

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS DE AREIA-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

NAYADJALA TÁVITA ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO RETROSPECTIVO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS EM AVES
SILVESTRES E EXÓTICAS DIAGNOSTICADAS NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

AREIA-PB/2020

NAYADJALA TÁVITA ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO RETROSPECTIVO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS EM AVES
SILVESTRES E EXÓTICAS DIAGNOSTICADAS NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena

AREIA-PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

S237e Santos, Nayadjala Távita Alves dos.

Estudo retrospectivo das doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas diagnosticadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba / Nayadjala Távita Alves Dos Santos. - Areia, 2020. 53 f. : il.

Orientação: Ricardo Barbosa de Lucena.
Coorientação: Jeann Leal de Araújo.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Bactérias. 2. Fungos. 3. Protozoários. 4. Aspergillus sp. 5. Sacocystis sp. I. Lucena, Ricardo Barbosa de. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

NAYADJALA TÁVITA ALVES DO SANTOS

**ESTUDO RETROSPECTIVO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS EM AVES
SILVESTRES E EXÓTICAS DIAGNOSTICADAS NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

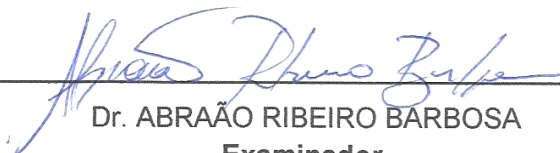
Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do Brejo
Paraibano.

APROVADA EM 20/02/2020

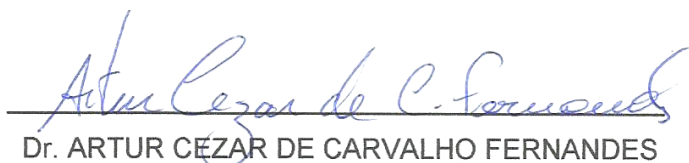
BANCA EXAMINADORA



Dr. RICARDO BARBOSA DE LUCENA
UFPB
Orientador



Dr. ABRAÃO RIBEIRO BARBOSA
Examinador



Dr. ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES
Examinador

Dedicatória

In memoriam:

Vovó Luzia e Vovó Gracinha.

À família:

Meus pais, Luzinete e Francisco,

Meus irmãos Luíngridy e Walysson,

À minha segunda família:

Rômulo, meu grande amor,

Natália, seu Helano e dona Ilka.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à Deus e nossa Senhora, por me dar suporte espiritual durante todos os momentos difíceis. A minha fé foi tudo o que tive muitas vezes, gratidão ao universo e aos espíritos do bem que estiveram ao meu lado durante os últimos dois anos.

Dedico este trabalho a minhas avós Luzia que sempre apoiou os estudos da família e partiu antes da graduação das netas, já dona Eugrécia dizia que eu era a neta mais “danada”, concordo plenamente, vou trilhar meu caminho e chegar cada vez mais longe, levar comigo o apoio e a história que deixastes, que para mim são inspiração e sinônimo de força e coragem.

Devo dedicar boa parte desta pesquisa e da minha caminhada rumo a Patologia ao professor, orientador, conselheiro e pesquisador Ricardo Barbosa, que me aceitou para esta jornada, chamada de mestrado, mesmo sabendo tão pouco sobre a minha pessoa em nível pessoal e profissional. Tenho certeza de que é um dos maiores pesquisadores do Brasil atualmente, não só pelo seu esforço em fazer pesquisa mesmo com tão poucos recursos, mas pelo seu caráter e dignidade diante de todas as dificuldades, minha eterna gratidão a essa mão estendida, jamais esquecerei. Ao professor Jeann pela co-orientações e paciência de ajudar-me nessa reta final.

Aos meus familiares a gratidão, não só pela ajuda na formação acadêmica, como também o apoio emocional e a compreensão diante da minha ausência em tantas datas importantes. Ao meu Pai Francisco, minha gratidão pela vida e ensinamentos, a minha Mãe Luzinete, agradeço pela criação e pelo exemplo de mãe, professora, mulher forte e por nunca deixar a “peteca” cair, mesmo quando tudo esteve extremamente difícil, obrigada por acreditar em mim desde o início.

A minha irmã Luíngridy pelo exemplo de pessoal e profissional, por toda ajuda quando necessário, apesar das inúmeras diferenças de personalidade, isso nunca me impediu de admirá-la, obrigada por tudo. Ao meu irmão Walysson agradeço o exemplo de irmão mais velho e consideração, que apesar da distância, nunca foi ausente, sempre torcendo pelas minhas vitórias, que esta seja apenas mais uma a se comemorar. As minhas tias Francineide e Expedita, meus primos, Mércia, Murilo e Monique, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus melhores amigos desde a infância para o resto da vida Ericles e Fernanda. Hoje somos profissionais e entendemos a importância que tivemos na construção de vida um do outro. Ainda em formação cremos que com o amadurecimento, um dia, iremos reunir as nossas famílias e contar belíssimas histórias do que já vivemos e do que ainda iremos viver até lá, gratidão pelo amor incondicional de irmãos, que essa união permaneça.

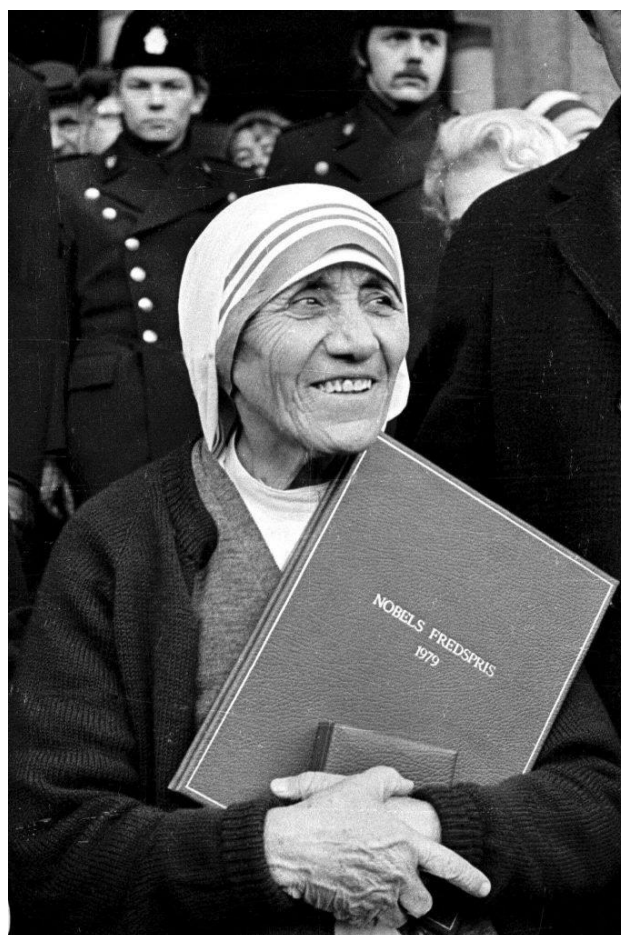
As minhas amigas de pós-graduação Mônica e Telma, o quão importantes foram vocês desde a minha chegada. Obrigada pelos ensinamentos profissionais e acima de tudo pessoais, sem vocês os dias seriam mais pesados e a construção de artigos e atividades seriam sombrios, vocês foram a luz do meu caminho durante o mestrado, gratidão por compartilhar esse sofrimento comigo (rs). Aos amigos que me receberam tão bem em Areia, Yasmim e Paulo, especialmente ao casal de anestesistas Maurílio e Kathryn, grandes amigos que pretendo levar para minha vida.

A minha segunda família, a família cearense, grata pelo apoio de sempre e por me receber nessa família tão grande e tão cheia de amor. Dona Ilka, Seu Helano, Natália, obrigada por todas as palavras e gestos de incentivo.

A Rômulo meu companheiro de vida e colega de profissão, me auxiliou e esteve ao meu lado desde a graduação. Minha eterna gratidão aos momentos bons e ruins que passamos juntos, ao fim dessa jornada pude perceber que mais importante do que as etapas que passamos é quem está ao nosso lado em todas essas etapas. Que em breve possamos nos lembrar de todas as batalhas que travamos para chegar à realização do nosso grande sonho profissional e construção da nossa família.

Não poderia deixar de mencionar meus animais de estimação, meus cães, Toby e Nino (*in memoriam*) que através da sua existência, inconscientemente me influenciaram nas minhas escolhas profissionais. Zoraide, por me acompanhar em boa parte da jornada da graduação e do mestrado, o motivo do meu amor por felinos.

Por fim, agradeço a Capes pela concessão das bolsas e apoio a pesquisa, bem como a Fapesq-PB pelos auxílios concedidos. Agradeço ao programa de pós-graduação, em especial ao secretário Jozenio, ao Hospital Veterinário-UFPB, as meninas que trabalham no hospital, Dona Gilma, Betânea, os recepcionistas, terceirizados, técnicos, estagiários e diretores, pois a junção de todos possibilita a realização de atendimentos, pesquisas e de uma grande e completa família que se renova a cada ano.



OSL99 OSLO (NORUEGA) 18/12/2015.- *Fotografía de archivo tomada el 12 de diciembre de 1979.* Fonte: EFE/Stringer

“Não é o quanto fazemos, mas quanto **amor** colocamos naquilo que fazemos.

Não é o quanto damos, mas quanto **amor** colocamos em dar.”

(Madre Teresa de Calcutá)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NAYADJALA TÁVITA ALVES DOS SANTOS- Nascida em Conceição-PB (1996), graduada em medicina veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande- UFCG (2018), campus Patos-PB. Aluna pelo Programa Voluntário de Iniciação Científica (2015-2016). Monitora Voluntária da disciplina Patologia Animal (2016.1-2016.2). Mestranda colaboradora com dois projetos de extensão- UFPB (2019).

RESUMO GERAL

A dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda as doenças infecciosas que acometeram as aves silvestres e exóticas entre os anos de 2013 e 2018 de acordo com o livro de necrópsias do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal da Paraíba-UFPB. Foram abordados os casos gerais de aves com diversas condições infecciosas diagnosticadas através de exame necroscópico, histopatologia, histoquímica e imuno-histoquímica. Divide as doenças infecciosas em bacterianas, fúngicas e causadas por protozoário, não sendo possível, muitas vezes, a classificação dos agentes envolvidos na enfermidade diagnosticada nos espécimes estudados. Em um total de 189 amostras de tecidos oriundos de necrópsia ou biópsia coletados em aves silvestres e exóticas. Desses animais 50 (26,45%) foram identificados como doenças infecciosas. As doenças bacterianas foram as mais prevalentes representando 26 (52%) casos, seguido dos fungos com 11 (22%) aves acometidas e por último os protozoários com 2 (4%) do total de aves com diagnóstico de enfermidade infecciosa. As espécies mais acometidas foram Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758), Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*, Linnaeus, 1758), Gavião-asa-de-telha (*Parabuteo unicinctus*, Temminck, 1824) e canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola*, Linnaeus, 1766), respectivamente. Este levantamento confirma a necessidade de investigação de patógenos de origem infecciosa, sejam eles bacterianos, fúngicos ou protozoários em rapinantes, passeriformes e psitacíformes, pois estes podem ser acometidos, bem como representar uma fonte de infecção de forma direta ou indiretamente. Já o segundo capítulo aborda os casos de aspergilose, uma doença fúngica que acometeu várias espécies descritas no levantamento, bem como suas caracterizações patológicas e dados epidemiológicos dos espécimes acometidos. Em passeriformes a enfermidade apresentou-se na forma cutânea e sistêmica, já em psitacíformes a forma pulmonar e a sistêmica foram as principais, padrão que se repete quando se trata dos falconiformes (Bonaparte, 1831). Os principais achados clínicos foram dispneia, má digestibilidade de grãos e desenvolvimento de lesões granulomatosas seguida por morte súbita. Na necrópsia as principais alterações foram circulatórias, incluindo hemorragia, edema e congestão em pulmão, fígado e baço, lesões granulomatosas em órgãos parenquimatosos e na pele. Na histopatologia os principais achados foram aerosaculite granulomatosa, pneumonia granulomatosa, granulomas hepáticos e foliculite fúngica. Em dois casos da *A. aestiva* foram realizados

isolamentos microbiológicos positivos para *Aspergillus sp.* Em outro caso da *Fregata magnificens* (Mathews, 1914) foi feito exame de imuno-histoquímica, que marcou positivamente para o anticorpo *anti-aspergillus e anti-zigomicetos*. Nos demais casos a confirmação se deu através do exame histoquímico, no qual as hifas septadas do agente foram marcadas positivamente com as colorações de ácido periódico de schiff- PAS e metanamina de prata de *Gomori-Grocott*. Nosso estudo afirma a possibilidade de infecção por *Aspergillus sp.* em *Amazona aestiva*, *Parabuteo unicinctus*, *Sporophila nigricollis* (Vieillot, 1823), *Crotophaga ani* (Linnaeus, 1758) e *Fregata magnificens*. Apesar de serem espécies diferentes apresentaram patogenia e lesões patológicas semelhantes, sendo possível estabelecer um padrão de apresentação clínica e patológica da doença em aves silvestres no nordeste do Brasil.

Palavras Chave: Bactérias. Fungos. Protozoários. *Aspergillus sp.* *Sarcocystis sp.*

ABSTRACT

The dissertation was divided into two chapters. The first chapter addresses the infectious diseases that affected wild and exotic birds between the years 2013 and 2018 according to the autopsy book of the Veterinary Pathology Laboratory (LPV) of the Federal University of Paraíba-UFPB. The general cases of birds with various infectious conditions diagnosed through necroscopic examination, histopathology, histochemistry and immunohistochemistry. It divides infectious diseases into bacterial, fungal and caused by protozoa, and it is often not possible to classify the agents involved in the disease diagnosed in the studied specimens. In a total of 189 tissue samples from necropsy or biopsy collected from wild and exotic birds. Of these animals, 50 (26.45%) were infectious diseases. Bacterial diseases were the most prevalent representing 26 (52%) cases, followed by fungi with 11 (22%) affected birds and lastly protozoa with 2 (4%) of the total number of birds diagnosed with infectious disease. The most affected species were Papagaio-real (*Amazona aestiva*), Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), Hawk-winged Parabuteo (*Parabuteo unicinctus*) and Canary-of-land (*Sicalis flaveola*), respectively. This survey confirms the need to investigate pathogens of infectious origin, whether they are bacterial, fungal or protozoan in prey, passerines and psittaciforms, as these can be affected, as well as representing a source of infection directly or indirectly. The second chapter deals with cases of aspergillosis, a fungal disease that affected several species described in the survey, as well as their pathological characterizations and epidemiological data of the affected specimens. In passerines, the disease presented in cutaneous and systemic form, whereas in parrots the pulmonary and systemic forms were the main ones, a pattern that is repeated when it comes to falconiforms. The main clinical findings were dyspnea, poor digestibility of grains and the development of granulomatous lesions followed by sudden death. At necropsy, the main changes were circulatory, including hemorrhage, edema and congestion in the lung, liver and spleen, granulomatous lesions in parenchymal organs and in the skin. In histopathology, the main findings were granulomatous aerosaculitis, granulomatous pneumonia, liver granulomas and fungal folliculitis. In two cases of *A. aestiva*, positive microbiological isolations for aspergillus were performed. In another case of *F. magnificens*, immunohistochemistry was performed, which was positive for the anti-aspergillus and anti-zygomycete antibody. In the other cases, confirmation was

made through histochemical examination, in which the agent's septa hyphae were positively marked with the stains of periodic acid from schiff-PAS and silver methanamine from Gomori-Grocott. Our study confirms the possibility of infection by *Aspergillus* sp in *Amazona aestiva*, *Parabuteo unicinctus*, *Sporophila nigricollis*, *Crotophaga ani* and *Fregata magnificens*. Despite being different species, they presented similar pathogenesis and pathological lesions, making it possible to establish a pattern of clinical and pathological presentation of the disease in wild birds in northeastern Brazil.

Key words: Bacteria. Fungi. Protozoa. *Aspergillus* sp. *Sarcocystis* sp.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I- Quadro 1. Distribuição de necrópsias em aves silvestres e exóticas diagnosticadas com doença infecciosa, realizadas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil, de acordo com a espécie da ave.....**28**

Quadro 2. Métodos utilizados para diagnosticar doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, entre os anos de 2013 e 2018.....**29**

CAPÍTULO II- Tabela 1. Características clínicas, doenças concomitantes e distribuição das lesões em aves silvestres diagnosticadas com aspergilose de 2013 a 2019 no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal da Paraíba, Brasil.....**49**

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I- Figura 1. Aspectos macroscópicos e microscópicos da aspergilose em aves silvestres e exóticas na Paraíba. **(A)** Macroscopia de fígado difusamente pálido. Aspergilose e parasitismo secundário em tecido hepático de *Amazona aestiva*. **(B)** Tecido hepático com marcação imuno-histoquímica *anti-Aspergillus* positiva em cor marrom. Aspergilose em *Amazona aestiva*. Obj. 40x. **(C)** Múltiplos nódulos de aspecto lamelar cor creme distribuídos na serosa do inglúvio. Granuloma aspergilósico em inglúvio de *Parabuteo unicinctus*. **(D)** Imuno-histoquímica *anti-Aspergillus*, aplicada em tecido de inglúvio de um *Parabuteo unicinctus*, com marcação positiva em marrom das hifas fúngicas filamentosas septadas de ângulo agudo. Obj. 100x.....30

Figura 2. Aspectos macroscópicos e microscópicos do granuloma aspergilósico em aves silvestres e exóticas na Paraíba. **(A)** Nódulo cutâneo em membro pélvico de *Crotophaga ani*, de coloração esbranquiçada e circunscrito (seta). **(B)** Imuno-histoquímica *anti-Aspergillus* que marcou positivamente em marrom, evidenciando as hifas de *Aspergillus sp.* no tecido de nódulo em membro pélvico de *Crotophaga ani*. Método da espresavidina-peroxidase, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB). Obj. 100x. **(C)** Nódulo cutâneo na região dorsal ao bico de *Sporophila nigricollis* medindo 1,3 cm, com aspecto crostoso e enegrecido, com áreas multifocais esbranquiçadas e amareladas. **(D)** Marcação histoquímica evidenciando hifas septadas em ângulo agudo marcadas de magenta em nódulo cutâneo em um *Sporophila nigricollis*, com morfologia semelhante a *Aspergillus sp.* Ácido Periódico de Schiff (PAS). Obj. 20x.....31

Figura 3. Aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões causadas por doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas na Paraíba. **(A)** Macroscopia da região de esôfago e inglúvio onde é possível notar a perfuração por anzol na área de transição (seta preta) e acentuada hiperemia dos tecidos adjacentes à perfuração, com pequenas úlceras na mucosa do inglúvio. Ingluvite e esofagite secundárias a perfuração. Aspergilose e Zygomycose em uma *Fregata magnificens*. **(B)** Imuno-histoquímica evidenciando hifas filamentosas e septadas em ângulo agudo de cor marrom, circundando as áreas necróticas do tecido digestivo. Houve a infecção e disseminação concomitante de duas espécies de fungos na área da lesão esofágica e inglúvio,

marcados com anticorpos *anti-Zygomycetos* e *anti-Aspergillus sp.* em *Fregata magnificens*. Obj.

100x.....32

Figura 4. Aspectos microscópicos das lesões causadas por protozoário em um *Turdus rufiventris*. **(A)** Corte longitudinal do intestino delgado, demonstrando enterite eosinofílica e necrosante multifocal a coalescente e acentuada em corte, associada a inúmeros merozoítos de *Sarcocystis* sp. Hematoxilina e Eosina (HE). Obj. 10x. **(B)** Presença de merozoítos distribuídos multifocalmente nas camadas musculares do pró-ventrículo, evidenciando uma moderada pró-ventriculite associada a múltiplos merozoítos de *Sarcocystis* sp. Hematoxilina e Eosina (HE). Obj. 10x. **(C)** Merozoíto de *Sarcocystes* sp. em camada muscular de ventrículo, entremeando o tecido muscular. Hematoxilina e Eosina (HE) Obj. 40x. **(D)** Necrose das fibras do músculo esquelético associada a infiltrado inflamatório composto por eosinófilos, em menor quantidade, linfócitos, plasmócitos e macrófagos com merozoítos de *Sarcystis* sp. livres no músculo esquelético peitoral. Hematoxilina e Eosina (HE). Obj. 40x.....33

Chapter II- Figure 1. Macroscopic aspects of the infection by *Aspergillus sp.* in wild and exotic birds in northeastern Brazil. **A.** *Amazona aestiva* lung with bilateral hemorrhagic extensive focal area and diffusely swollen. **B.** Formation of rounded nodules in *Parabuteo unicinctus* in different diameters, ranging from cream to whitish on the pericardium (white arrow), with adherence to the cervical air sac. **C.** Final portion of the esophagus and the crop of *Parabuteo unicinctus* diffusely hyperemic, presenting numerous nodules with a lamellar aspect of cream color, ranging from 0.2 to 1 cm, distributed multifocally on the surface of these organs, which deepened at cut. **D.** Aspergillous granuloma in *Sporophila nigricollis* characterized by nodulation measuring 1.3 cm, rounded, circumscribed, firm and adhered to the orbital region, dorsal to the beak. **E.** *Fregata magnificens*. Lung area with yellowish, friable mass attached unilaterally to the pulmonary pleura. **F.** *Fregata magnificens*. Esophageal and crop region with perforation secondary to fishhook, the mucosa has blackened multifocal areas and small ulcerations..... 50

Figure 2. Microscopic aspects of the infection by *Aspergillus sp.* in wild and exotic birds in northeastern Brazil. **A.** Fragment of aspergillous granuloma with extensive areas of necrosis and multifocal elongated and septated fungal hyphae associated with moderated mononuclear inflammation. *Periodic acid-Schiff (PAS)*. 40x. **B.** Aspergillous nodule - presents a large concentration of elongated and septated fungal hyphae in an acute angle. *Gomori-Grocott*. 20x **C.** Fungal hepatitis associated with secondary parasitism, evidenced by the presence of septated hyphae interspersing the mononuclear inflammation and parasitic forms of *Capillaria hepatica*. Hematoxylin and Eosin. **D.** Positive immunohistochemical staining for *Aspergillus sp.* in the crop region. Counter-staining with Harris Hematoxylin. 40x.....51

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
Capítulo 1	16
“Doenças Infecciosas em Aves Silvestres e Exóticas na Paraíba”	16
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados e Discussão	21
Conclusão	25
Referências	25
ANEXO I	30
ANEXO I (Continuação).....	31
ANEXO I (Continuação).....	32
ANEXO I (Continuação).....	33
Capítulo 2	34
“Aspergilose em Aves Silvestres No Nordeste Do Brasil”	34
INTRODUCTION	36
MATERIAL AND METHODS	37
RESULTS.....	38
DISCUSSION.....	42
REFERENCES	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A classe das aves se originara dos répteis na cadeia evolutiva e pertence ao filo chordata subfilo vertebrata. (KARDONG, 2016). Os passeriformes são divididos em duas subordens de acordo com o seu aparelho vocal, a seringe. São catalogadas em todo o mundo mais de 1000 espécies e a maior parte delas pode ser encontrada nas regiões neotropicais, como a Amazônia brasileira (SANCHES; GODOY, 2014). Da ordem Piciformes se destacam os Ramphastidae, que são representados pelos tucanos e araçarís. São aves frugívoras e faunívoras, também não possuem ceco. Os tucanos são animais maiores e os araçarís menores, e ambos possuem um papel representativo na natureza que é a dispersão de sementes, seja por meio de regurgitação ou defecação. (DISLICH, 2014).

A ordem Psittaciforme é composta pelas aves da família Psittacidae constituída pelas araras, papagaios, periquitos e maritacas e as aves da família Cacatuidae que é representada pelas cacatuas e calopsitas. O grande crescimento no número desses animais criados em cativeiro no Brasil se deve a sua natureza sociável e a capacidade de imitar sons, bem como a adaptação dessas espécies a reprodução em cativeiro (GRESPLAN; RASO, 2014). Os rapinantes pertencem as ordens Accipitriformes, Falconiformes e Strigiformes, que incluem gaviões, falcões, corujas entre outras espécies que no Brasil somam 89 no total. Esses animais são frequentemente criados para fins de falcoaria, sendo assim, o atendimento clínico cada vez mais comum, e o aumento da incidência de doenças infecciosas acompanha esse crescimento (JOPPERT, 2014).

As aves que são mantidas em cativeiro, em geral, desenvolvem predisposições a enfermidades de caráter infeccioso devido à má qualidade do ar inalado, acúmulo de patógenos em ambientes fechados e a falta de raios solares, que tende a diminuir a resistência imunológica do animal e causar enfermidades respiratórias relativamente comuns. A mais comum de sistema respiratório é *Aspergillus sp.* e bactérias diversas, sejam elas de origem primária ou bacteremias (SANTOS et al, 2008).

Os *Aspergillus sp.* pertencem a classe *Eurotiomycetes* e ordem *Eurotiales*, são da família *Trichocomaceae* que também engloba o gênero de fungos *penicillium*, juntos, formam uma importante família responsável pela formação de bolores. São fungos

filamentosos e septados com aspecto hialino. Podem ser encontrados nos mais variados ambientes, solos, água e em matéria orgânica em decomposição, portanto é considerado onipresente (DESOUBEAUX; CRAY, 2018). O *Aspergillus fumigatus* é o principal causador da doença granulomatosa pulmonar, sistêmica e cutânea em aves silvestres, podendo representar até 30% das mortes de aves em cativeiro (XAVIER, 2014). É o principal agente causador de doença clínica em aves, ocasionalmente, nesta espécie, pode haver infecção pulmonar por *A. flavius*, *A. niger* e *A. terreus* (DESOUBEAUX; CRAY, 2018).

As bactérias, fungos, vírus e protozoários são exemplos de agentes infecciosos capazes de causar doença clínica e assintomática em aves silvestres e exóticas, essas aves podem desenvolver uma gama de enfermidades. O estudo dessas enfermidades é de suma importância, uma vez que evitar a disseminação dessas doenças é fundamental, tanto para o controle de patógenos nas próprias aves, como para evitar a infecção e propagação em casos de zoonoses. As aves podem ser consideradas reservatório dessas enfermidades, porém em alguns casos pode desenvolver a enfermidade e se tornar um indivíduo sintomático (GARGIULO, 2018).

REFERÊNCIAS

- DESOUTBEAUX, G.; Cray, C. Animal Models of Aspergillosis. **Comparative Medicine**. 68 (2): 109-123, 2018.
- DISLICH, M. Psiformes (Tucanos, Araçaris e Pica-paus). in> **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R., CATÃODIAS, J. L. 2 Ed. São Paulo. Roca, 2014.
- GARGIULO, A., Fioretti, A., Russo, T. P., Varriale, L., Rampa, L., Paone, S. & Dipineto, L. Occurrence of enteropathogenic bacteria in birds of prey in Italy. **Letters in applied microbiology**. 66(3), 202-206, 2018.
- GRESPLAN, A; RASO, T. F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas) in> **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R., CATÃODIAS, J. L. 2 Ed. São Paulo. Roca, 2014.
- JOPPERT, A. M. Accipitriformes, Falconiformes e Strigiformes (Gaviões, Águias, Falcões e Corujas) in> **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R., CATÃODIAS, J. L. 2 Ed. São Paulo. Roca, 2014.
- KARDONG, K. V. **Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução**. 7 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2016.
- SANCHES, T. C; GODOY, S. N. Passeriformes (Canário, Sabiá, Pássaro-preto e Trinca-ferro) in> **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R., CATÃODIAS, J. L. 2 Ed. São Paulo. Roca, 2014.
- SANTOS, G. G.C. et al. Doenças de aves selvagens diagnosticadas na Universidade Federal do Paraná (2003-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2008.
- XAVIER, M. O; MADRID, I. M. Doenças Fúngicas em Aves. in> **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R., CATÃODIAS, J. L. 2 Ed. São Paulo. Roca, 2014.

Capítulo 1

“Doenças Infecciosas em Aves Silvestres e Exóticas na Paraíba”

Este artigo foi submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira-PVB com fator de impacto 0,362 e Qualis A2.

Doenças Infecciosas em Aves Silvestres e Exóticas na Paraíba

¹Nayadjala T. A. Santos¹, Telma S. Lima², Mônica S. Sousa³, Rômulo F. F. Dias¹, ,
Harlan Hallamys de Lima Nascimento¹, Glaucia Denise Kommers¹, Jeann L. Araújo¹,
Ricardo B. Lucena^{1*}

ABSTRACT- Santos, N. T. A., Lima, T. S., Sousa, M. S., Dias, R. F. F., Araújo, J. L., Lucena R. B. 2020. **Infectious Diseases in Wild and Exotic Birds in Paraíba.** Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, 12, Rod. Pb-079, Areia - PB, Brasil, CEP 58397-000. E mail: lucena.rb@gmail.com

Abstract- Wild and exotic birds are responsible for the zoonotic cycle of several infectious diseases. Wild birds, in turn, have the role of reservoir of the most varied infectious agents in nature, when in contact with domestic animals or humans they can spread the disease, becoming fundamental in the cycle of some diseases. The cases of infectious diseases diagnosed in Paraíba between the years 2013 and 2018 are described. In a total of 189 tissue samples from necropsy or biopsy collected in wild and exotic birds. Of these animals, 50 (26.45%) were infectious diseases. Bacterial diseases were the most prevalent representing 26 (52%) cases, followed by fungi with 11 (22%) affected birds and lastly protozoa with 2 (4%) of the total number of birds diagnosed with infectious disease. The most affected species were Papagaio-real (*Amazona aestiva*), Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), Hawk-winged Parabuteo (*Parabuteo unicinctus*) and Canary-of-the-land (*Sicalis flaveola*), respectively. The higher occurrence of bacterial diseases results from the cases presenting as a disease secondary

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 12, Rod. Pb-079, Areia - PB, Brasil, CEP 58397-000., nayadjalat@gmail.com, romuloffdias@gmail.com, lealjeann@gmail.com. E mail para correspondência: lucena.rb@gmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n
Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP: 52171-900. Brasil.
telmasousava@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Avenida Universitária, s/n - Jatobá, Patos - PB, 58708-110. monica_shinneider@hotmail.com

to a debilitating condition, such as trauma and aspiration of content for the respiratory tract, sometimes it was not possible to classify the genus and species involved. While fungal diseases stood out in chronic aspergillosis in several tissues, these were primary and secondary and most often caused by management failures and various stresses. The other fungi were represented by yeasts suggestive of *Candida* sp. Diseases caused by protozoa were limited to the presence of *Sarcocystis* sp in tissues of two birds. The first bird, the Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), had a direct relationship with cardio-respiratory symptoms and its death, as it presented the cystic forms of the protozoan in the myocardium causing an eosinophilic myocarditis by *Sarcocystis* sp. In another case, it was considered a necropsy finding, since the death of the infected bird was not associated with the presence of merozoites in the tissues of the orange thrush (*Turdus rufiventris*), where there was protozoan in the pectoral skeletal muscle. This survey confirms the need to investigate pathogens of infectious origin, whether they are bacterial, fungal or protozoan in prey, passerines and psittaciforms, as these can be affected, as well as representing a source of infection directly or indirectly.

Index Terms: Bacteria; Fungi; Protozoa; Aspergillosis. *Sarcocystis* sp., Histopathological diagnosis

Resumo- As aves silvestres e exóticas são responsáveis pelo ciclo zoonótico de diversas doenças infecciosas. As aves silvestres por sua vez, tem o papel de reservatório dos mais variados agentes infecciosos na natureza, quando em contato com animais domésticos ou humanos podem disseminar a enfermidade, se tornando fundamental no ciclo de algumas doenças. No presente estudo descreve-se os casos de doenças infecciosas diagnosticadas na Paraíba entre os anos de 2013 e 2018. Em um total de 189 aves silvestres e exóticas oriundas de necrópsia ou tecido coletado de biopsia. Desses animais 50 (26,45%) aves foram diagnosticadas com doenças infecciosas. As doenças bacterianas foram as mais prevalentes representando 26 (52%) casos, seguido dos fungos com 11 (22%) aves acometidas e por último os protozoários com 2 (4%) do total de aves com diagnóstico de enfermidade infecciosa. As espécies mais acometidas foram Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), Gavião-asa-de-telha (*Parabuteo unicinctus*) e Canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola*), respectivamente. A ocorrência maior de doenças bacterianas decorre de os casos apresentarem-se como uma doença secundária a um quadro debilitante, como por exemplo, traumas e aspiração de conteúdo para o trato respiratório. Por vezes não foi

possível uma classificação de gênero e espécie do agente patogênico envolvidos. Dentre as fúngicas destacou-se quadros crônicos de aspergilose em diversos tecidos, estes foram primários e secundários e na maioria das vezes causados por falhas no manejo e estresses diversos. As demais fúngicas foram representadas por leveduras sugestivas de *Candida sp.* As enfermidades causadas por protozoários se limitaram a presença de *Sarcocystis sp.* em tecidos de duas aves. A primeira ave, o Maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), apresentou uma relação direta com a sintomatologia cardio-respiratória e seu óbito, pois apresentou as formas císticas do protozoário no miocárdio causando uma miocardite eosinofílica por *Sarcocystis sp.* Em um outro caso foi disseminada, contando com a presença dos merozoítos no pró-ventrículo, ventrículo, músculo estriado esquelético peitoral e músculo estriado cardíaco do sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*). Este levantamento confirma a necessidade de investigação de patógenos de origem infecciosa, sejam eles bacterianos, fúngicos ou protozoários em rapinantes, passeriformes e psitacíformes, pois estes podem ser acometidos, bem como representar uma fonte de infecção de forma direta ou indiretamente.

Termos de indexação: Bactérias; Fungos; Protozoários; Aspergilose. *Sarcocystis sp.*, diagnóstico histopatológico

Introdução

A infecção em aves é amplamente estudada a fim de esclarecer quais agentes estão envolvidos na invasão dos tecidos, suas reações, sintomas e a capacidade desses organismos de se disseminar para outras aves, mamíferos e humanos. Em um estudo realizado por Seyedmousavi e colaboradores (2015), envolvendo animais e humanos, concluiu-se que além do papel de reservatório que as aves desempenham, existe um papel de grande importância dentro do contexto de zoonoses, representando perfis de resistência de diferentes antimicrobianos, sendo responsáveis por impactos diretos e indiretos na saúde pública.

As bactérias, fungos, vírus e protozoários são exemplos de agentes que tem capacidade patogênica, podendo desenvolver uma gama de enfermidades nas mais variadas espécies de aves silvestres e exóticas. Evitar a ocorrência e disseminação dessas doenças é fundamental, uma vez que muitas delas não tem tratamento. As aves podem ser consideradas reservatório dessas enfermidades, porém em alguns casos pode desenvolver a enfermidade e se tornar um indivíduo sintomático (Gargiulo et al, 2018).

As doenças bacterianas são de grande importância devido à alta morbidade e muitas vezes alta mortalidade de aves silvestres, mantidas ou não em cativeiro. As aves de vida livre são tidas como reservatório de diversas doenças, entre elas as zoonóticas, por isso são alvo de diversos levantamentos afim de diagnosticar quais agente infecciosos possuem a capacidade se manter nesses animais e se disseminar de forma indireta ou direta, causando danos a outras aves e a espécie humana (Gargiulo et al, 2018).

As doenças fúngicas são recorrentes em animais domésticos e silvestres, por estar presente nos mais variados ambientes é de fácil disseminação e como agente oportunista pode aproveitar-se dos diversos fatores que podem levar a debilidade da imunidade nos animais. Pode apresentar-se como doença primária, porém na maioria das vezes é diagnosticada como secundária a enfermidades imunossupressoras. Pode-se destacar a aspergilose, criptococose, candidíase, micotoxicoses, entre outras que podem causar lesões significativas e de fácil disseminação em ambientes com manejo inadequado.

Entre os parasitas, *Sarcocystis spp*, destaca-se com um protozoário intracelular que pode se multiplicar de forma assexuada nas células endoteliais no músculo estriado, resultando em miosite eosinofílica (Gjerde et al. 2018). O diagnóstico morfológico é possível através da identificação do protozoário nos tecidos (El-Morsey et al. 2013, Prakas et al. 2018).

Objetiva-se com o presente estudo, identificar as principais doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas no Estado da Paraíba, bem como descrever os aspectos macroscópicos e histopatológicos das diferentes apresentações dessas doenças.

Material e Métodos

Foram revisados os registros de necropsia e biópsia realizadas em aves silvestres e exóticas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal da Paraíba (LPV/UFPB) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2018. Essas aves haviam sido apreendidas do tráfico de animais e remetidas a partir de centros de triagens ou conservacionistas, zoológico.

A partir dos registros, foram identificados os casos de doenças infecciosas classificadas em bacterianas, fúngicas e causadas por protozoário. Sendo considerados todos os casos em que foram realizadas avaliações macroscópica e histopatológica, além

de outros exames complementares, como isolamento microbiológico, histoquímicos com ácido periódico de Schiff (PAS) e técnica de metenamina nitrato de prata de Grocott (GMS), ou imuno-histoquímica. Foram computadas informações relativas ao método de diagnóstico, a idade e o sexo das aves, assim como os aspectos epidemiológicos.

Resultados e Discussão

Durante os seis anos do estudo (entre 2013 e 2018) um total de 189 aves de vida livre ou exóticas foram remetidas para necropsia ou biópsia. Destas, em 50 (26,45%) aves foram identificadas doenças infecciosas. As doenças bacterianas foram as mais prevalentes, compreendendo 26 (52%) casos, seguido por infecções fúngicas, com 11 (22%) casos e por último infecções por protozoários, com duas (4%) aves acometidas. Foram contabilizadas 12 espécies de aves acometidas, conforme a Quadro 1.

No presente estudo, as doenças bacterianas responderam por mais da metade dos casos de doenças infecciosas nas aves. As infecções bacterianas em aves silvestres são recorrentes, especialmente as infecções por *Escherichia coli* intestinais e extra-intestinais (Borges et al. 2017, Konicek et al. 2016). Nesse sentido, o tráfico de aves pode ser uma forma de difusão de *E. coli*. Isso ocorre devido as aves se comportarem como reservatórios para essas bactérias. Essas aves podem eliminar as bactérias com as fezes de forma intermitente por meses ou anos, transmitindo esse patógeno no ambiente e colocando em risco a saúde humana e das aves (Borges et al. 2017). Acredita-se que as principais formas de transmissão foram decorrentes do ambiente e falhas no manejo, levando em consideração que conviviam muitas vezes separados de outras espécimes antes do tráfico da apreensão, e quando juntas, em ambiente insalubre, sob estresse, ocorreu a alta transmissão.

A infecção por *E. coli* foi a doença bacteriana mais recorrente, semelhante a outros levantamentos (Konicek et al. 2016). As infecções extra-intestinais causadas pela bactéria *Escherichia coli* podem atingir o sistema renal, reprodutor, nervoso, especialmente em animais jovens e ganhar o sistema circulatório se distribuindo para os demais órgãos (Borges et al. 2017) como nos papagaios diagnosticados com granulomas hepáticos causados pela bactéria. Tratava-se de uma infecção massiva com apresentações clínicas e patológicas semelhantes. As aves apresentaram coligranulomas hepáticos multifocais, esbranquiçadas e na histopatologia observou-se necrose central e

infiltrado inflamatório circundando os exemplares bacterianos que se distribuíam próximos as formações granulomatosas.

As infecções por fungos acometeram o pulmão e sacos aéreos em todas as espécies diagnosticadas, mas envolveram também outros sistemas, demonstrando a capacidade de propagação do agente fúngico, já que as hifas fúngicas foram encontradas nos mais variados tecidos. A aspergilose foi a infecção mais diagnosticada, seguida de suspeitas de candidíase pulmonar em gavião-relógio (*Micrastur semitorquatus*) em ambas, deu-se o diagnóstico através de exames histoquímicos, na aspergilose foi possível realizar isolamento da maioria dos casos e realizar imuno-histoquímica.

Aspergillus sp acometeu papagaios (*Amazona aestiva*), gaviões-asa-de-telha (*Parabuteo unicinctus*), papa-capim (*Sporophila nigracollis*), anu-preto (*Crotophaga ani*) e fragata (*Fregata magnificens*). Nos casos confirmados de *Aspergillus sp.*, os órgãos acometidos incluem pulmão, coração, fígado, baço, rins e pele e muitas vezes esses órgãos são severamente afetados pela infiltração dos conídios, lesões circulatórias e inflamatórias, semelhante a outros relatos (Latge, 1999). Em todas as aves do presente estudo foram observadas lesões granulomatosas, com a presença das hifas septadas mais bem evidenciadas em colorações histoquímicas de PAS e GMS, semelhante a achados já descritos (Da Paixao et al. 2004) em avestruz (*Struthio camelus*) e em outras espécies de animais (Desoubeaux & Cray, 2018).

Os papagaios, com três casos, se destacaram com o maior número de espécimes acometidos por infecções fúngicas. O diagnóstico foi definido através da observação de lesões macroscópicas e microscópicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas. Em um indivíduo, macroscopicamente, havia congestão pulmonar e palidez hepática (Fig. 1A). Histologicamente houve a proliferação de hifas no fígado, associadas à inflamação mista (heterófilos, macrófagos e linfócitos), caracterizando uma hepatite fúngica severa. Além disso, entremeando o parênquima hepático foram evidenciados ovos arredondados a ovalados, com cápsula estriada e opérculo bipolar não protuso, semelhantes a *Capillaria hepática*. Essas áreas apresentavam necrose e eram circundadas por processo inflamatório composto de macrófagos, células gigantes e áreas de hifas septadas de *Aspergillus sp*. Não foram observados vermes adultos no tecido hepático adjacente, como descrito em estudo de capilaríase hepática (Soares et al. 2011). Posteriormente foi feita imuno-histoquímica marcada positivamente para *Aspergillus sp*. (Fig.1B).

Assim como nos papagaios, o envolvimento pulmonar ocorreu de forma acentuada em todos os gaviões (*P. unicinctus*) infectados por fungos. Isso ocorre em

decorrência do pulmão ser um dos órgãos primários de infecção, tendo em vista a contaminação por via respiratória. Achados semelhantes são vistos também em mamíferos domésticos e diferentes espécies silvestres, incluindo as aves (Spanamberg et al. 2012, Xavier & Madrid. 2014, Seyedmousavi et al. 2015). A macroscopia consistia em congestão e hemorragia, além de granulomas no parênquima. Nos gaviões houve marcado envolvimento do trato gastrointestinal com presença de múltiplos nódulos de aspecto lamelar cor creme distribuídos na serosa dos órgãos (Fig. 1C). Na microscopia, em todos os animais foram observados congestão, hemorragia, edema, inflamação heterofílica e histiocítica, bem como necrose, e em dois dos indivíduos acometidos, granulomas multifocais a multifocais a coalescentes. Em todos os casos foram observadas na histopatologia e posteriormente no exame de imuno-histoquímica hifas fúngicas filamentosas (Fig. 1D), com ramificações septadas e bifurcadas em ângulo agudo, fortemente marcadas. Os métodos diagnósticos variaram em cada caso, conforme especificado no Quadro 2.

Sporophila nigricollis e *Crotophaga ani*, apesar de pertencerem a espécies diferentes apresentaram patogenia e lesões fúngicas semelhantes. O *C. ani* desenvolveu um granuloma cutâneo em membros pélvicos, de coloração esbranquiçada e circunscrito (Fig. 2A), que marcou positivamente para *Aspergillus sp.* na imuno-histoquímica (Fig. 2B), já no *S. nigricollis* apresentou-se como um nódulo isolado na região dorsal ao bico medindo 1,3 cm, com aspecto crostoso de cor enegrecida, com áreas multifocais esbranquiçadas e amareladas (Fig. 2C). Na histoquímica, PAS e Grocott, foi possível marcar as hifas que apresentaram morfologia semelhante a *Aspergillus sp* (Fig. 2D).

Na *Fregata magnificens* foi visto durante a necropsia uma lesão traumática primária, causa por um anzol que perfurou o esôfago e pró-ventrículo. A ave apresentou emagrecimento progressivo, regurgitação e evolução para morte. Macroscopicamente observou-se congestão e hemorragia das áreas adjacentes à perfuração (Fig. 3A). Microscopicamente notou-se necrose e hemorragia difusa em pro-ventrículo e esôfago, com hifas filamentosas circundando as áreas necróticas. Houve a infecção e disseminação concomitante de duas espécies de fungos na área da lesão esofágica, marcados na imuno-histoquímica com anticorpos *anti-Zygomycetos* e *anti-Aspergillus sp* (Fig. 3B). A infecção pode apresentar-se na forma cutânea, respiratória, gastrointestinal e disseminada, nessa espécie apresentou-se gastrointestinal e pulmonar. Notou-se semelhança aos casos já relatados em outras aves como frangos, patos, avestruzes, pombos, pinguim e canários. Nesses casos também existem outros agentes

concomitantes com a infecção fúngica, em que nem sempre é possível saber qual é o agente primário responsável pela lesão patológica inicial (Severo et al, 2010, Xavier & Madrid, 2014).

O protozoário *Sarcocystis* sp. foi diagnosticado como causa de lesões em duas aves, um sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*) e um maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*), de forma disseminada e no músculo estriado cardíaco, respectivamente. Portanto, essas duas espécies de aves podem ser afetadas por esse parasita. Na avaliação clínica de aves debilitadas a infecção por *Sarcocystis* sp. deve ser investigada, uma vez que a literatura cita que 25 espécies desses parasitas são capazes de infiltrar os tecidos musculares (Prakas et al. 2018). A avaliação macroscópica do *T. rufiventris* revelou múltiplos pontos esbranquiçados no músculo peitoral que variavam de 0,1 e 0,4 cm, que se aprofundavam ao corte. Histologicamente foram observados merozoítos de *Sarcocystis* sp. distribuídos de forma multifocal disseminada no intestino, pró-ventrículo e ventrículo com processos inflamatórios discretos, compostos essencialmente por linfócitos e eosinófilos (Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C). No músculo peitoral, notou-se distensão das fibras musculares e intenso processo inflamatório, composto predominantemente por linfócitos e eosinófilos (Fig. 4D), já no coração havia discreto processo inflamatório composto por linfócitos. Achados que se repetem em outras espécies (Mayr et al. 2016, Gondim et al. 2017).

Na avaliação macroscópica do *D. nobilis* observou-se uma palidez multifocal não circunscrita no miocárdio. Microscopicamente havia distensão das fibras musculares cardíacas com necrose multifocal e infiltrado inflamatório discreto, composto principalmente por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e poucos macrófagos, juntamente com os processos inflamatórios e necróticos foram observados merozoítos livres de *Sarcocystis* sp. Portanto ambas as espécies acometidas pelo *Sarcocystis* sp devem ser consideradas hospedeiros intermediários (HI) do agente, uma vez que de acordo com artigos anteriormente publicados (Gjerde et al. 2018), as espécies consideradas HI apresentam a reprodução assexuada em células estriadas e vasculares, enquanto os hospedeiros definitivos apresentam o agente parasitário na mucosa intestinal.

Conclusão

Pode-se concluir que as aves *Amazona aestiva*, *Diopsittaca nobilis*, *Parabuteo unicinctus*, *Sicalis flaveola*, *Cyanocompsa brissonii*, *Nymphicus hollandicus*, *Crotophaga ani*, *Cyanocorax cyanopogon*, *Fregata magnificens*, *Turdus rufiventris*, *Micrastur semitorquatus* e *Sporophila nigricollis* são espécies suscetíveis a infecção por agentes infecciosos na Paraíba.

Este levantamento confirma a necessidade de investigação de patógenos de origem infecciosa, sejam eles bacterianos, fúngicos ou protozoários em rapinantes, passeriformes e psitacíformes, bem como o papel das aves silvestres e exóticas como reservatórios das doenças infecciosas, portanto, se faz necessário mais estudos sobre prevalência e manifestação dessas enfermidades nas mais diferentes espécies de aves silvestres e exóticas.

Referências

- Borges, C. A., Beraldo, L. G., Maluta, R. P., Cardozo, M. V., Barboza, K. B., Guastalli, E. A. L. & Ávila, F. A. 2017. Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. *Avian Pathology*, 46(1), 76-83.
- Da Paixao, T. A., do Nascimento, E. F., Parra, P. N. S. & Santos, R. D. L. 2004. Aspergillosis in an ostrich (*Struthio camelus*) in Brazil. *Ciencia Rural*, 34(2): 573-576.
- Desoubeaux G. & Cray, C. 2018. Animal Models of Aspergillosis. *Comparative Medicine*. 68(2): 109-123.
- El-Morsey, A., El-Seify, M., Desouky, A.-R. Y., Abdel-Aziz, M. M., Sakai, H. & Yanai, T. 2013. Morphologic identification of a new *Sarcocystis* sp. in the common moorhen (*Gallinula chloropus*) (Aves: Gruiformes: Rallidae) from Brolos Lake, Egypt. *Parasitology Research*, 113(1): 391–397.
- Gargiulo, A., Fioretti, A., Russo, T. P., Varriale, L., Rampa, L., Paone, S. & Dipineto, L. 2018. Occurrence of enteropathogenic bacteria in birds of prey in Italy. *Letters in applied microbiology*, 66(3): 202-206.

- Gjerde, B., Vikøren, T. & Hamnes, I. S. 2018. Molecular identification of *Sarcocystis halioti* n. sp., *Sarcocystis lari* and *Sarcocystis truncata* in the intestine of a white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) in Norway. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(1): 1–11.
- Gondim, L. S. Q., Jesus, R. F., Ribeiro-Andrade, M., Silva, J. C. R., Siqueira, D. B., Marvulo, M. F. V., & Gondim, L. F. P. 2017. *Sarcocystis neurona* e *Neospora caninum* em gambás brasileiros (*Didelphis* spp.): Investigação molecular e isolamento in vitro de *Sarcocystis* spp. *Parasitologia Veterinária*, 243: 192–198.
- Konicek, C., Vodrážka, P., Barták, P., Knotek, Z., Hess, C., Račka, K. & Troxler, S. 2016. Detection of zoonotic pathogens in wild birds in the cross-border region Austria–Czech Republic. *Journal of wildlife diseases*, 52(4): 850-861.
- Latge, Jean-Paul. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2): 310–350.
- Mayr, S. L., Maier, K., Müller, J., Enderlein, D., Gruber, A. D., & Lierz, M. 2016. Accipiter hawks (Accipitridae) confirmed as definitive hosts of *Sarcocystis turdusi*, *Sarcocystis cornixi* and *Sarcocystis* sp. ex *Phalacrocorax carbo*. *Parasitology Research*, 115(8): 3041–3047.
- Prakas, P., Butkauskas, D., Švažas, S., Juozaitytė-Ngugu, E. & Stanevičius, V. 2018. Morphologic and Genetic Identification of *Sarcocystis fulicae* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the Eurasian Coot (*Fulica atra*). *Journal of Wildlife Diseases*, 54(4): 765-771.
- Severo, C. B., Guazzelli, L. S. & Severo, L. C. 2010. Chapter 7 – Zygomycosis In: Refresher Course- Mycoses. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36(1): 134-141.
- Seyedmousavi, S., Guillot, J., Arné, P., De Hoog, G. S., Mouton, J. W., Melchers, W. J. & Verweij, P. E. 2015. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a

global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology*, 53(8): 765-797.

Soares, M. D. C. P., Nunes, H. M., Silveira, F. A. A. D., Alves, M. M. & Souza, A. J. S. D. 2011. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda) entre populações indígenas e mamíferos silvestres no noroeste do Estado do Mato Grosso, Brasil, 2000. *Rev Pan-Amaz Saude*, 2(3): 35-40.

Spanamberg, A., Casagrande, R. A., Ferreiro, L., Rolim, V. M., de Souza, S. O., Gonçalves, I. C. M. & Driemeier, D. 2012. Aspergillosis in green-winged saltators (*Saltator similis*), participants in bird singing competitions. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40(4).

Xavier, M. O., Madrid, I. M. Capítulo 70. Doenças fúngicas em aves. 2014. In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., Catão-Dias J. L. (Eds), *Tratado de Animais Silvestres*. 2 ed. Roca, São Paulo. 1527-1536.

Quadro 1. Distribuição de necrópsias em aves silvestres e exóticas diagnosticadas com doença infecciosa, realizadas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil, de acordo com a espécie da ave.

Espécie	Número de aves acometidas	Porcentagem (%)
<i>Amazona aestiva</i>	19	38%
<i>Diopsittaca nobilis</i>	15	30%
<i>Parabuteo unicinctus</i>	3	6%
<i>Sicalis flaveola</i>	3	6%
<i>Cyanocompsa brissonii</i>	2	4%
<i>Nymphicus hollandicus</i>	2	4%
<i>Crotophaga ani</i>	1	2%
<i>Cyanocorax cyanopogon</i>	1	2%
<i>Fregata magnificens</i>	1	2%
<i>Turdus rufiventris</i>	1	2%
<i>Micrastur semitorquatus</i>	1	2%
<i>Sporophila nigricollis</i>	1	2%
Total de espécies: 12	50	100%

Quadro 2. Métodos utilizados para diagnosticar doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, entre os anos de 2013 e 2018.

Espécie	Agente patogênico diagnosticado	Método utilizado
<i>Sporophila nigricollis</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Histopatologia/ Histoquímica/ Microbiológico
<i>Parabuteo unicinctus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Histopatologia/ Imuno- histoquímica
<i>Parabuteo unicinctus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Histopatologia/ Imuno- histoquímica
<i>Crotophaga ani</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Histopatologia/ Imuno- histoquímica
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Histopatologia/ Imuno- histoquímica
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Histopatologia/ Imuno- histoquímica
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Aspergillus sp./ Capillaria hepatica</i>	Histopatologia/ Histoquímica
<i>Fregata magnificens</i>	<i>Aspergillus sp./Zygomycetos</i>	Histopatologia/ Imuno- histoquímica
<i>Micrastur semitorquatus</i>	<i>Candida spp.</i>	Histopatologia/Histoquímica
<i>Diopsittaca nobilis</i>	<i>Sarcocystis sp.</i>	Histopatologia
<i>Turdus rufiventris</i>	<i>Sarcocystis sp.</i>	Histopatologia
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Escherichia coli</i>	Histopatologia/ Microbiológico

ANEXO I
Doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas

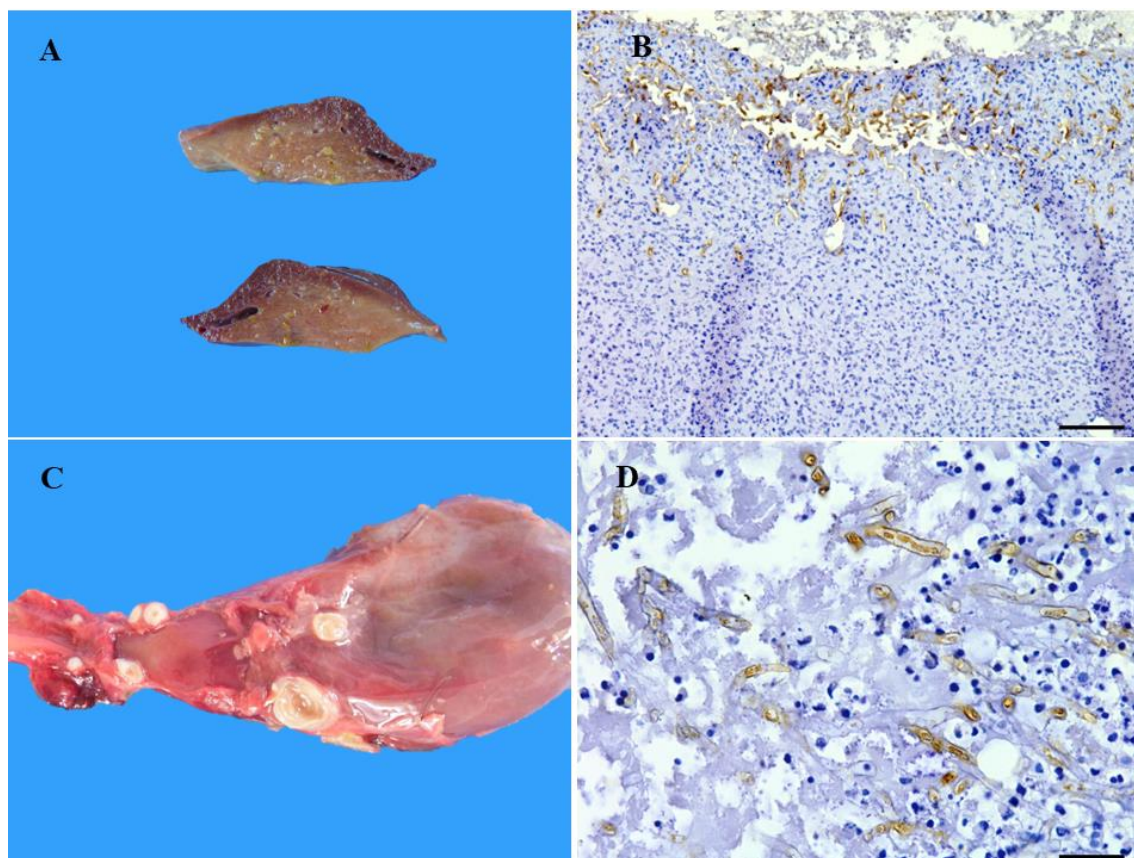


Figura 1. Aspectos macroscópicos e microscópicos da aspergilose em aves silvestres e exóticas na Paraíba. **(A)** Macroscopia de fígado difusamente pálido. Aspergilose e parasitismo secundário em tecido hepático de *Amazona aestiva*. **(B)** Tecido hepático com marcação imuno-histoquímica *anti-Aspergillus* positiva em cor marrom. Aspergilose em *Amazona aestiva*. Obj. 40x. **(C)** Múltiplos nódulos de aspecto lamelar cor creme distribuídos na serosa do inglúvio. Granuloma aspergilósico em inglúvio de *Parabuteo unicinctus*. **(D)** Imuno-histoquímica *anti-Aspergillus*, aplicada em tecido de inglúvio de um *Parabuteo unicinctus*, com marcação positiva em marrom das hifas fúngicas filamentosas septadas de ângulo agudo. Obj. 100x.

ANEXO I (Continuação)

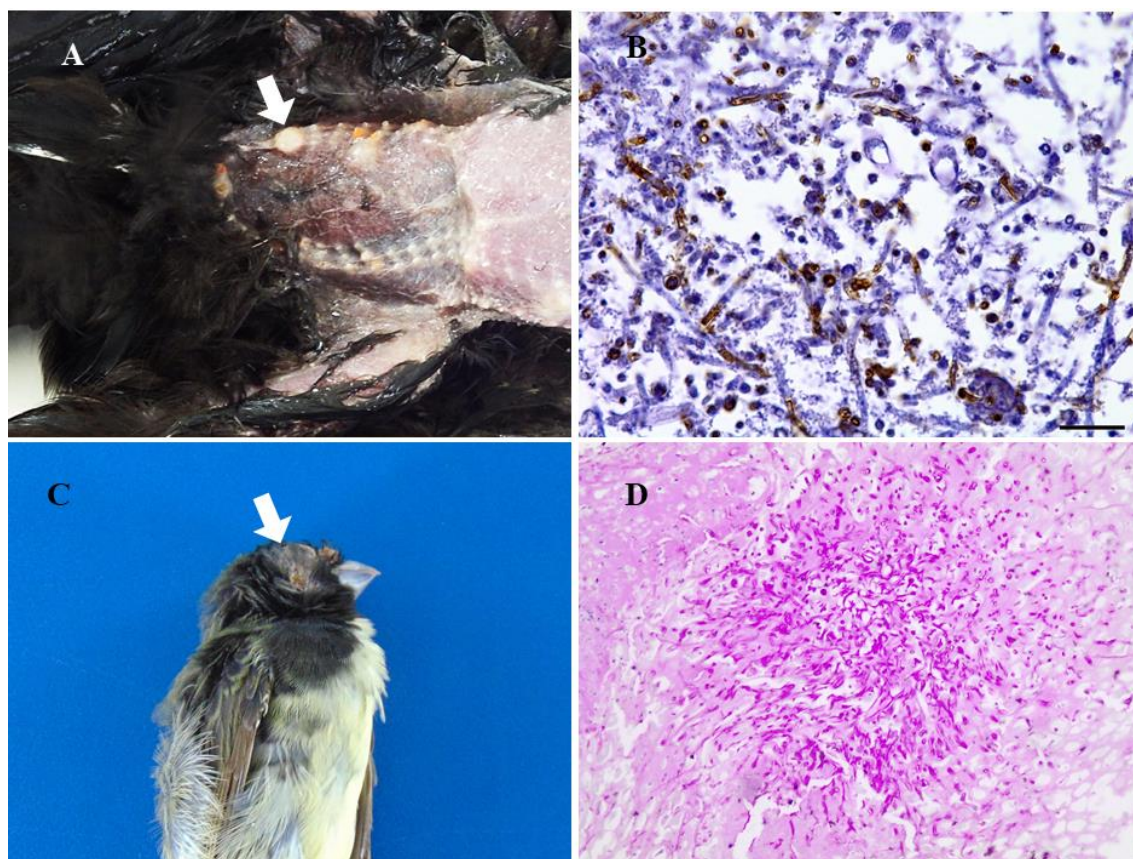


Figura 2. Aspectos macroscópicos e microscópicos do granuloma aspergilósico em aves silvestres e exóticas na Paraíba. **(A)** Nódulo cutâneo em membro pélvico de *Crotophaga ani*, de coloração esbranquiçada e circunscrito (seta). **(B)** Imuno-histoquímica *anti-Aspergillus* que marcou positivamente em marrom, evidenciando as hifas de *Aspergillus sp.* no tecido de nódulo em membro pélvico de *Crotophaga ani*. Método da espreavidina-peroxidase, cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB). Obj. 100x. **(C)** Nódulo cutâneo na região dorsal ao bico de *Sporophila nigricollis* medindo 1,3 cm, com aspecto crostoso e enegrecido, com áreas multifocais esbranquiçadas e amareladas. **(D)** Marcação histoquímica evidenciando hifas septadas em ângulo agudo marcadas de magenta em nódulo cutâneo em um *Sporophila nigricollis*, com morfologia semelhante a *Aspergillus sp.* Ácido Periódico de Schiff (PAS). Obj. 20x.

ANEXO I (Continuação)

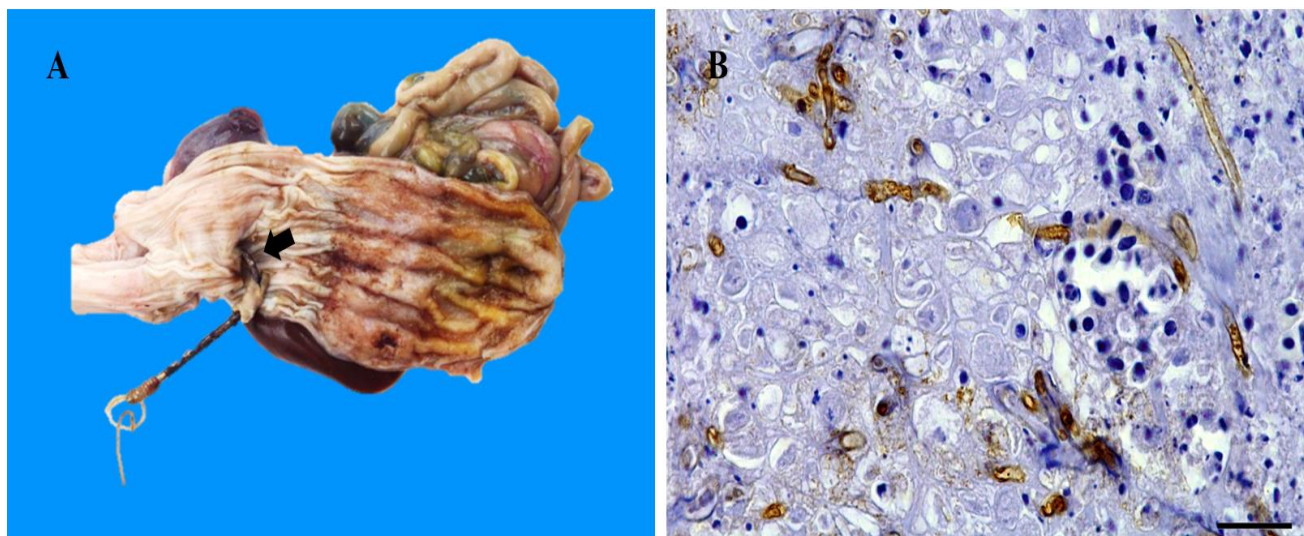


Figura 3. Aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões causadas por doenças infecciosas em aves silvestres e exóticas na Paraíba. **(A)** Macroscopia da região de esôfago e inglúvio onde é possível notar a perfuração por anzol na área de transição (seta preta) e acentuada hiperemia dos tecidos adjacentes à perfuração, com pequenas úlceras na mucosa do inglúvio. Ingluvite e esofagite secundárias a perfuração. Aspergilose e Zygomycose em uma *Fregata magnificens*. **(B)** Imuno-histoquímica evidenciando hifas filamentosas e septadas em ângulo agudo de cor marrom, circundando as áreas necróticas do tecido digestivo. Houve a infecção e disseminação concomitante de duas espécies de fungos na área da lesão esofágica e inglúvio, marcados com anticorpos *anti-Zygomycetos* e *anti-Aspergillus sp.* em *Fregata magnificens*. Obj. 100x.

ANEXO I (Continuação)

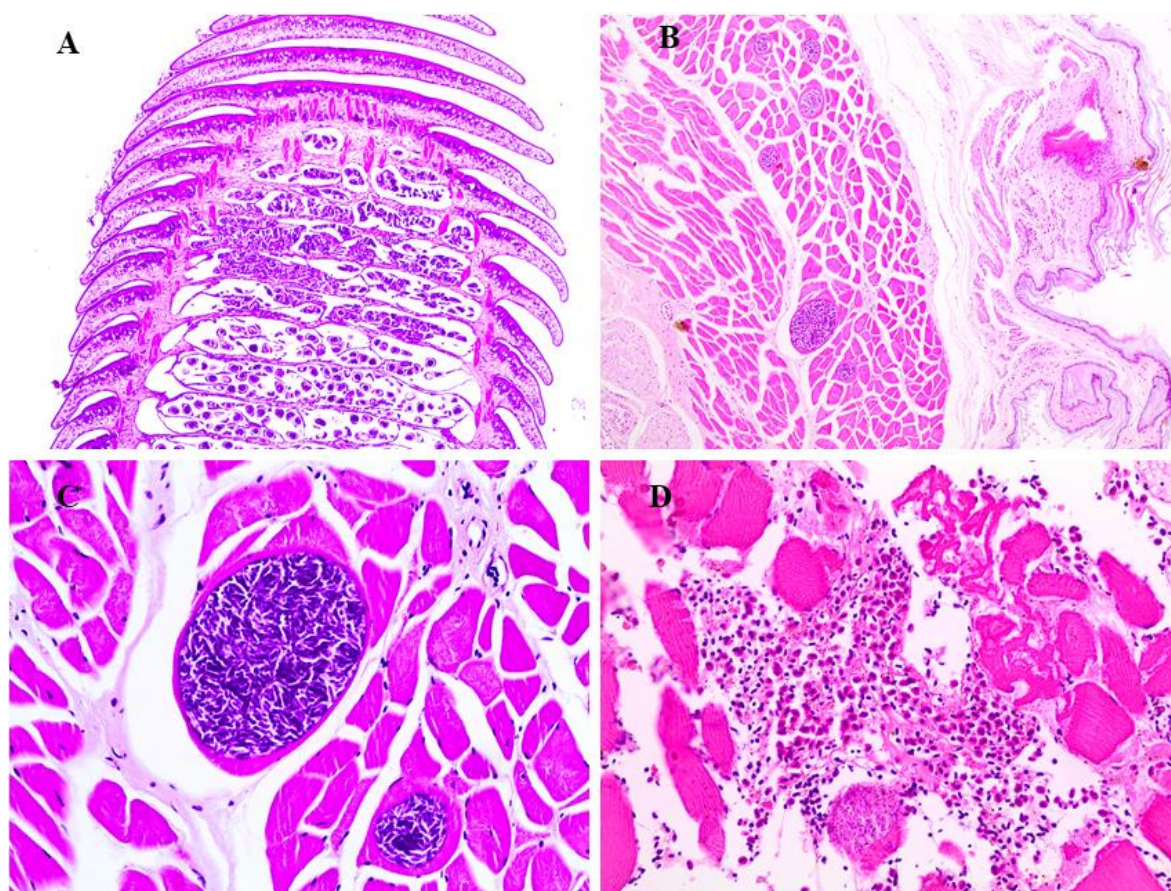


Figura 4. Aspectos microscópicos das lesões causadas por protozoário em um *Turdus rufiventris*. **(A)** Corte longitudinal do intestino delgado, demonstrando enterite eosinofílica e necrosante multifocal a coalescente e acentuada em corte, associada a inúmeros merozoítos de *Sarcocystis sp.*. Hematoxilina e Eosina (HE). Obj. 10x. **(B)** Presença de merozoítos distribuídos multifocalmente nas camadas musculares do pró-ventrículo, evidenciando uma moderada pró-ventriculite associada a múltiplos merozoítos de *Sarcocystis sp.* Hematoxilina e Eosina (HE). Obj. 10x. **(C)** Merozoíto de *Sarcocystes sp.* em camada muscular de ventrículo, entremeando o tecido muscular. Hematoxilina e Eosina (HE) Obj. 40x. **(D)** Necrose das fibras do músculo esquelético associada a infiltrado inflamatório composto por eosinófilos, em menor quantidade, linfócitos, plasmócitos e macrófagos com merozoítos de *Sarcystis sp* livres no músculo esquelético peitoral. Hematoxilina e Eosina (HE). Obj. 40x.

Capítulo 2

“Aspergilose em Aves Silvestres No Nordeste Do Brasil”

Este artigo será submetido a revista *Medical Mycology* com fator de impacto 2.851 e Qualis A2.

Aspergillosis in free-living and captive birds in northeastern Brazil

Nayadjala Távita Alves dos Santos, Felício Garino Júnior, Harlan Hallamys de Lima Nascimento, Helder Carlos Costa Pereira, Glaucia Denise Kommers, Jeann Leal de Araújo, Ricardo Barbosa Lucena*

RESUME

Aspergillosis is a fungal infection caused by *Aspergillus spp.*, which affects all animal species, including man. This agent is found in different environments, including soils, water and decomposing organic matter. Therefore, it is considered omnipresent and the main cause of pulmonary, systemic and cutaneous granulomatous disease in wild birds. The objective of this study was to describe the pathological aspects of aspergillosis in five species of wild birds in Brazil: *Amazona aestiva*, *Parabuteo unicinctus*, *Sporophila nigricollis*, *Crotophaga ani* and *Fregata magnificens*. For the passerine birds, the disease presente as cutaneous and systemic forms, whereas in parrots and birds of prey it had pulmonary and systemic manifestations. The main clinical findings were dyspnea, poor digestibility of seeds and the development of granulomatous lesions followed by sudden death. At necropsy, the main changes included nodular lesions and hemorrhage, associated with lung, liver, spleen, and skin. On histopathology, the main findings were granulomatous aerosaculitis, granulomatous pneumonia, liver granulomas and granulomatous folliculitis. In two *A. aestiva* and two *P. unicinctus*, positive microbiological isolations were obtained for *Aspergillus sp.*, in addition to positive immunolabeling by immunohistochemistry using an *anti-aspergillus* antibody. Immunohistochemistry was performed on a *F. magnificens*, which positively marked for *anti-aspergillus* and *anti-zygomycete* antibodies. In *S. nigricollis* and *C. ani*, confirmation was made through histochemical examination, in which the agent's septa hyphae were positively stained with periodic acid stains from *schiff-PAS* and silver methanamine from *Gomori-Grocott*.

INTRODUCTION

Aspergillus spp. are filamentous and septate fungi with a hyaline aspect. They can be found in a variety of environments, including, soils, water and decomposing organic matter, thus it is considered omnipresent¹. *Aspergillosis* is a granulomatous disease that affects mainly the respiratory tract of birds but has also been reported in other species such as dogs, cats, horses, cows, cetaceans, monkeys and bees¹. It can also affect humans, being considered an important disease in immunosuppressed people. It is estimated that about 80% of aspirates from human patients are positive for *Aspergillus fumigatus*, which is also the main causative agent of clinical disease in birds, occasionally in this species, there may be pulmonary infection by *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus*¹.

The infection occurs by inhaling conidia that remain in the environment and are aspirated into the airways, so its main presentation involves the respiratory tract. However there is the possibility of *Aspergillus spp.* spreading to the serous surfaces of the organs of the celomatic cavity, and they can even reach the feather follicle, or the nervous system, as has been reported in marine animals and poultry^{1,2,3}. They are considered biological risk of group 2 in aviaries, since they can be transmitted from the environment to the keeper⁴⁻⁵.

Usually, there is compromise of the respiratory system leading to the presentation of complex dyspnea and depression, and with the development of the clinical picture, the animal may become susceptible to other diseases and mixed infections by opportunistic agents¹⁻⁷. In the disseminated disease it is possible to find lesions in the pericardium, kidney, liver, spleen, eyes, gastrointestinal tract and Bursa of Fabricius. In all of these organs, it is possible to observe a characteristic granuloma

formation, represented by a concentric formation of inflammatory cells surrounding a necrotic center⁷.

Histochemistry should be performed applying special stainings that highlight the fungi and their morphological aspects, in case of aspergillosis, the presence of bifurcated and septate hyphae at an acute angle, for this purpose, *PAS* and *Gomori-Grocott*² are used. Immunohistochemistry is considered a useful method for detecting aspergillosis. The use of fungal-specific monoclonal antibodies is effective and generally does not present flaws such as cross reactions⁶. Mycological culture can be used for diagnostic purposes, however sampling methods should be well planned, as the fungus is present in the upper respiratory tract¹. Once the *Aspergillus sp.* is detected the sample must be sent out for confirmation of the species through molecular sequencing tests¹. The objective of this survey was to report the cases of aspergillosis that affected wild and exotic birds in Northeastern Brazil, and to describe it's the clinical, pathological, morphotintorial and immunohistochemical aspects found on the present study.

MATERIAL AND METHODS

All necropsied birds were referred by the Wildlife Screening Center (CETAS) and Zoobotanical Park Arruda Câmara in the city of João Pessoa, to the the Veterinary Hospital of the Federal University of Paraíba, Areia, all located in the State of Paraíba.

Birds were necropsied according to the recommendations for the species, and their tissues sampled and frozen for subsequent microbiological isolation, as well as being fixed in 10% neutral buffered formalin. The tissues were submitted to a routine histopathological processing, cut to 4µ and stained with Hematoxylin and Eosin (HE). The lesions compatible with fungal infection were further analyzed using tissue

histochemistry following manufacturer's recommendations (of PAS® and Gomori-Grocott®).

For immunohistochemical evaluation, the tissues were monoclonal anti-aspergillus antibodies using commercial kits, following the manufacturer's instructions. Monoclonal antibodies were used for zygomycetes.

RESULTS

Of the total of 189 necropsy and biopsy samples collected from wild and exotic birds, 50 (26.45%) corresponded to infectious diseases. Bacterial diseases were responsible for 26 (52%) cases, followed by fungi with 11 (22%) and lastly protozoa with 2 (4%). Therefore, within the cases of fungi nine (18%) were aspergillosis.

For the blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) the disease occurred in the form of an outbreak in young birds, seized from the illegal trade. These birds were subjected to capture and transport stress, which facilitated the occurrence of acute death. On necroscopic examination, the birds showed intense emaciation and loss of feathers. After opening the celomatic cavity, yellowish nodular multifocal granulomas were noticed in the pericardium. All birds showed similar changes, with granulomatous formations distributed in the pericardium and serous surfaces of the gastrointestinal tract.

The lungs had a focal area with extensive hemorrhage and were diffusely swollen, no changes were observed in the airsacs. The pro-ventriculus had granulomas in the gastrointestinal tract similar to the lesions described in the pericardium. The gizzard had a focally extensive greenish area in the center of the mechanical stomach's coelin membrane, this area was adhered to the mucous layer. There was congestion in the liver and kidneys.

Microscopic lesions were characterized by granulomatous inflammatory infiltrate in several organs. In the pericardium and myocardium there was a mixed infiltrate composed of heterophiles, lymphocytes and macrophages surrounding multifocal necrosis. The respiratory tract presented with granulomatous pneumonia associated with severe pulmonary lesions ranging from focally extensive granulomatous pneumonia, composed of central necrosis surrounded by heterophiles and macrophages to major circulatory lesions, characterized by marked multifocal hemorrhage and congestion.

In the digestive tract, the proventriculus had multiple granulomas characterized by an inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, heterophiles, macrophages and multinucleated giant cells surrounding a necrotic center, characterizing a diffuse granulomatous proventriculitis. The gizzard had a marked multifocal to coalescent granulomatous ventriculitis characterized by an inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, heterophiles, macrophages and marked necrosis. The liver was congested with granulomatous inflammatory infiltrate associated with the negative image of the septate hyphae of *Aspergillus* sp. In one sample, there was secondary infection with adult worms and eggs suggestive of *Capillaria hepatica*.

The Harris' hawks (*Parabuteo unicinctus*) had a history of chronic dyspnea and weight loss. On necropsy, gross lesions consisted of intense emaciation along with opaque and stained feathers, as well as areas of aptera. At the opening of the cavity, the organs were diffusely congested with hemorrhagic aspect, the parenchymal organs, such as the liver and spleen, were friable. In the serosa of the gastrointestinal tract there was formation of multifocal granulomas that ranged from cream to whitish in color, measuring between 0.2 to 1.0 cm.

On histopathology, septate hyphae in the lungs, in the liver and in the serosa of the proventriculus were observed. The hyphae interspersed marked necrotic and hemorrhagic processes, with formation of granulomas and marked inflammatory infiltrate that consisted mainly of macrophages, heterophiles and in the liver and lung, which also had an exacerbated edema. In the proventriculum there were marked inflammatory infiltrates, with the presence mainly of an inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, macrophages and heterophiles, with multifocal to coalescent areas of moderate necrosis.

The Yellow-bellied seedeater (*Sporophila nigricollis*) had a history of chronic cutaneous nodules in the face. This bird initially presented nodular growth close to the conjunctiva, which later evolved into a large nodule. The bird started to have difficulty feeding, in addition to dyspnea and tachycardia. He died 30 days after the onset of clinical signs.

During the necropsy, the bird was emaciated and a rounded mass of 1.3 cm of diameter with an irregular and scaly surface in the periocular region, dorsal to the ranfoteca, was observed. This mass was firm, blackened with whitish multifocal areas and partially adhered to the skin. Liver, kidneys, and digestive tract were congested and hemorrhagic.

On microscopy, this mass consisted of a mycotic granuloma, comprised of a necrotic cell cluster, admixed with an infiltrate composed of heterophiles, lymphocytes, macrophages and giant cells that surrounded necrotic areas intermingled with filamentous and septate hyphae. Sometimes, the necrotic areas were extensive and did not include significant inflammation. Areas with great cellularity also had countless fungal hyphae of *Aspergillus sp.* usually with circular organization, sometimes they

were found to be irregularly distributed. Secondary to the main lesion, areas of congestion and multifocal hemorrhage were observed.

Microscopically, between the internal organs, the liver had multifocal granulomatous changes, with inflammatory infiltrate composed of macrophages, heterophiles, lymphocytes and giant cells surrounding necrotic areas and with random distribution, sometimes associated with fungal hyphae of *Aspergillus sp*, in addition to congestion and hemorrhage. Organs such as lungs, kidney, gizzard, proventriculus and brain showed alterations related to the circulatory system. Marked and diffuse congestion and hemorrhage were present in kidneys and lungs, ventricle, proventricle and brain had diffuse congestion.

In the Smooth-billed ani (*Crotophaga ani*), rounded non-ulcerated skin nodules were observed in the region of pelvic limbs and wings and were whitish on cut surface. The bird showed evident emaciation, with areas of feather loss. all organs of the coelomic cavity were congested and red, the kidneys, liver and spleen were friable, and the lung was diffusely hemorrhagic and necrotic, and there was also a marked inflammation composed mainly of heterophiles, macrophages and rare lymphocytes. Through histopathology it was also confirmed that the nodule was a cutaneous aspergillous granuloma, also confirmed through histochemistry. It consisted of an intensely necrotic center surrounded by heterophiles and granulocytes, as well as giant cells intermingled with the septate hyphae of *Aspergillus sp* present in a diffuse manner, but more intensely located at the edges of the aspergillous nodule, as evidenced by histochemistry through PAS and Grocott.

Lastly, a magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*) was found by the environmental police, weak and apathetic. On clinical care, it presented marked weight

loss and regurgitation. It died shortly after admitted to clinical care. During the necropsy, a fishing hook was found, which crossed the wall of the esophagus and the proventriculus. A. These areas were diffusely hemorrhagic and ulcerated with a yellowish focal area. Microscopically, necrosis and diffuse hemorrhage in the proventriculus and esophagus with filamentous hyphae were noted in the middle of the necrotic areas. Subsequently, the traumatic injury caused infection and dissemination of concomitant fungi in the area of the esophageal injury and were immunolabeled for *zygomycetes* and *aspergillus* by immunohistochemistry.

DISCUSSION

The diagnosis of Aspergillosis in the seven cases was defined by the macroscopic and microscopic aspect of the lesions, the visualization of the agent and its morphological and morphotintorial characteristics in histopathological and histochemical exams, by the positive immunolabeling by immunohistochemistry and by the microbiological aspects.

Immunological and environmental factors are necessary for the development of aspergillosis in immunosuppressed and healthy animals. Environmental variables include the amount of conids in the environment and organic matter for their proliferation. Individual factors are complex and range from stresses of the most varied types to errors in feeding, drug abuse, primary immunosuppressive diseases and the presence of infected animals at the site of contamination⁸, it is believed that stress was the triggering factor for the reported cases of aspergillosis in the birds of the present study.

The pathogenesis of the disease was predominantly respiratory, as in most cases already reported in humans⁸⁻⁹ and animals⁷⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹², making it possible to establish a

pattern for the route of infection. *Aspergillus sp.* was inhaled and, consequently, it broke the immunological barriers, starting to establish itself in the airways, crossing air sacs and reaching the bronchioles. Already in the lungs, it spread and multiplied, dissecting the tissues and forming lesions characteristic of the local inflammatory process, in an attempt to isolate the agent, macrophages, heterophiles, lymphocytes, and giant cells infiltrated the tissues in an organized manner, causing central necrosis, later forming the classic granulomas of *aspergillus* infection.

Pulmonary involvement occurred significantly in all birds, in which macroscopy consisted of congestion and hemorrhage in most cases and in a few cases, granulomas were observed in the parenchyma. Microscopy was observed in all birds, congestion, hemorrhage, edema, mixed inflammation, necrosis, and in most cases multifocal or multifocal to coalescent granulomas with the presence of filamentous fungal hyphae, with septate and bifurcated branches at an acute angle. As one of the primary organs of infection, in view of respiratory contamination, the lungs were the organ most affected in most animals diagnosed with aspergillosis, similar findings to cases in domestic mammals and wild animals, including birds³⁻¹⁰⁻¹¹.

The body score that ranged from regular to thin, reaching to cachectic, was a necropsy finding observed in all birds, as has been reported in other birds infected by the fungus¹⁰, as well as there were numerous circulatory and skin lesions, which were numerous and accentuated. Other common findings that are consistent with the macroscopy cited by previous reports are the presence of granulomas of 0.2 to 1.3 cm and lesions ranging from moderate to severe hemorrhage, congestion and edema¹⁰.

The infection was disseminated to other organs in all the species reported, demonstrating the ability of the agent to spread in the most varied tissues, commonly

they can be present in the heart, liver, kidneys and spleen⁸. In the present case, it spread to the heart, liver, spleen, kidneys and skin, which were organs severely affected by the infiltration of the conidia, circulatory and inflammatory lesions. In all cases, granulomatous lesions were observed, with the presence of the septate hyphae best evident in *PAS* and *GMS* stains¹³.

The occurrence of co-infection was evidenced in a magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*) and a parrot, in which opportunistic organisms were diagnosed as active infection, with the worsening of the birds' clinical condition. They consisted of saprophytic fungus and a parasite, respectively. Concomitant infections are common in free-living birds, as a consequence of immunosuppression secondary to aspergillosis¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶.

In *F. magnificens* there was a suspicion of *zygomycetes*, due to, inflammatory infiltrates and the presence of fungal structures that resembled its morphology in the esophageal tissue of this bird. On histopathology with HE staining and in histochemistry, through Grocott stain, elongated hyphae with imprecise and rarely septate ramifications were evident. The material was sent to immunohistochemistry, which obtained a positive immunolabeling for *zygomycetes*. *Aspergillus*, like *zygomycetes*, are filamentous and saprophytic fungi, despite their morphological differences, filament size, presence of septa and branch organization. Therefore, the association of another diagnostic method is recommended for a safe conclusion and differentiation of both¹⁷, such as the immunohistochemistry technique.

Reports of *zygomycosis* as an opportunistic disease have been previously described in chickens, ducks, ostriches, pigeons, penguins and canaries, but there are no reports in *F. magnificens*. The infection can occur as a cutaneous, respiratory,

gastrointestinal or disseminated form. In the was evidenced in a magnificent frigatebird (*Fregata magnificens*) and a parrot, in the gastrointestinal form was observed, with primary involvement of the esophagus, and subsequently, the stomach. In the esophagus, there was necrosis and hemorrhage resulting from the trauma, associated with traumatic injury. On microscopy there was an inflammatory infiltrate composed of heterophiles, lymphocytes and mainly macrophages, with the Grocott stain it was possible to mark the little septate, filamentous, long hyphae with disorganized branching³.

In one example of *A. aestiva*, hyphae were found associated with mixed inflammation, characterizing severe fungal hepatitis. Between the liver parenchyma there were eggs rounded to ovals, with striated capsule and non-protruding bipolar operculum, similar to *Capillaria hepática*, surrounded by an inflammatory process and areas of liver necrosis, similar to common parasitic co-infections in debilitated anemias, therefore a secondary condition to the general state of the animal¹⁸.

The cutaneous and systemic presentation occurred in the birds *Sporophila nigricollis* and *Crotophaga ani*. Both had similar clinical signs ranging from granulomas in the *C. ani* that developed in the pelvic limbs and in the wing, measuring 0.2 to 0.6 cm, to an isolated nodule in the dorsal region of the beak of the *S. nigricollis* measuring 1.3 cm, with a scaly. Both nodules were round but diverging in color, whitish and blackish with whitish multifocal areas, respectively. The cutaneous presentation was primary in *S. nigricollis* and secondary in *C. ani*, since the primary development is due to skin lesions, breakage of the skin, or local trauma, which occurred in the conjunctiva region of the *S. nigricollis*. The secondary, in turn, is caused by underlying bloodborne contamination of other infected organs, without any trauma or local fissures, as a consequence of the systemic disease, which is the case of the black Anu¹⁹.

The chronic pulmonary form associated with the systemic form was observed in *Parabuteo unicinctus*. The upper and lower respiratory tracts were also affected, as were other organs of the cavity. The low body score and the circulatory lesions resulting from infection by aspergillosis were similar to the inflammatory response caused by the agent in other birds and other animal species⁸, so one can emphasize a similarity in this aspect, regarding the immune response, since the agent is widespread. The lung with a hemorrhagic aspect and the presence of hyphae throughout the parenchyma, in addition to significant inflammatory lesions, reveals a pattern that is repeated throughout the respiratory tract of hawks, similar to a study in young hawks, carried out by inoculating the aspergillus of controlled form, which showed the same histopathological characteristics in most birds⁷.

Our study confirms the occurrence of infection by *Aspergillus sp* in *Amazona aestiva*, *Parabuteo unicinctus*, *Sporophila nigricollis*, *Crotophaga ani* and *Fregata magnificens*. Despite being different species, they presented similar pathogenesis and pathological lesions, making it possible to establish a pattern of clinical and pathological presentation of aspergillosis in wild birds in Northeastern Brazil.

REFERENCES

- 1 Desoubeaux G.; Cray, C. Animal Models of Aspergillosis. *Comparative Medicine* 2018; 68 (2): 109-123.
- 2 Dória, E. M. A., Santos, J. A., Santangelo, C. Cerebral Aspergillosis in Chicks. *Brazilian Agricultural Research* 1984; 19 (6): 773-776.
- 3 Xavier, M. O., Madrid, I. M. Chapter 70. Fungal diseases in birds. In: Cubas, Z. S., Silva, J. C. R., Catão-Dias J. L. *Treatise on wild animals*. 2nd ed; São Paulo: Roca, 2014, 1527-1536.

- 4 Fernandes, F. C; Furlaneto, A. Biological Risks in Aviaries. *Brazilian Journal of Occupational Medicine* 2004; 2 (2): 140-152.
- 5 National Institute of Safety and Hygiene at Work (INSHT). Technical guide for the evaluation and prevention of risks related to exposure to biological agents. *Madrid*; 2014.
- 6 Galiza, G. J. N., Silva. T. M. and Caprioli, R. A. et al. Use of three immunohistochemical methods to detect aspergillosis and zygomycosis in animals. *Brazilian Veterinary Research* 2014; 34 (7): 637-642.
- 7 Fischer, D., Van Waeyenberghe, L., Failing, K., et al. Single tracheal inoculation of *Aspergillus fumigatus* conidia induced aspergillosis in juvenile falcons (*Falco* spp.). *Avian pathology* 2018; 47 (1), 33-46.
- 8 Latge, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12 (2), 310–350.
- 9 Krenke R., Grabczak E. M. Tracheobronchial Manifestations of *Aspergillus* Infections. *The Scientific World Journal* 2011; 11, 2310–2329.
- 10 Spanamberg, A., Casagrande, R. A., Ferreiro, L., et al. Aspergillosis in Green-winged Saltators (*Saltator similis*) Participants in Bird Singing Competitions. *Acta Scientiae Veterinariae* 2012; 40 (4), 1089.
- 11 Seyedmousavi S., Guillot, J. Arné, P., et al. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology* 2015; 53 (8), 765-797.
- 12 Castro, N. B., Rolim, V. M., Nascimento, L. C., et al. Fungal diseases in cats in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Veterinary Research* 2017; 37 (11), 1313-1321.

- 13 Paixão, T. A., Nascimento, E. F., Parra, P. N. S. et al. Aspergillosis in an ostrich (*Struthio camelus*) in Brazil. *Rural Science* 2004; 34 (2), 573-576.
- 14 Vasconcelos, T. C. B., Longa, C. S., Albuquerque, D. D. A. et al. Clinical and anatomopathological features of aspergillosis and candidiasis in cockatiel (*Nymphicus hollandicus*): a case report. *Portuguese Journal of Veterinary Sciences* 2011; 106 (577-580), 109-112.
- 15 Silva, T. M., Okamoto, A. S., Smaniotto, B. D. et al. Association megabacteriosis, aspergillosis and candidiasis in australian parakeet (*Melopsittacus undulatus*) in captivity, Marilia, SP: case report. *Brazilian Journal of Veterinary Science* 2014; 21 (2), 101-104.
- 16 Chege, S., Howlett, J., Qassimi, M. A. et al. Opportunistic infection of *Aspergillus* and bacteria in captive Cape vultures (*Gyps coprotheres*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2013; 3 (5), 401-406.
- 17 Severo, C. B., Guazzelli, L. S., Severo, L. C. Chapter 7 - Zygomycosis In: Refresher Course- Mycoses. *Brazilian Journal of Pulmonology* 2010; 36 (1), 134-141.
- 18 Soares, M. C. P., Alves M. M., Nunes, H. M. et al. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda) among indigenous populations and wild mammals in the northwest of Mato Grosso State, Brazil, 2000. *Pan-Amazonian Journal of Health* 2011; 2 (3), 35-40.
- 19 Cho, W. H., Kim, J. E., Jeon, D. S. Tracheobronchial Aspergillosis following Primary Cutaneous Aspergillosis in a Lung-Transplant Recipient. *Internal Medicine* 2011; 50 (2), 131-134.

Tabela 1. Clinical characteristics, concomitant diseases and lesion distribution in wild birds diagnosed with aspergillosis from 2013 to 2018 at the Veterinary Pathology Laboratory of the Federal University of Pará, Brazil.

Order	Species	Clinical signs	Coinfection	Affected organs
Psittaciforme	<i>Amazona aestiva</i>	Weight loss and feathers, emaciation	<i>Capillaria hepática</i>	Pericardium, lung, air sacs, pro-ventricle, ventricle and liver
Falconiforme	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Thinning, emaciation, dyspnoea, opaque, stained feathers	-	Lung, pro-ventricle and liver
Passeriforme	<i>Sporophila nigricollis</i>	Wasting, tachypnea, tachycardia, conjunctiva nodule	-	Skin, lung, liver, kidneys, pro-ventricle, ventricle and brain
Passeriforme	<i>Crotophaga ani</i>	Emaciation, loss of feathers and nodules on pelvic limbs and wings	-	Lung and skin
Passeriforme	<i>Fregata magnificens</i>	Progressive weight loss, emaciation and regurgitation	<i>Zygomycetos</i>	Pro-ventricle and esophagus

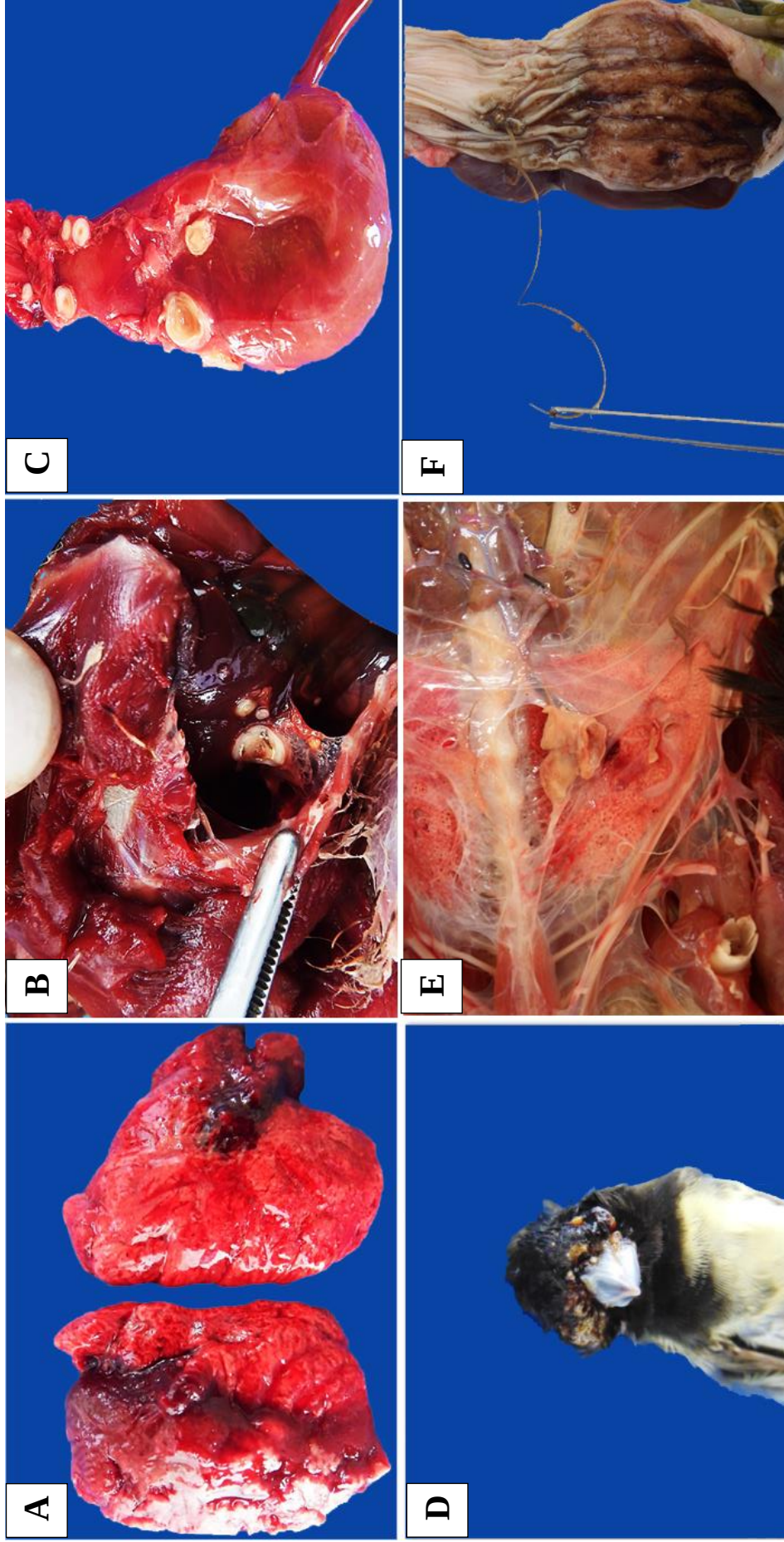


Figure 1. Macroscopic aspects of the infection by *Aspergillus* sp. in wild and exotic birds in northeastern Brazil. **A.** *Amazona aestiva* lung with bilateral hemorrhagic extensive focal area and diffusely swollen. **B.** Formation of rounded nodules in *Parabuteo unicinctus* in different diameters, ranging from cream to whitish on the pericardium (white arrow), with adherence to the cervical air sac. **C.** Final portion of the esophagus and the crop of *Parabuteo unicinctus* diffusely hyperemic, presenting numerous nodules with a lamellar aspect of cream color, ranging from 0.2 to 1 cm, distributed multifocally on the surface of these organs, which deepened at cut. **D.** Aspergillous granuloma in *Sporophila nigricallos* characterized by nodulation measuring 1.3 cm, rounded, circumscribed, firm and adhered to the orbital region, dorsal to the beak. **E.** *Fregata magnificens*. Lung area with yellowish, friable mass attached unilaterally to the pulmonary pleura. **F.** *Fregata magnificens*. Esophageal and crop region with perforation secondary to fishhook, the mucosa has blackened multifocal areas and small ulcerations

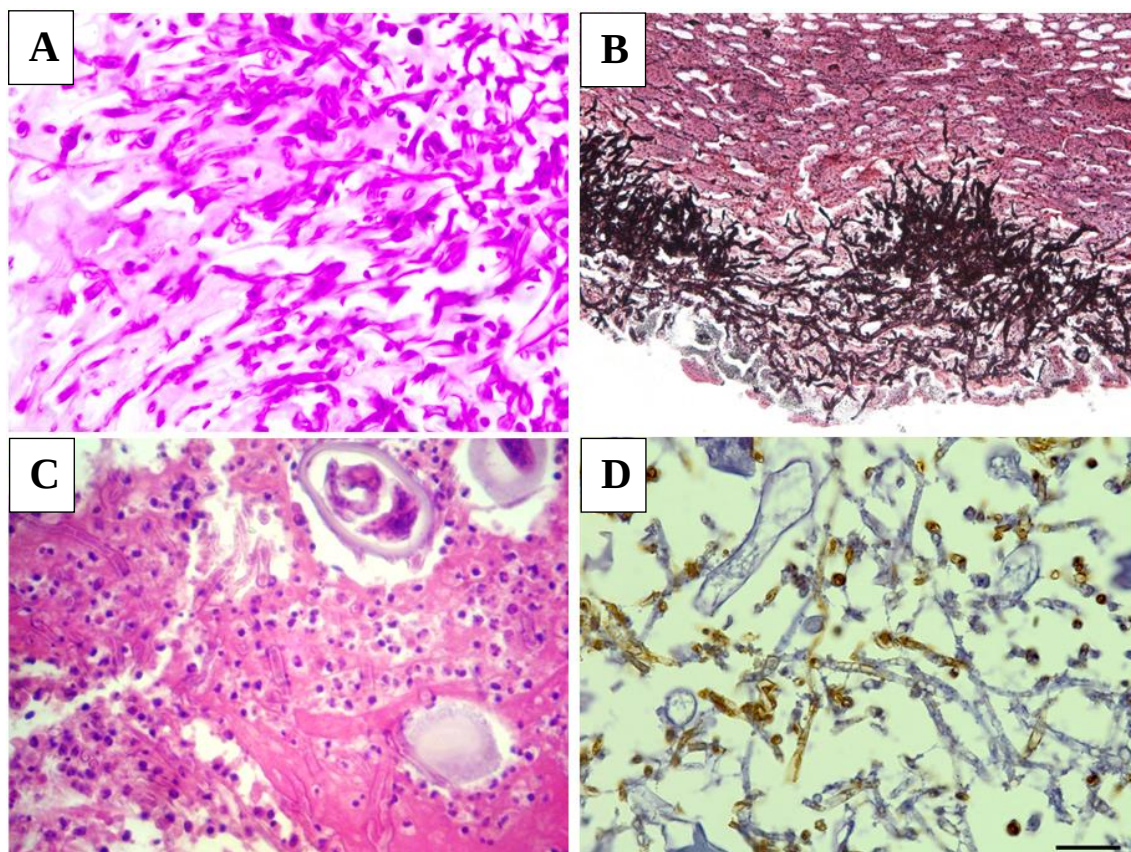


Figure 2. Microscopic aspects of the infection by *Aspergillus sp.* in wild and exotic birds in northeastern Brazil. **A.** Fragment of aspergillous granuloma with extensive areas of necrosis and multifocal elongated and septated fungal hyphae associated with moderated mononuclear inflammation. *Periodic acid-Schiff (PAS)*. 40x. **B.** Aspergillous nodule - presents a large concentration of elongated and septated fungal hyphae in an acute angle. *Gomori-Grocott*. 20x **C.** Fungal hepatitis associated with secondary parasitism, evidenced by the presence of septated hyphae interspersing the mononuclear inflammation and parasitic forms of *Capillaria hepatica*. Hematoxylin and Eosin. **D.** Positive immunohistochemical staining for *Aspergillus sp.* in the crop region. Counter-staining with Harris Hematoxylin. 40x.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças infecciosas são de grande importância dentro da clínica e patologia de aves silvestres e exóticas no nordeste do Brasil, com a criação dessas aves como pets e a aproximação do homem e dos animais domésticos dentro das áreas silvestres, existe uma preocupação diante do questionamento das espécies que efetivamente podem transmitir algumas doenças. Possuem um número significativo dentro do levantamento de casos de óbito e eutanásia, portanto além de ser uma causa-morte comum, é também importante a procura pelo diagnóstico correto, uma vez que podem transmitir diversas doenças para outros animais e humanos. Além das zoonoses, as aves têm um papel fundamental como reservatório dessas enfermidades.

Doenças infecciosas como bacterianas, fúngicas e causadas por protozoários devem ser investigadas, bem como a epidemiologia, clínica e os diversos aspectos patológicos que elas podem apresentar, pois é crescente o número de espécies identificadas como reservatórios e hospedeiros definitivos dessas doenças, portanto são necessários mais estudos com as demais espécies para uma investigação completa e efetivamente protocolar o papel dessas aves na disseminação das doenças infecciosas em todos os territórios possíveis.

