

ASPERGILOSE SISTÊMICA EM POTRO (*Equus caballus*)

(*Systemic aspergillosis in a foals - Equus caballus*)

Jéssica Line Farias de LIMA¹; Fabiano da Rosa VENANCIO¹; Leonardo Schuler FACCINI¹; Carolina Buss BRUNNER¹; Angelita dos Reis GOMES²; Taís Scheffer DEL PINO³; Josiane BONEL¹

¹Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Campus Universitário, S/N, Capão do Leão/RS. CEP: 96.160-000; ²Hospital de Clínicas Veterinárias (UFPEL); ³Laboratório de Micologia Veterinária (UFPEL). *E-mail: jessicalinefs@gmail.com

RESUMO

O gênero *Aspergillus* compreende espécies de fungos saprotróficos, globalmente distribuídos, sendo os *Aspergillus* seção *Fumigati* conhecidos por causarem doença em humanos e animais imunocomprometidos. Os sinais clínicos dependem do sistema acometido, podendo apresentar febre branda, cólicas intensas, pneumonias, micose de bolsa gutural, e, ocasionalmente, lesões no sistema nervoso central. O presente trabalho objetiva relatar os sinais clínicos, os achados de necropsia e a histologia de um caso de aspergilose sistêmica em um potro de oito meses de idade. O animal apresentava refluxo enterogástrico, peristaltismo aumentado, fezes pastosas, dor abdominal e desidratação intensa. O quadro clínico evoluiu para óbito e o cadáver foi encaminhado para a necropsia. Macroscopicamente, havia sufusões e equimoses na serosa do trato gastrointestinal e ulcerações na mucosa do intestino delgado. No pulmão, havia nódulos multifocais, esbranquiçados e firmes que, ao corte, apresentavam-se císticos, com revestimento interno vinhoso e friável. O coração exibia áreas esbranquiçadas multifocais no miocárdio e os rins continham nódulos avermelhados nas regiões cortical e medular. No encéfalo, havia áreas multifocais amareladas e hemorrágicas com bordos avermelhados. Microscopicamente, observaram-se áreas multifocais de necrose com infiltrado inflamatório granulomatoso no intestino, pulmão, encéfalo, miocárdio e nos rins. Hifas fúngicas intralesionais e intravasculares foram observadas no encéfalo e no pulmão. Estruturas de fenótipo compatível com *Aspergillus fumigatus* foram observadas na cultura fúngica. Amostras encaminhadas para virologia apresentaram-se positivas para Herpesvírus Equino (HVE) tipo 1 e 4. O diagnóstico de aspergilose sistêmica foi determinado pelo histórico clínico, imunossupressão, achados macroscópicos, histológicos, isolamento do fungo e à infecção concomitante por HVE.

Palavras-chave: Fungemia, *Aspergillus* sp., equino.

ABSTRACT

The *Aspergillus* genus comprises globally distributed species of saprotrophic fungi, with the *Aspergillus* section *Fumigatus* known to cause diseases in humans and immunocompromised animals. Clinical signs depend on the affected system, exhibiting mild fever, severe colic, pneumonia, guttural bag mycosis and occasionally lesions in the central nervous system. The present work aims to report the clinical signs, necropsy findings and histology of a case of systemic aspergillosis in an eight-months-old foal. The animal had enterogastric reflux, increased peristalsis, pasty feces, abdominal pain and severe dehydration. The condition evolved to death and the cadaver was sent for necropsy. Macroscopically, there were suffusions and ecchymosis in the serosa of the gastrointestinal tract and ulcerations in the mucosa of the small intestines. In the lung, there were multifocal, whitish and firm nodules that were cystic when cut with a friable winey internal lining. The heart had whitish multifocal areas in the myocardium and the kidneys contained reddish nodules in the cortical and medullary regions. In the brain there were yellowish and hemorrhagic multifocal areas with reddish borders. Microscopically, multifocal areas of necrosis with granulomatous inflammatory infiltrate were observed in the intestine, lung, brain, myocardium and kidneys. Intralesional and intravascular fungal were observed in the brain and lung. Structures with phenotype compatible with *Aspergillus fumigatus* were observed in the fungal culture. In virology, samples were positive for equine herpesvirus (HVE) types 1 and 4. The diagnosis of systemic aspergillosis was determined due to the clinical history, immunosuppression, macroscopic and histological findings, fungal isolation and concomitant HVE infection.

Key words: Fungemia, *Aspergillus* sp., equine.

INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* compreende 344 espécies de fungos saprotróficos, globalmente distribuídos, que são termotolerantes e resistentes a diversos pHs, podendo ser isolados de vários ambientes como ar, solo, poeira, matéria orgânica em decomposição (SAMSON *et al.*, 2014). Dentre esses, *Aspergillus* seção *Fumigati* são conhecidos por causarem doenças em humanos e animais imunocomprometidos (FRISVAD e LARSEN, 2016).

Em equinos, a aspergilose se apresenta como uma infecção primariamente respiratória, sendo frequentemente descrita acometendo as narinas e a cavidade nasal. Animais imunossuprimidos são mais suscetíveis à infecção, podendo desenvolver broncopneumonia aguda com evolução para a crônica. A proliferação fúngica ocasiona uma destruição vascular e o fungo pode se disseminar via hematogênica para órgãos como rins, trato gastrointestinal, fígado, baço, sistema nervoso central e glândula mamária, em bovinos (PERES *et al.*, 2008).

O *Aspergillus fumigatus* é o agente mais comum em infecções sistêmicas nos animais, uma vez que produz endotoxinas, hemolisinas e enzimas proteolíticas que favorecem o estabelecimento da doença e sua disseminação (PERES *et al.*, 2008). Em equinos, já foram descritos casos de lesões cutâneas, abortos, ceratomíose, pneumonias, lesões em bolsa gútural e, mais raramente, doença sistêmica (ALVES *et al.*, 2018).

A sintomatologia de aspergilose é inespecífica na maioria dos casos, pois depende do sistema acometido. Os sinais clínicos podem variar de febre branda até quadros de cólica intensa, quando há lesão intestinal. Em casos de pneumonias e micose de bolsa gútural por *Aspergillus* sp., os sinais caracterizam-se principalmente por dispnéia, intolerância ao exercício, disfagia e epistaxe. Abortos no terço final da gestação podem ocorrer quando há placentite necrótica. Sinais nervosos são observados com menor frequência, quando ocorrem lesões no sistema nervoso central (PERES *et al.*, 2008; ZOPPA *et al.*, 2008; GALIZA *et al.*, 2014).

Aspergilose pulmonar, embora relativamente incomum em equinos, tem sido associada à enterocolite, muitas vezes devido à infecção por *Salmonella* spp., sendo menos frequentes em outras infecções entéricas (BRESHEARS *et al.*, 2007). A pneumonia desenvolvida, causada por fungos oportunistas, pode ter evidências de uma doença debilitante ou um problema imunossupressor, como colite, peritonite, septicemia, endotoxemia, endocrinopatia ou pneumonia bacteriana crônica. Na maioria dos casos de aspergilose pulmonar, a pneumonia parece ser uma seqüela de uma invasão micótica do trato intestinal, do qual a integridade foi comprometida por uma enterocolite aguda grave (AINSWORTH e CHEETHAM, 2010).

Microscopicamente, as lesões observadas nos diferentes órgãos caracterizam-se por áreas de necrose, infiltrado inflamatório granulomatoso ou piogranulomatoso e presença de hifas fúngicas em meio ao tecido necrótico. O diagnóstico de aspergilose baseia-se na história clínica, na epidemiologia, nos achados macroscópicos e microscópicos, bem como no isolamento e identificação do fungo, podendo ser realizadas, ainda, técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALVES *et al.*, 2018).

O presente trabalho tem como objetivo relatar um caso de aspergilose sistêmica em um potro de oito meses de idade, diagnosticado no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

ATENDIMENTO AO PACIENTE

Foi recebido no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), da Universidade Federal de Pelotas, um equino macho, Puro Sangue Inglês, com oito meses de idade, proveniente de um Haras da Cidade de Bagé/RS.

A informação obtida, através do médico veterinário do Haras, foi que o animal era mantido em regime extensivo e apresentou, inicialmente desconforto abdominal. Na avaliação clínica inicial, foi observado que o potro apresentava refluxo enterogástrico, peristaltismo aumentado e fezes pastosas. Sendo assim, foi tratado, na propriedade, com associação de antibióticos (Gentamicina e Ceftiofur), de anti-inflamatório e de protetor gástrico.

No HCV, o potro chegou apático e demonstrando sinais de desconforto e dor abdominal. Foram realizados exame clínico geral e exames complementares de análise clínica e imagem (ultrassom abdominal). O hemograma revelou uma desidratação intensa, sem presença de leucocitose. No exame ultrassonográfico da cavidade abdominal não foram reveladas alterações.

A terapêutica clínica instituída foi fluidoterapia com Ringer Lactato, Solução hipertônica 7,5%, coloide e plasma, para restabelecer o nível de proteínas no sangue. A terapia com antibióticos, instaurada desde os primeiros sinais clínicos, foi mantida durante o internamento, porém com o uso de Eritromicina e Rifampicina. Também, se prosseguiu com o uso de anti-inflamatórios (esteroidal e não esteroideal) e protetor de mucosa gástrica e intestinal, juntamente com monitoramento intensivo do paciente. No decorrer da internação, o animal apresentou diarreia líquida, andar cambaleante e febre intermitente, além de secreção nasal serosa e estertor traqueal. Após dez dias de internamento, sem melhora, o quadro clínico evoluiu para o óbito e o cadáver foi encaminhado para o exame de necropsia, no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da UFPel.

Fragmentos de órgãos das cavidades abdominal e torácica, bem como o encéfalo foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%. Após 48 horas, os fragmentos de tecido fixados em formalina foram clivados, incluídos em parafina, cortados em seções de 3µm de espessura e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e por colorações especiais de Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS). Amostras frescas de pulmão, fígado, encéfalo e intestino foram encaminhadas ao laboratório de micologia da UFPel. Fragmentos teciduais das amostras foram analisados no exame de microscopia direta, através da adição de solução de 20% de hidróxido de potássio.

A cultura fúngica foi realizada através da fragmentação das amostras, com auxílio de bisturi estéril, posteriormente foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud-dextrose (SDA), suplementado com cloranfenicol (30mg/100mL). Em seguida, as placas foram incubadas em estufas microbiológicas com temperaturas ajustadas em 25 e 37 °C por sete dias, sendo avaliadas quanto ao crescimento fúngico a partir do segundo dia. A identificação foi realizada a partir de características macro e micromorfológicas. As características macromorfológicas avaliadas consistiram no tamanho da colônia, nas características dos bordos, na textura, no relevo e na pigmentação, já as características micromorfológicas foram avaliadas através do exame direto de alíquota da colônia, utilizando coloração de lactofenol azul de algodão. Posteriormente, a colônia foi repicada em duplicata

em placas de Petri contendo meio ágar Czapek, sendo incubada e avaliada da mesma forma anterior.

Fragments frescos de pulmão e encéfalo foram submetidos ao diagnóstico molecular, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, para pesquisa de *Herpesvirus* Equino no laboratório de virologia da mesma Universidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação macroscópica, foram observadas sufusões e equimoses na serosa do trato gastrointestinal e ulcerações na mucosa do intestino delgado. No pulmão, havia nódulos multifocais, esbranquiçados e firmes, medindo até 1,0cm de diâmetro. Foi observada, ainda, área abaulada na superfície pleural, medindo 9,0cm no maior eixo (Fig. 01A), que, ao corte, apresentava-se cística com revestimento interno vinhoso e friável (Fig. 01B). O coração exibiu áreas esbranquiçadas multifocais no miocárdio (Fig. 01C) e os rins continham nódulos avermelhados de até 0,7cm, nas regiões cortical e medular. No encéfalo, na região de córtex frontal e de núcleos da base, havia áreas multifocais amareladas e hemorrágicas, com bordos avermelhados (Fig. 01D).

No exame histopatológico do intestino, foram observadas na mucosa do órgão, áreas multifocais de necrose, com conseqüente fusão de vilosidades, infiltrado inflamatório neutrofílico difuso e debris celulares, além de miríades bacterianas no lúmen. No pulmão, havia áreas multifocais a coalescentes de necrose, com infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos, macrófagos espumosos e raros linfócitos, debris celulares e estruturas intralésionais compatíveis com hifas fúngicas (Fig. 02). Os vasos sanguíneos pulmonares apresentavam acentuada congestão, além da presença multifocal de trombos compostos de fibrina, neutrófilos, hifas fúngicas, hemácias e moderada vasculite.

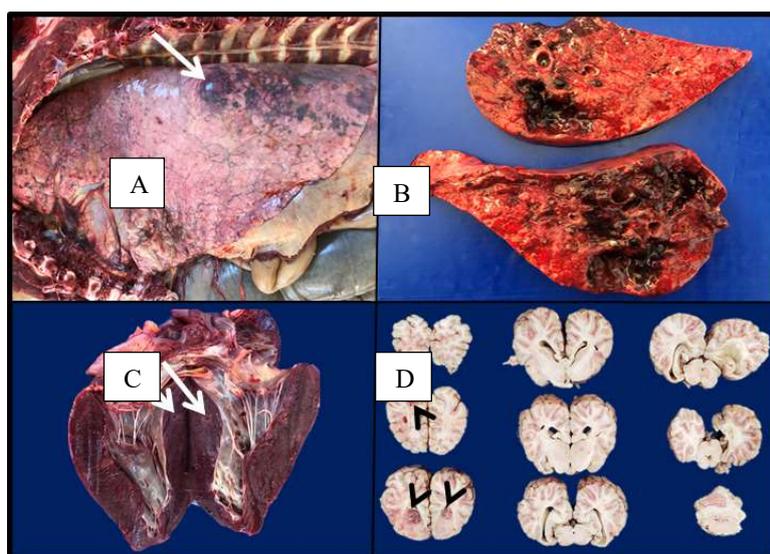


Figura 01: Aspergilose sistêmica em potro (*Equus caballus*).

Obs.: A = Pulmão exibindo áreas multifocais enegrecidas com abaulamento da superfície pleural (seta). B = Pulmão ao corte exibindo extensas áreas de necrose e hemorragia. C = Coração apresentando áreas com bordos esbranquiçados multifocais no miocárdio (setas). D = Sistema nervoso central exibindo áreas multifocais de necrose e hemorragia (cabeças de setas).

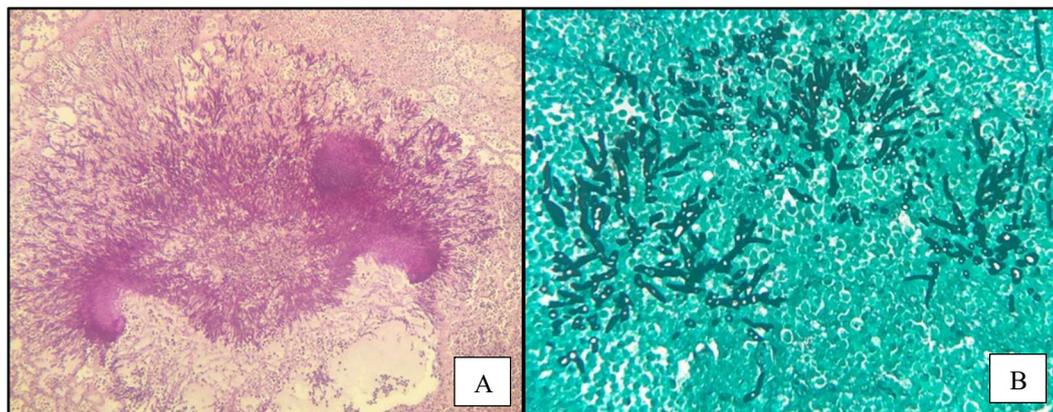


Figura 02: Aspectos microscópicos na Aspergilose sistêmica em potro.

Obs.: Pulmão. A = Estruturas fúngicas intralesionais - coloração especial de Schiff (PAS), objetiva de 10x; B = Hifas fúngicas na coloração especial de Metenamina de Prata de Grocott-Gomori, objetiva de 40x.

No encéfalo, foram observadas áreas multifocais de malácia associadas à acentuada hemorragia, ao infiltrado inflamatório de neutrófilos, aos plasmócitos e raros macrófagos, à vasculite, à trombose, com presença de hifas fúngicas intravasculares, e à necrose fibrinóide de pequenos vasos. Lesões semelhantes foram observadas em miocárdio e rins. Nas colorações especiais de Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Metenamina de Prata de Grocott-Gomori foi evidenciada a presença de hifas fúngicas em meio às áreas de necrose observadas em diversos órgãos.

No exame de microscopia direta dos fragmentos teciduais das amostras encaminhadas à micologia, não foram visualizadas estruturas fúngicas. Contudo, resultados “negativos” não excluem a infecção fúngica (ALEXANDER e PFALLER, 2006). A cultura fúngica em Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol apresentou colônia plana de crescimento rápido, verso com coloração verde-acinzentada e reverso marfim, textura aveludada. No meio ágar Czapek, apresentou, a colônia, verso com coloração verde-azulada e reverso creme-amarelado tornando-se marrom escuro. Microscopicamente, foram visualizadas cabeças conidiais colunares, vesículas piriformes com fiáides unisseriadas, conidióforos de parede lisa, ausência de métula e conídios azul-acinzentados, hifas hialinas septadas e grossas, apresentando características fenotípicas compatíveis com *Aspergillus fumigatus*.

Na virologia, as amostras encaminhadas apresentaram-se positivas para Herpesvírus Equino (HVE) tipo 1 e 4.

O diagnóstico de uma infecção fúngica sistêmica foi determinado devido à presença de hifas intralesionais nos diversos órgãos e em vasos sanguíneos adjacentes, demonstrando, assim, a disseminação da infecção por via hematogênica. Conforme recomendações do Infectious Disease Society (IDSA) sobre aspergilose humana, enquanto as ferramentas moleculares não estiverem amplamente disponíveis em laboratórios clínicos, é recomendado que o diagnóstico seja realizado através de amostras de tecidos e fluidos, submetidas ao exame histopatológico/citológico e de cultura, simultaneamente (PATTERSON *et al.*, 2016), como no caso do presente trabalho. Especificamente sobre o diagnóstico de aspergilose em animais, Elad e Segal (2018) afirmam que o diagnóstico definitivo é baseado na manifestação clínica, apoiada e confirmada por meios laboratoriais, envolvendo a abordagem clássica de demonstração do

agente etiológico nas amostras clínicas e na cultura, na demonstração histológica da invasão de hifas nos tecidos e isolamento e identificação primária do fungo, com base em sua morfologia.

Doenças fúngicas são pouco frequentes em animais domésticos, sendo os equinos uma das espécies mais acometidas, entretanto, a aspergilose sistêmica é raramente descrita nesses animais (GALIZA *et al.*, 2014). Infecções por *Aspergillus* spp. em equinos, na maioria dos casos, são localizadas, como as observadas em placentites, endometrites, ceratomicoses e granulomas nasais (MACHADO *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2007; PERES *et al.*, 2008; GALERA *et al.*, 2012).

Em 2018, ALVES *et al.* relataram um caso de aspergilose sistêmica, causada pelo *Aspergillus flavus* em uma égua prenhe, onde o quadro clínico e as lesões macroscópicas e microscópicas descritas foram semelhantes aos observados no presente caso. Dessa forma, torna-se evidente em infecções fúngicas sistêmicas o caráter oportunista do agente, pois em outros relatos a enfermidade também se encontra associada a uma doença primária debilitante.

Infecções pelo Herpesvírus Equino (HVE) estão relacionadas ao aborto, à doença respiratória e à doença neurológica. Potros infectados durante o primeiro ano de vida, manifestam doença febril e aguda, que pode levar à morte, em razão de infecções secundárias (CUNHA *et al.*, 2002). No presente caso, o potro havia apresentado uma colite com posterior terapia antimicrobiana prolongada, infecção por HVE tipo 1 e 4 e imunossupressão, que provavelmente contribuíram para infecção fúngica sistêmica.

CONCLUSÕES

A sintomatologia da aspergilose sistêmica, em equinos, é inespecífica, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico clínico da doença. Tendo em vista o presente relato, a infecção por *Aspergillus* spp deve ser considerada e prevenida em casos de imunossupressão decorrente do uso prolongado de antimicrobianos e infecção concomitante por vírus, tais como o Herpesvírus Equino e outras enfermidades, como as colites comuns em equinos.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M., CHEETHAM, J. In: STEPHEN, M.R.; WARWICK, M.B.; DEBRA, C.S., Equine Internal Medicine, 3ª ed., Saunders Elsevier, St. Louis, p.317–408, 2010.
- ALEXANDER, B.D.; PFALLER, M.A. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clinical Infectious Diseases*, v.43, p.15-27, 2006.
- ALVES, R.C., BORGES, I.L.; DUTRA, V.; JUNIOR, F.G.; NETO, E.G.M.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G. J.N. Systemic Infection by *Aspergillus flavus* in a Mare. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.46, Suppl 1, p.345, 2018. http://www.ufrgs.br/actavet/46-suple-1/CR_345.pdf
- AMARAL, M.G., C.A.; PIMENTEL, M.; MEIRELES, S.M.; FIALA, R.; SCHRAMM, E.G.; XAVIER, E.M.; MENDONÇA, M. Endometrite Equina Fungos e Bactérias. *Archivos de Zootecnia*, v.56, n.216, p.875-884, 2007.

BRESHEARS, M.A.; HOLBROOK, T. C.; HAAK, C. E.; YORK, P. A. Pulmonary Aspergillosis and Ischemic Distal Limb Necrosis Associated with Enteric Salmonellosis in a Foal, *Veterinary Pathology*, v.44, p.215–217, 2007.

CUNHA, E.M.S.; FERRARI, C.I.L.; LARA, M.C.C.S.H.; SILVA, L.H.Q. Presença de anticorpos contra o herpesvírus 11 equino 1 (HVE-1) em equinos do noroeste do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, p.1-5, 2002.

ELAD, D.; SEGAL, E. Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis. *Frontiers in Microbiology*, v.9, p.1-13, 2018.

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1–14, 2016.

GALERA, P.D.; MARTINS, B.C.; LAUS, J.L.; BROOKS, D.; Ceratomicose em Equinos. Ceratomicose em equinos. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.42, n.7, p.1223-1230, 2012.

GALIZA, G.J.N.; SILVA, T.M.; CAPRIOLI, R.A.; BARROS, C.S.L.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A.; LOVATO, M.; KOMMERS, G.D. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.34, n.3, p.224-232, 2014.

MACHADO, M.L.S.; OLIVEIRA, L.O.; BECK, C.A.C.; CONCEIÇÃO, M.S.N.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Ceratomicose eqüina causada por *Aspergillus flavus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.219-223, 2005.

PERES, J.A.; ZULPO, D.L.; LOPES, J.B.; FILADELPHO, A.L.; GUERETZ, J.S. Placentite fúngica em eqüino: relato de caso. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.4 n.2, p.301-305, 2008.

PATTERSON, T.F.; THOMPSON, G.R.; DENNING, D.W.; FISHMAN, J.A.; HADLEY, S.; HERBRECHT, R.; MARR, K.A.; MORRISON, V.A.; NGUYEN, M.H.; SEGAL, B.H.; STEINBACH, W.J.; STEVENS, D.A.; WALSH, T.J.; WINGARD, J.R.; YOUNG, J.A.; BENNETT, J.E. Practice guidelines for the diagnosis and management of Aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v.15, p.53-60, 2016.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V.; KLAASEN, C.H.W. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, v.78, p.141–173, 2014.

ZOPPA, A.L.V.; CRISPIM, R.; SINHORINI, I.L.; BENITES, N.R.; SILVA, L.C.L.C.; BACCARIN, R.Y.A. Obstrução nasal por granuloma fúngico em eqüino: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.2, p.315-321, 2008.