicata frente à três desinfetantes: iodóforo, cloreto de benzalcônio e digluconato de clorexidina.

Durante o segundo ano do estudo foi realizada diariamente a desinfecção parcial do Centro, que incluiu a limpeza do piso com o desinfetante selecionado (clorexidina) e, semanalmente, por fricção, a desinfecção geral, que incluiu toda a área interna utilizada para a recuperação dos animais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ano de experimento foram realizadas 31 colheitas, das quais foram obtidos 23 isolados de *Aspergillus* spp., sendo sete (30%) identificados como *A. fumigatus*, cinco (22%) *A. niger*, três (13%) *A. flavus*, dois (9%) *A. candidus*, dois (9%) *A. terreus*, dois (9%) *A. glaucus*, um (4%) *A. versicolor* e um (4%) *A. nidulans*. As espécies foram previamente identificadas no Setor de Micologia da Faculdade de Veterinária (UFPEL) e encaminhados ao Laboratório de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz (RJ) para confirmação. O grande número de isolados do gênero *Aspergillus* condiz com sua característica ubíqua, estando presente nos mais variados ambientes, podendo ser isolado do ar freqüentemente, o que é explicado pelo fato de uma única estrutura de esporulação ser capaz de liberar milhares de conídios no ar (LACAZ et al., 1998; BERCHIERI & MACARI, 2000; KEARNS & LOUDIS, 2003).

Uma vez que o processo de desinfecção seria realizado na presença de animais, os desinfetantes testados “in vitro” foram escolhidos devido a sua baixa toxicidade. O agente químico que obteve melhor resultado “in vitro” foi o digluconato de clorexidina, que apresentou eficácia frente a todos os isolados de *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*, no entanto, a amostra de *A. terreus* foi considerada resistente a todas as diluições testadas. O digluconato de clorexidina “in vitro” foi eficaz em concentrações bem menores que a indicada pelo fabricante, o que sugere sua ação efetiva no ambiente uma vez que “in loco” o produto sofre influência dos fatores externos, como temperatura, pH e matéria orgânica (MCDONNEL & RUSSEL, 1999).

Quanto à comparação da qualidade do ar entre os anos, o isolamento de *Aspergillus* spp. foi significativamente menor ($p=xxx$) no segundo ano na primeira colheita da manhã (08:30h) em relação ao ano inicial. Esta diminuição foi atribuída ao programa de desinfecção empregado, que conseguiu minimizar a proliferação fúngica durante o período crítico (noite), em que o CRAM permanecia fechado. Estudos semelhantes não foram encontrados na literatura consultada. Em contrapartida, nas colheitas das 11h30min não ocorreu redução do isolamento fúngico no segundo ano, provavelmente devido à ventilação natural utilizada no CRAM, que permite a recontaminação do ambiente. Isto já foi descrito anteriormente por Leenders et al. (1999), ao demonstrar que o ar externo pode ser considerado a maior fonte de infecção fúngica para ambientes internos.

CONCLUSÃO

A desinfecção ambiental com digluconato de clorexidina foi estatisticamente efetiva contra *Aspergillus* spp., reduzindo a concentração de conídios deste fungo nas instalações do CRAM, atuando como um importante fator de prevenção à aspergilose em pingüins mantidos no Centro para reabilitação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E., Aspergillosis in birds of prey. 2003. Disponível em <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>>. Acesso em: agosto de 2005.
- ANDREATTI FILHO, R.L. Enfermidades micóticas, In.: BERCHIERI JÚNIOR, A., MACARI, M. Doenças das aves. 1 ed. FACTA, Campinas – SP, p.369-375, 2000.
- BERCHIERI, A. J.; MACARI, M. Enfermidades Micóticas., **Doenças das Aves**. FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, São Paulo, 2000, p. 369 – 375.
- CARRASCO, L.; LIMA Jr., J. S.; HALFEN, D. C.; SALGUEIRO, F. J.; SANCHEZ-CORDÓN, P.; BECKER, G. Systemic Aspergillosis in the Oiled Magallanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.551-554, 2001.
- CLARKE, J.; KERRY, K. R.. Diseases and Parasites of penguins, **Korean Journal of Polar Research**. , 1993. v. 4 (2) p. 79-96.
- FOWLER, M; CUBAS, Z..Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals. **Iowa State University Press**, 2001.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R. Maternal transfer of anti-*Aspergillus* spp. Immunoglobulins in African Black-footed Penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, n.4, p.545-549, 1995.
- KEARNS, K. S.; LOUDIS B., Aspergillosis aviar., in Recent Advances in Avian Infectious Diseases, **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY (www.ivis.org), 2003; A1902.0903.ES
- LACAZ, C.D.S, PORTO, E., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. **Fungos, Actinomicetos e Algas: Guia para Identificação**. 7 ed., São Paulo: Sarvier FAPESP:, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. 6º ed. Sarvier. São Paulo – SP, p. 306, 1984.
- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- LEENDERS, A. P.; BELKUN, A. V.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A.; VERBRUGH, H. A., Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection, **Journal of clinical microbiology**,v.37, n.6, p. 1752-1757, 1999.
- MCDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Review**, v.12, n.1, p.147-179, 1999.
- OSÓRIO, L.G.; XAVIER, M.O.; CABANA, Â.L.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.M.; SOARES, M.P.; SCHRAMM, R.; LEITE, A.; SILVA-FILHO, R.P.; MEIRELES, M.C.A. Causas de mortalidade de pingüins em Centro de Recuperação de Animais Marinhos entre janeiro de 2004 e setembro de 2006. **In.: Xv Congresso de Iniciação Científica e VII Encontro de Pós Graduação, 2006**. CD-ROM, 2006
- KEARNS, K. S.; LOUDIS B., Aspergillosis aviar., in Recent Advances in Avian Infectious Diseases, **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY (www.ivis.org), 2003; A1902.0903.ES
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. 6º ed. Sarvier. São Paulo – SP, p. 306, 1984.

- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- REDIG, P.T.. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. In: Fowler, M.E. (ed): **Zoo & Wild Animal Medicine: Current therapy 3**. W B Saunders Inc., Denver, Colorado, 1993, cap.23, p.178-181.
- RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: principles and application**. p. 1000 – 1004, 1994.

AGRADECIMENTOS

CRAM – Centro de Recuperação de Animais Marinhos do Museu Oceanográfico “Prof. Eliézer de Carvalho Rios” da Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico