

# INCIDÊNCIA DE FUNGOS NA PRODUÇÃO DE PINTOS DE CORTE DE UM DIA DE IDADE

LIMA, Joel.S.Jr.<sup>1</sup>; PINTO, Diego.M.<sup>1</sup>; CARRASCO, Librado.O.<sup>2</sup>; SALGUERO, Francisco.J.B.<sup>2</sup>; MEIRELES, Mario.C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Veterinária – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Campus Universitário s/nº - Cep. 96 010 000 – CP 354 – Pelotas – RS – Brasil

<sup>2</sup>Universidad de Córdoba – Facultad de Veterinaria – Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas – Campus Universitario de Rabanales – Ctra Madrid – Cádiz s/nº - 14014 – Córdoba – España

(Recebido para publicação em 07/06/2000)

## RESUMO

Foram analisados 1397 pulmões de 700 pintos mortos ou inviáveis no nascedouro e 52 ovos não eclodidos, pertencentes a linhagem Ross. Com objetivo de estudar a flora micótica de um incubatório comercial, delineou-se o presente estudo. Cada pulmão foi dividido em 3 partes, destinados ao exame direto, ao cultivo e a histopatologia. No exame direto, todas as amostras foram negativas. No cultivo, 46,78% das amostras foram positivas para o *Penicillium* sp., 6,97% para *Aspergillus flavus* e 46,25% foram negativas. Na histopatologia, 10% das amostras (139) foram analisadas e apenas uma amostra foi positiva para *Penicillium* sp.. Entretanto, todas as amostras apresentaram alterações patológicas, tais como, a presença de exsudato catarral e algumas células inflamatórias (heterófilos) e células de descamação e em algumas amostras apresentaram atelectasia e revelaram a presença de fibrina. No exame micológico realizado dos ovos não eclodidos, obteve-se 73,07% de crescimento de *Penicillium* sp., sendo os demais negativos. O *Penicillium* sp. foi o fungo mais freqüente, tanto nos pulmões de pintos mortos ou inviáveis bem como nos ovos não eclodidos, sugerindo que este microrganismo, seja um agente patológico importante na avicultura comercial

Palavras-Chave: *Penicillium* sp., Ovos, Pintos, Incubatório, Fungos

## ABSTRACT

INCIDENCE OF FUNGI IN THE CHICKENS PRODUCTION WITH ONE-DAY-OLD. Lungs (1397) from 700 dead or hatchery-culled Ross chicks and 52 non-hatched eggs were analyzed for fungi population. Each lung was divided into three parts and direct examination, cultivating and histopathologic studies were performed. Negative samples were observed in direct examination. Among cultivated samples, 46.78% were positive for *Penicillium* sp. and 6.97% were positive for *Aspergillus flavus* and 46.25% were negative. For histopathologic studies, in 10% of analyzed samples (139), only one of them was positive for *Penicillium* sp.. However, all samples showed pathologic alterations, such as discharge exudation and inflammatory cells (heterophiles) and desquamating cells. Some cells showed atelectasy and developed fibrosis. Under micologic examination performed in more hatching eggs, 73.07% of them showed *Penicillium* sp. being the rest negative. These results indicate that *Penicillium* sp. was the most prevalent fungi, either in dead or non-hatched chick lungs, as well as in non-hatching eggs. These results suggest that this microorganism is an important pathologic agent in poultry

Key Words: *Penicillium* sp., Eggs, Chicks, Hatchery, Fungi

## INTRODUÇÃO:

Poucos seres vivos são capazes de se desenvolver nos mais diversos ambientes como os fungos. Tratando-se de organismos ubíquos podem ser encontrados em ambientes, extremamente, escasso ao seu desenvolvimento (ALOISI, 1996).

O *Aspergillus fumigatus*, é o agente micótico mais importante no setor avícola, acarretando enormes perdas econômicas devido a mortalidade embrionária durante o processo de incubação. Durante processo de eclosão pode infectar os pintos recém eclodidos levando a uma pneumiose (BRAEM, 1988) problemas respiratórios em aves adultas (BRAEM, 1988; CERVANTES, 1995).

Outras espécies de aves, também podem ser infectadas, tais como, os gansos, patos, pingüins e aves silvestres (PEÑA, 1971; RICHARD, 1997). Outros fungos filamentosos, podem estar ligados as perdas no incubatório, como é o caso do gênero *Penicillium* sp. (FRASER, 1991; CERVANTES, 1995; VILAR *et al.*, 1995; RICHARD, 1997), *Paecilomyces* sp., *Cephalosporium* sp., *Trichordema* sp., *Scopulariopsis* sp. e *Mucor* sp. (RICHARD, 1997).

Objetivou-se estudar a flora micótica em pintos mortos ou inviáveis e ovos não eclodidos após 504 horas de incubação no incubatório do CAVG-UFPel.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micologia e Bacteriologia (LMB) na Faculdade de Veterinária e no complexo avícola do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça – CAVG/UFPel, e a Histopatologia no laboratório de Anatomia y Anatomia Patológicas Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba – Córdoba - España.

Ovos não eclodidos e pintos mortos ou inviáveis, após 504 horas de incubação foram coletados, nos meses de abril de 1998 a fevereiro de 1999. Um total de 1 397 pulmões e 850 ovos foram analisados.

Os pintos inviáveis foram sacrificados e necropsiados, juntamente, com os mortos, de acordo com a técnica citada por ZANDER *et al.* (1997), a fim de coletar os pulmões para a análise. O órgão foi seccionado em três fragmentos, destinados ao exame direto, Isolamento (microcultivo) e ao histopatológico.

Exame Direto: Consiste na imersão dos fragmentos de pulmão em solução de Hidróxido de Potássio (KOH) a 20% (LACAZ, 1984). Os órgãos foram dissecados com auxílio de agulhas hipodérmicas esterilizadas sobre lâmina de microscopia e posteriormente imersos em uma gota desta solução, esperou-se 15 minutos para que o KOH reaja com o tecido clarificando-o tornando visível a presença de hifas compatíveis com o agente (CARRASCO *et al.*, 1997).

Isolamento: O meio utilizado foi ágar Sabouraud dextrose (Difco, 4% de Glicose) com cloranfenicol (Quimicetina, Sheringplough. 500mg ) (100mg/l), sendo acondicionado em placas de Petri (150mm x 20mm). As placas antes de serem utilizadas, permanecem na capela de fluxo laminar até o seu uso, afim de, evitar contaminação do meio e vir a influenciar na leitura final.

As placas foram conduzidas da capela em caixa plástica desinfetada com álcool iodado e tampadas afim de evitar uma contaminação do meio durante o deslocamento até a bancada.

Os fragmentos destinados ao cultivo foram submetidos a imersão em antibiótico a base de sulfato de estreptomicina (Sulfato de streptomycina, Imlab, cód 3770) à 5%, por um período de 5 minutos. A seguir os fragmentos foram semeados no meio de cultura, com o auxílio da alça de platina previamente flambada entre cada intervalo de semeadura, em cada placa de Petri, foram semeadas 6 fragmentos. Uma vez semeados os fragmentos, as placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica à uma temperatura de 28°C por um período entre 72 a 96 horas de incubação. Após este período, verificou-se o crescimento das colônias em amostras positivas sendo analisados os aspectos macro e micromorfológicos, como coloração da colônia de verso e reverso (FREY *et al.*, 1985; LACAZ, 1984).

O estudo da micromorfologia dos cultivos foi feito através de um fragmento da colônia entre lâmina e lamínula com solução de lactofenol azul de algodão (LACAZ, 1984). Com a alça de platina retirou-se um fragmento da colônia a qual foi colocada entre lâmina e lamínula com corante, sendo posteriormente visualizado ao microscópico ótico 400x, para definir o gênero e a possível espécie do agente. Quando não foi possível definir a classificação fungo através da análise de fragmento do cultivo foi procedido o microcultivo segundo RIDEL (1950).

Histopatologia: Os fragmentos destinados a histopatologia foram acondicionados em frascos de vidro contendo formalina tamponada a 10%. Do total das amostras enviadas a histopatologia, 10% dos fragmentos foram selecionados aleatoriamente e processados. As amostras previamente fixadas em blocos de parafina, foram submetidas a cortes histológicos de 5µm de espessura e corados pela técnica HE (Hematoxilina-Eosina). As amostras, também foram submetidas a colorações especiais pelo PAS (Periódico Acido Schiff) e GMS (Gormori Metanamine Silver). As colorações realizadas tiveram como finalidade a pesquisa de estruturas fúngicas e a presença de possíveis lesões pulmonares (PEDEN *et al.*, 1992; CARRASCO *et al.*, 1993; JENSEN *et al.*, 1996).

Ovos não eclodidos: Todos os ovos não eclodidos após 504 horas de incubação, foram levados ao LBM, para ser processado. Realizou-se a quebra, na região da câmara de ar buscando visualizar macroscopicamente, a presença do tapete

fúngico entre as membranas externa e interna do ovo (BRAEM, 1988; ECKMAN 1998). Ovos sem a formação do tapete foram interpretados como sendo negativos no exame micológico. Nos meses de junho e julho de 1998, foram cultivadas 52 amostras de cascas de ovos, em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (100mg/l).

## RESULTADOS

Pintos: Foi coletado um total de 1 397 pulmões de 700 pintos de corte de um dia de idade mortos e inviáveis no nascedouro, conforme a TABELA 1 no período de abril de 1998 a fevereiro de 1999.

TABELA 1- Frequência mensal de coleta de pintos e de pulmões cultivados (semeados)

Mês de coleta	Total de pintos coletados	Total de pulmões cultivados (semeados)
A	31	62
M	59	118
J	88	175
J	133	265
A	87	174
S	72	143
O	79	158
N	47	94
D	33	66
J	51	102
F	20	40
Total	700	1 397

Das 1397 (100%) amostras de pulmões submetidos aos cultivos no LMB, 631 (46,78%) apresentaram crescimento de fungos do gênero *Penicillium* sp., 94 (6,97%) do *Aspergillus flavus* e em 624 (46,25%) não se obteve crescimento fúngico conforme mostra a TABELA 2 e Figura 1. Das 631 amostras positivas para fungos (100%), quando considerada a coleta mensal foi observado que inicialmente houve um pico de isolamento de *A. flavus*, no primeiro mês (abril) de coleta com 59,67% (37) caindo praticamente a 0 no mês seguinte e assim se mantendo com baixa frequência até o final do experimento com um pequeno pico no mês de janeiro com 31,37% (32). Enquanto o *Penicillium* sp., teve uma frequência de isolamento crescente a partir do mês de abril chegando a 75,84% (201) no mês julho, diminuindo a frequência entre os meses de setembro e novembro tornando a aumentar nos meses de janeiro e fevereiro quando atingiu 85,01% (34), conforme mostra a TABELA 3 e a Figura 2.

TABELA 2- Frequência de fungos filamentosos isolados de pulmões de pintos inviáveis e mortos no nascedouro

Fungos	F	%
<i>Aspergillus flavus</i>	94	6,97%
<i>Penicillium</i> sp.	631	46,78%
S/Crescimento	624	46,25%
Total	1 349	100%

F: Frequência Absoluta

%: Frequência Relativa

Segundo o monitoramento mensal dos fungos filamentosos, *A. flavus* e *Penicillium* sp., apresentados na Figura 2, com predominância do *Penicillium* sp. em relação ao *A. flavus*, sugere um certo controle biológico no ambiente em estudo. O resultado do plaqueamento do ambiente do

nascidouro revelou a predominância total do gênero *Penicillium* sp. no mês de julho o que reforça a hipótese do predomínio do *Penicillium* sp. em relação aos demais fungos do ambiente.

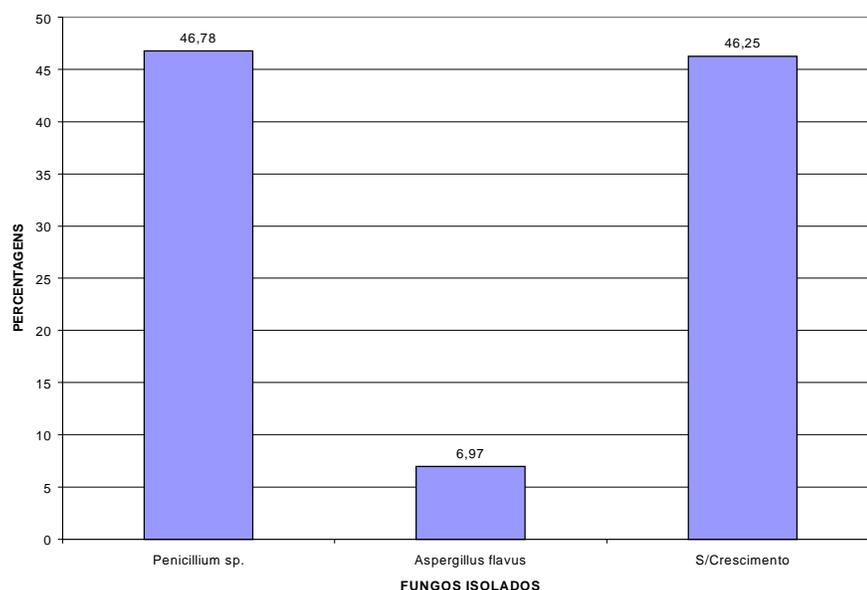


Figura 1- Frequência de fungos isolados de pulmões de pintos inviáveis e mortos no nascidouro

TABELA 3- Frequência dos fungos isolados dos pulmões de pintos mortos e inviáveis no nascidouro

MÊS DE CULTIVO	FUNGOS ISOLADOS			
	<i>Penicillium</i> sp.		<i>Aspergillus flavus</i>	
	F	%	F	%
A	0	0,00	37	59,67
M	43	36,41	0	0,00
J	115	65,71	0	0,00
J	201	75,84	0	0,00
A	63	36,20	16	9,19
S	18	12,58	2	0,00
O	66	41,77	0	0,00
N	15	15,95	4	4,25
D	24	36,36	1	1,25
J	52	50,98	32	31,37
F	34	85,01	2	5,01
Total	631		94	

F: Frequência Absoluta

%; Frequência Relativa

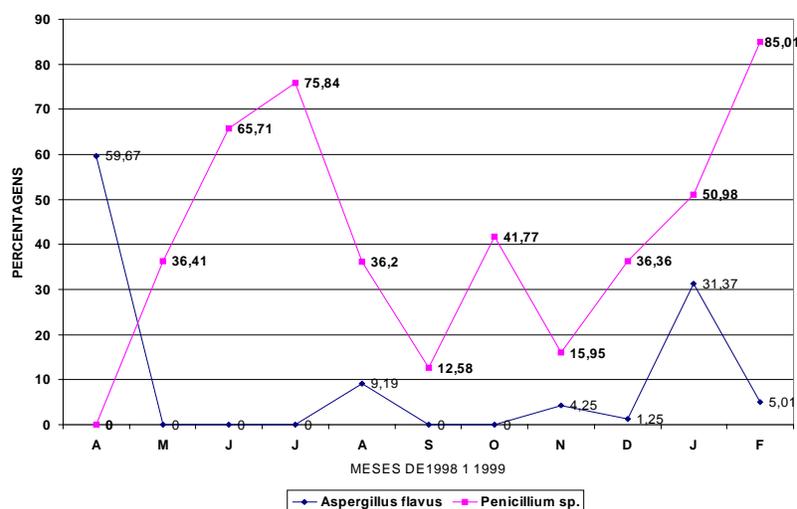


Figura 2- Frequência de *A. flavus* e *Penicillium* spp. isolados de pulmões de pintos inviáveis e mortos, segundo o mês da coleta.

Patologia: Das 139 amostras enviadas para o histopatológico, apenas uma apresentava bronquite, acompanhado por um exsudato catarral e algumas células inflamatórias (heterófilos), com numerosas hifas com paredes irregulares, ramificadas, septadas e com diâmetro de 2 a 4 micras. Estas hifas são morfológicamente compatíveis com o *Penicillium* sp., quando impregnado pela prata através da coloração de GMS e pela coloração de PAS, conforme mostra as Figuras 3 e 4

No restante das amostras, não foram observados a presença de hifas, porém apresentavam nos brônquios exsudato catarral e células descamação. No parênquima pulmonar foi freqüente a presença do fenômeno de atelectasia e algumas amostras revelaram a presença de fibrina (LIBRADO, 2000). Estes tipos de alterações pulmonares pressupõem, a presença do fungo nas vias respiratórias altas, a exemplo do que ocorre na aspergilose e na candidíase segundo TSAI *et al.* (1992). A presença da atelectasia, encontrada na maioria das amostras de pulmões analisadas, segundo AHO *et al.* (1990), deve-se a infecção por *Penicillium* sp nas vias aéreas superiores o que leva a formação deste fenômeno pela falta de ar.

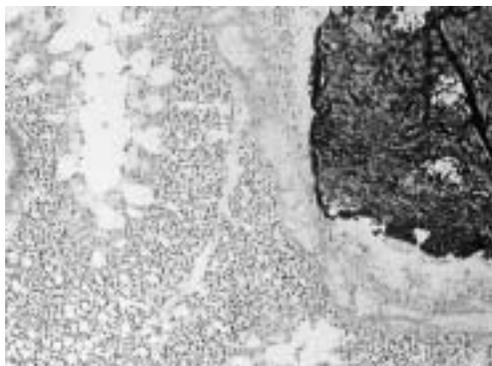


Figura 3 - Pulmão positivo, presença de hifas coloração de GMS, 10x.

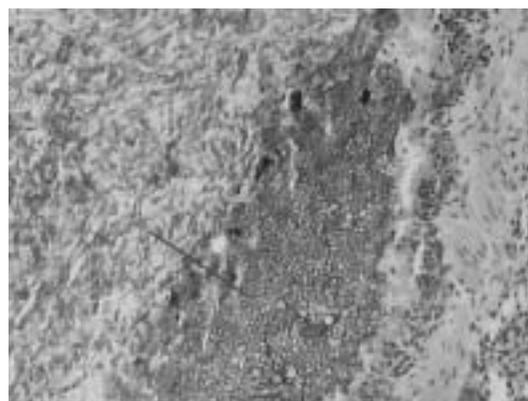


Figura 4 - Pulmão positivo, presença de hifas coloração de PAS, 400x Ovos não eclodidos:

Do total de 850 ovos não eclodidos coletados após 504 horas de incubação, no período de abril de 1998 a fevereiro de 1999. Nenhuma amostra apresentou macroscopicamente a presença do tapete fúngico, durante o processo de quebra. Ovos sem a formação do tapete foram interpretados como sendo negativos no exame micológico. Das 52 amostras de cascas de ovos cultivadas no LMB, 38 (73,07%), apresentaram crescimento de fungos do gênero *Penicillium* sp. e 14 (26,93%) não apresentaram crescimento.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o *Penicillium* sp. (TABELA 2 e 3, Figura 1 e 2) isolados dos pulmões de pintos de corte de um dia de idade mortos e inviáveis no nascedouro após 504 horas de incubação e da casca dos ovos cultivados no período entre junho e julho de 1998, estão relacionados com a mortalidade embrionária e são compatíveis com os resultados obtidos por autores como FRASER (1991), EL-GHARIB (1993), CERVANTES (1995), VILAR *et al.* (1995), RICHARD (1997).

\* Comunicação Pessoal - Prof. Titular, Facultad de Veterinaria – Universidad de Córdoba – Córdoba - España

Segundo EL-GHARIB, *et al.* (1993), em trabalho semelhante, isolaram os mesmos fungos descritos na TABELA 1 e Figura 1, crescendo do *A. fumigatus*, para qual não foi obtido nenhum isolamento no presente trabalho. Os mesmos autores, apesar dos resultados semelhantes quanto a redução da eclodibilidade e aumento da mortalidade embrionária, obtiveram menor frequência de isolamento de fungos com 3,7% *A. flavus*; 3,5% *Penicillium* spp. e 1% *A. fumigatus*.

O *Penicillium* sp., segundo os resultados obtidos, é o principal fungo responsável pela baixa eclodibilidade e mortalidade embrionária nas condições experimentais do presente trabalho e que de acordo com VILAR *et al.* (1995), quando inocularam experimentalmente o *Penicillium* sp em ovos férteis de codorna (*Coturnix coturnix japonica*), observaram que os ovos, mesmo infectados, apresentaram desenvolvimento do embrião, porém com uma elevada mortalidade embrionária e baixa frequência de eclosão.

A aspergilose aviária em animais jovens, é descrita como uma das principais enfermidades na exploração econômica de aves de produção comercial, e o fungo pode estar presente em órgãos como, os pulmões e os sacos aéreos, ocasionando a mortalidade do embrião e aves jovens (FRASER, 1991; EL-GHARIB, 1993; CERVANTES, 1995; VILAR *et al.*, 1995; RICHARD, 1997). Todos os autores citados anteriormente afirmam que o agente micótico mais freqüente determinando este tipo de problema é o *Aspergillus* sp., seguido do *Penicillium* sp., entretanto RICHARD (1997) descreve a presença de outros fungos como, *Paecilomyces* sp., *Cephalosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Scopulariopsis* sp. e *Mucor* sp., FRASER *et al.* (1991) e CERVANTES (1995), descrevem o *Penicillium* sp., como sendo um agente micótico capaz de induzir sérias perdas, devido a infecções respiratórias em frangos de corte, porém o *A. fumigatus*, é o mais patogênico e responsável por problemas respiratórios.

Os resultados obtidos com predominância do *Penicillium* sp. diferem da maioria dos autores citados quanto a frequência de isolamento (FRASER, 1991; CERVANTES, 1995; RICHARD, 1997), entretanto, há citações de ocorrência no mesmo nível para *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (FRASER, 1991; CERVANTES, 1995). Assim sendo, podemos afirmar que nas condições em que foi conduzido o trabalho, o *Penicillium* sp. é o fungo mais freqüente na determinação de perdas no incubatório, seguido do *A. flavus* TABELA 1 e Figura 1. Resultados estes que podem ter tido origem na contaminação ambiental do nascedouro, demonstrado através da exposição de placas, que revelou a presença de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. na proporção de 20/1.

## CONCLUSÃO

*Penicillium* sp. é o fungo isolado com maior frequência em pulmões de pintos mortos e inviáveis e na superfície dos ovos não eclodidos no incubatório do CAVG/UFPel, seguido do *A. flavus*.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos professores funcionários e a direção do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça – UFPel, por

cederem o material para o presente trabalho, ao laboratório de Micologia e Bacteriologia da faculdade de Veterinária/UFPel, a Faculdade de Veterinária - Universidad de Córdoba – Córdoba – España e aos Professores Fernando Rutz e Cláudia Camerini Corrêa Pérez, pela ajuda na confecção deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOISI, G. Aspergilosis, una enfermedad ambiental. **Avicultura Profesional**, Santiago de Chile – Chile, v. 14, n. 2, p.18-19, 1996.
- AHO, R.; WESTERLING, B.; AJELLO, L.; PADHYE, A.A.; SDNSON, R.A. Avian penicilliosis caused by *Penicillium griseofulvum* in a captive toucanet. **Journal of Medical and Veterinary Micrology**, v.28, p. 349 – 354, 1990
- BRAEM, G. Limiting aspergillus in the hatchery. **International Hatchery Practice**, v. 2, n. 8, p. 11- 13, 1988
- CARRASCO, L.; TARRADAS, M.C.; VILLAMANDOS, J.C.G.; LUQUE, I.; ARENAS, A.; MÉNDEZ A. Equine Pulmonary Mycosis due to *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*. **J. Comp. Path.**, v 117, p. 191-199, 1997.
- CERVANTES, H. Evaluación y Manejo de los Problemas Respiratórios en pollos de Engorde. **Avicultura Profesional**, Santiago de Chile – Chile, v. 13, n. 2, p.76 - 84, 1995.
- EL-GHARIB, I.; ELDIN, A.M.W.K.; BASTAMI, M.A.; WAHBA, S.; SAFWAT, E.E.A.; HATEM, E. Incidence of Isolation of Microorganisms Leading to Embryonic Mortalities and Reducing Hatchability of Duck Eggs. **Veterinary Medical Journal Giza**, v. 41, n. 3, p. 63 – 65, 1993
- FRASER, C.M. Aspergilose In: **Manual Merck de Veterinária**, 1991, p.1439 – 1440
- FREY, D.; OLDFIELD, R.J.; BRIDER, R.C. Aspergilosis. In: **A Colour Atlas of Pathogenic Fungi**, London, Wolfe Medical Publications LTD, p. 90 – 93, 1985.
- JENSEN, H.E.; MONTEROS, A.E.; CARRASCO, L. Caprine Mastitis due to Aspergillosis and Zygomycosis: a Pathological and Immunohistochemical Study. **J. Comp. Path.**, v. 114, p. 183-191, 1996.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**, Sarvier, 1984, p. 431 – 433.
- PEDEN, W.M.; RHOADES, K.R. Pathogenicity Differences of Multiple Isolates of *Aspergillus fumigatus* in Turkeys. **Avian Diseases**. v 36, p. 537-542, 1992.
- PEÑA, C.E. Aspergilosis. In: **Human Infection With fungi, Actinomicetos and Algae**, New York, Springer – Verlag, p. 762 – 821, 1971
- RIDEL, R.W.. **Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture, Mycologia**, v 42, p. 265 – 270, 1950
- RICHARD, J.L. Aspergilosis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 351 - 360
- TSAI, S.S; PARK, J.H.; HINAI, K.; ITAKURA, C. Aspergilosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. **Avian Pathology**, v. 22, p. 699 – 709, 1992
- VILAR, E.A.; VILELA, S.M.O.; SAUKAS, T.N. Infecção de Embriões de Codornas (*Coturnix coturnix japonica*) por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. In: CONFERÊNCIA DA APINCO DE CIÊNCIA E TÉCNOLOGIA AVICOLAS, 1995, Campinas, **Anais** . Campinas, SP: Associação dos Produtores de Pintos de Corte (APINCO), 1995, p. 143 – 144
- ZANDER, D.V.; BERMUDEZ, A.J.; MALLINSON, E.T. Principles of Diseases Prevention: Diagnosis and Control. In: BARNES, H.J., BEARD, B.W., McDOUGOLD, L.R. & SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 03 - 45