

A CHOCADDEIRA CONTAMINADA POR *Aspergillus fumigatus* COMO FONTE DE INFECCÃO PARA OS EMBRIÕES DE PINTOS¹

WILHELM BRADA²

Sinopse

Foram realizados experimentos com chocadeira contaminada por *Aspergillus fumigatus*. Conseguiu-se facilmente infectar os embriões e isolar o fungo. A desinfecção da incubadeira com formol a 2%, efetuada duas vezes, não se mostrou suficiente para evitar totalmente a infecção.

INTRODUÇÃO

A aspergilose é uma das primeiras micoses encontradas e descritas em aves. O agente etiológico foi isolado em 1850, recebendo o nome de *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1850.

O fungo afeta em primeiro lugar os pulmões e sacos aéreos de aves jovens, embora a literatura faça referências também a casos de aspergilose no sistema nervoso central (Huben 1958). A infecção e a disseminação da moléstia se dá antes de tudo pela inalação dos esporos do fungo presentes nos alimentos e nos alojamentos das aves.

As pesquisas nos últimos anos demonstraram que, independentemente das doenças infecciosas que se transmitem por via vertical, através do ovo, e por via horizontal, após a eclosão, outros micróbios, presentes no ar da chocadeira, podem atingir os ovos na incubadeira e infectá-los. Chute e Barden (1964) verificaram elevada mortalidade de embriões de pintos, relacionada com a presença de fungos no ar ambiente.

Em estudos anteriores (Chute & O'Meara 1958) foi demonstrado que, entre os diversos fungos isolados em pintos, *Aspergillus fumigatus* se mostrou um dos mais patogênicos.

O que nos levou a realizar este trabalho foi o fato de que, nos últimos anos, a incidência de aspergilose em pintos recém-nascidos aumentou sensivelmente. Assim, por exemplo, foi isolado por nós *A. fumigatus* em pintos de 3 dias de idade, procedentes de granjas localizadas em diferentes lugares, que receberam

pintos de 1 dia da mesma fonte. Encontramos também lesões de aspergilose em pintos de 3 dias, recebendo informações de que a mortalidade com os mesmos sintomas e lesões nos órgãos se processava a partir do primeiro dia de vida. A pesquisa foi realizada com o propósito de obter informações pessoais sobre o papel da chocadeira experimentalmente contaminada por *A. fumigatus* e as conseqüências decorrentes para os ovos nela incubados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas culturas da espécie *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1850, isoladas de pintos procedentes de uma granja com elevada mortalidade (25%). Com estas culturas em Sabouraud, contaminaram-se grãos de trigo, seguindo o método O'Meara (1959). Foram utilizadas duas chocadeiras da marca "Popular", elétricas, de 100 volts, com capacidade para 60 ovos. A temperatura e a umidade se mantinham em limites para incubação habitual. Uma incubadeira servia para os experimentos propriamente ditos e a outra para o controle. A idade dos ovos fecundados, de casca branca sem rachadura, variava entre 4 a 17 dias. Foram efetuados dois testes com trigo contaminado mantido na incubadeira, dois experimentos após afastamento do trigo e limpeza manual, e um teste após a desinfecção da chocadeira com formol a 2%.

Foram os resultados obtidos que se seguem.

RESULTADOS

Teste n.º 1 na chocadeira com trigo contaminado

Foram colocados na chocadeira 15 ovos embrionados com 6 a 7 dias de idade. No dia seguinte morreram dois embriões sem ser determinada a causa da morte por agente infeccioso.

¹ Recebido em 27 de maio de 1968 e aceito para publicação em 3 de julho de 1968.

Boletim Técnico n.º 74 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

² Biologista da Seção de Ornitopatologia do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26.

Após a permanência dos ovos por 14 a 16 dias na chocadeira, nasceram sete pintos, e seis morreram dentro da casca durante a eclosão. Os sete pintos nascidos foram imediatamente sacrificados, notando-se em seis deles lesões de aspergilose nos pulmões e sacos aéreos, tendo o fungo sido isolado de cada um deles. Um pinto não apresentou lesões de aspergilose, mas o fungo foi isolado dos pulmões, sacos aéreos, fígado e gema.

Os seis pintos encontrados mortos dentro da casca, revelaram pneumonia e aerocistite, tendo sido isolado *A. fumigatus* em todos eles.

As cascas dos ovos, tanto dos pintos nascidos como dos mortos, se apresentaram nove vezes macroscopicamente inalteradas; porém, quando trituradas e passadas em Sabouraud, revelaram crescimento de *Aspergillus fumigatus*. As cascas de quatro ovos mostraram manchas de coloração verde azulada, tanto na superfície como também no interior, particularmente embaixo da película da casca. A membrana se revelou espessa, de coloração cinza-escuro esverdeada, como demonstram as Figs. 1 e 2. O exame bacteriológico revelou o fungo em aprêço, tanto na superfície do ovo como na membrana.

Teste n.º 2 na chocadeira usada nas condições do Teste n.º 1

Foram colocados na chocadeira 14 ovos embrionados de 17 dias de idade aproximadamente. Após a permanência dos ovos por quatro dias na chocadeira nasceram oito pintos clinicamente saudáveis, tendo sido encontrados, dentro das cascas abertas de seis ovos, os embriões já evoluídos, porém mortos.

Tanto os pintos vivos, quando sacrificados no 1.º dia de vida, como também os pintos mortos, apresentaram lesões de aspergilose nos pulmões e sacos aéreos, tendo-se isolado o fungo em cada um dos animais.

Teste n.º 3 na mesma chocadeira; porém, com ligeira limpeza e afastamento do trigo contaminado

Foram colocados desta vez 16 ovos com quatro a cinco dias de incubação. Após a permanência por sete dias na chocadeira, morreram dois embriões não tendo sido determinada a causa da morte. Entre o 16.º e 17.º dias de incubação nasceram três pintos clinicamente normais e sem lesões patológicas nas vias respiratórias, tendo sido isolado *A. fumigatus* de dois desses pintos.

Após 18 dias de incubação, nasceram quatro pintos sem sintomas de doenças, revelando, porém lesões características de pneumonia e aerocistite micótica. De cada um destes pinto foi isolado o fungo

em questão. Sete pintos estavam mortos e presos dentro da casca já aberta, mostrando pneumonia nodular e aerocistite fibrinosa. O exame bacteriológico feito dos órgãos alterados positivou a infecção por *A. fumigatus*.

Teste n.º 4 na chocadeira usada nas condições do Teste n.º 3

Para este teste foram colocados na chocadeira 20 ovos com 15 dias de incubação. Dois dias depois morreram dois embriões sem ser identificada a "causa mortis". Entre os 6.º e 7.º dias de incubação nasceram sete pintos, dos quais dois manifestavam dispnéia acentuada e lesões nos pulmões e sacos aéreos. O exame bacteriológico revelou crescimento de *A. fumigatus*. Cinco pintos se apresentavam clinicamente normais e continuaram na chocadeira por mais sete dias, não revelando durante este período, nenhum sintoma de doença. Sacrificados no sétimo dia de vida mostraram, porém, lesões nos pulmões e sacos aéreos, representadas por granulomas e presença de hifas com reação inflamatória, além de células gigantes, demonstradas pelo exame histológico.

O exame bacteriológico confirmou o diagnóstico de aspergilose em estudo.

Os 11 embriões restantes, evoluídos, estavam mortos dentro das cascas, apresentando-se hemorrágicos com depósitos fibrinosos nos sacos aéreos e nódulos amarelos nos pulmões. De cada um destes pintos foi isolado *A. fumigatus*.

Teste n.º 5 na chocadeira desinfetada

Após o término do teste n.º 4 foi efetuada rigorosa limpeza da incubadeira e lavagem com formol a 2%. A chocadeira ficou vazia durante 15 dias e a desinfecção com formol foi repetida. 15 dias após a última desinfecção, foram nela colocados 18 ovos para incubação, os quais passaram a ser controlados diariamente pela ovoscopia. Destes ovos nasceram, após a incubação de 21 dias, 12 pintos. Dois embriões morreram durante a eclosão e quatro, embora evoluídos, não chegaram a romper a casca.

Os embriões mortos apresentaram congestão pulmonar, um embrião revelou áreas amareladas no fígado, em dois embriões encontramos congestão renal acompanhada de dilatação de uréteres chelos de sais de uratos, e um embrião apresentou focos pequenos de cor amarelada no coração. O exame histológico dos órgãos alterados demonstrou congestão pulmonar, extensa degeneração gordurosa do fígado, infiltração entre as fibras miocárdicas de tecido granulomatoso e gorduroso, degeneração hidrópica do epitélio dos tubos contornados. Pelo exame bacteriológico isolá-

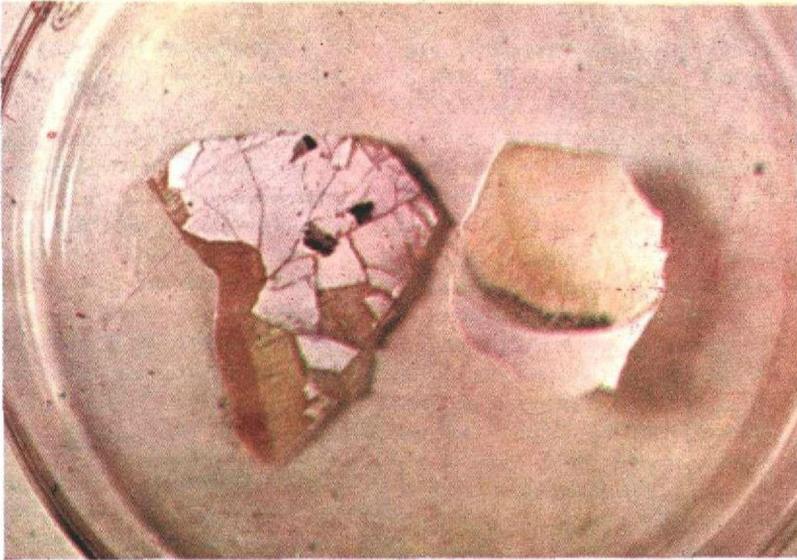


FIG. 1. *Aspergillus fumigatus* na superfície e na película da casca do ovo.



FIG. 2. *Aspergillus fumigatus* na película que foi tirada da casca do ovo.

nos somente em dois embriões *A. fumigatus* dos pulmões e dos sacos aéreos, enquanto nos outros quatro o exame foi negativo.

Dos 12 pintos nascidos, seis demonstraram após seis dias de permanência na chocadeira, retardamento do crescimento, sonolência, sem todavia apresentarem sintomas respiratórios. Sacrificados, mostravam órgãos macroscopicamente inalterados. O exame bacteriológico dos pulmões revelou, em dois animais, crescimento de *A. fumigatus*. Os outros seis pintos, mantidos na chocadeira por mais de 21 dias, se comportaram clinicamente normais durante toda a sua vida.

DISCUSSÃO

Entre 65 ovos fecundados e colocados na chocadeira contaminada, morreram pela infecção por *Aspergillus fumigatus* 32 embriões, enquanto na chocadeira para as testemunhas a incubação ocorreu sem acidente.

As perdas entre os embriões ocorreram independentemente da intensidade da contaminação e, já após o quarto dia da entrada na chocadeira, era possível identificar o fungo como causa da morte de embriões. A maioria morreu dentro da casca ou durante a eclosão no fim do período da incubação.

Dos 29 pintos que nasceram, dois apresentaram sintomas respiratórios associados com alterações nos pulmões e sacos aéreos; os demais 27 pintos eram clinicamente normais. Após o sacrifício, 25 dessas aves revelaram lesões nos pulmões e sacos aéreos, enquanto dois apresentavam os seus órgãos macroscopicamente inalterados. É digno de ser salientado que se conseguiu isolar o fungo não somente em animais com órgãos patologicamente alterados, como também em pintos sem lesões patológicas. Estas observações foram registradas também por Aller (1967) que, pelo exame cultural, isolou *A. fumigatus* dos órgãos respiratórios sem alterações micóticas.

Achamos proveitosos os resultados obtidos durante o teste na chocadeira desinfetada.

Apesar da desinfecção, morreram no fim da incubação seis embriões, sendo isolado o fungo em dois deles.

Se a morte dos outros quatro embriões foi causada também pela ação do fungo ou pela toxina por ele produzida, foge a nosso conhecimento.

Relacionados com este aspecto, devemos assinalar dois fatos: 1.º não encontramos outro agente infeccioso que pudesse responder pelas mortes em aprêço; 2.º a incubação e eclosão dos ovos galados testemunhas ocorreram sem acidente.

A literatura, todavia, nada registra sobre a toxicidade desta estirpe do fungo, embora haja suspeita de

que ele desenvolve toxinas. Carrl *et al.* (1955) conseguiram extrair de cereais contaminados por *A. fumigatus* uma substância que se mostrou tóxica para coelhos, bezerras e cavalos, provocando nestes animais, após a aplicação por via oral, lacrimejamento, depressão, dispnéia, congestão do fígado e congestão pulmonar e renal.

Os 12 pintos que nasceram no decorrer deste experimento não apresentaram sintomas de doença, demonstrando, porém, seis deles, no sétimo dia da permanência na incubadeira, retardamento do crescimento. Quando sacrificados, não revelaram lesões sugestivas de aspergilose. Apesar disso, foi isolado o fungo em dois deles. Os seis pintos restantes, mantidos mais de 21 dias dentro da chocadeira, se comportavam e evoluíam normalmente.

Os nossos resultados demonstraram, também, a importância da casca do ovo, como fonte de contaminação para o embrião, pois conseguimos isolar o fungo da casca macroscopicamente inalterada.

As providências a serem tomadas para se evitar a disseminação de doenças dentro da chocadeira variam muito. Kohler (1966) atribui grande importância ao ar puro, não somente na incubadeira mas também nos lugares adjacentes. Muitas vezes não se mostram satisfatórias a limpeza e desinfecção realizadas com os meios e maneiras habituais. Pela adaptação de filtros dentro da chocadeira e adjacências é possível reduzir sensivelmente a infecção e as perdas.

AGRADECIMENTOS

Consignamos os nossos agradecimentos ao Dr. Masao Goto, do Instituto Oswaldo Cruz, pela identificação do fungo, que foi realizada por intermédio do Dr. Jefferson Andrade dos Santos, Prof. Catedrático da Escola Fluminense de Veterinária, e ao Dr. Vicente Leite Xavier, Prof. Catedrático da Escola de Veterinária da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela valiosa colaboração dada na revisão do manuscrito. Os nossos agradecimentos ao Dr. Jürgen Dübener, Veterinário da Seção de Anatomia Patológica do IPEACS, pela ajuda na confecção das fotografias.

REFERÊNCIAS

- Aller, B. 1967. Fungi in the upper digestive and respiratory tract of hens (*Callus domesticus*). Brit. vet. J. 10:431-435.
- Carrl, W.T., Forgacs, J., Herring, A.S. & Mahland, G.B. 1955. Toxicity of *Aspergillus fumigatus*. Vet. Med. 50: 210-312.
- Chute, H.L. & O'Meara, D.C. 1958. Experimental fungus infection in chickens. Avian Dis. 2:154-166.
- Chute, H.L. & Barden, E. 1964. The fungus flora of chick bacteris. Avian Dis. 8:13-19.
- Hubben, K. 1958. Case Report — *Aspergillus* meningoencephalitis in turkeys and ducks. Avian Dis. 1:110-116.
- O'Meara, D.C. & Chute, H.L. 1959. Aspergillosis experimentally produced in hatching chicks. Avian Dis. 4:404-406.
- Kohler, H. 1966. Gedanken zur Bruthygiene. Berl. Münchn. tierärztl. Wschr. 14:265-268.

THE CONTAMINATED INCUBATOR AS A CAUSE OF *Aspergillus fumigatus*
INFECTION OF CHICK EMBRYOS

Experiments with by *Aspergillus fumigatus* contaminated incubator were made. The author obtained easily embryos infected and was able to isolate the fungus. A disinfection of the incubator with 2% formalin performed twice, was not sufficient to avoid completely the infection.