

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**O desafio de *Aspergillus fumigatus* em multiplicação avícola  
(*Gallus gallus*)**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Raquel da Silva Filipe**

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Coelho

**Coorientador:**

Prof. Dr. Nuno Francisco Fonte Santa Alegria



Vila Real, 2017



**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Coelho

Departamento de Ciências Veterinárias, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Centro de Ciência Animal e  
Veterinária (CECAV)  
Quinta de Prados, 5001-801 – Vila Real - Portugal

**Coorientador:**

Prof. Dr. Nuno Francisco Fonte Santa Alegria

Departamento de Ciências Veterinárias, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Centro de Ciência Animal e  
Veterinária (CECAV)  
Quinta de Prados, 5001-801 – Vila Real - Portugal

**Local de Estágio:**

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD)  
Sociedade Agrícola- Quinta da Freiria S. A – Roliça, Portugal

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**O desafio de *Aspergillus fumigatus* em multiplicação avícola  
(*Gallus gallus*)**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Coelho

**Coorientador:**

Prof. Dr. Nuno Francisco Fonte Santa Alegria

Composição do Júri:

---

---

---

Vila Real, 2017



“A persistência é o caminho para o êxito”  
**Charles Chaplin**



## **Agradecimentos**

À universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor António Augusto Fontainhas Fernandes quero agradecer a possibilidade de realização desta tese.

Agradeço reconhecidamente à minha orientadora Professora Ana Cláudia, a sua compreensão, disponibilidade, boa disposição, por todo o apoio e amizade da qual não vou esquecer. Foi um privilégio para mim em ter aceitado colaborar comigo neste trabalho. Um obrigado do fundo do coração. Quero agradecer igualmente ao meu coorientador Professor Nuno Alegria, por quem tenho muita consideração, pois nas suas aulas, senti sempre confiança nos seus conhecimentos, e com o cuidado em transmitir aos alunos não só o que muito está nos livros, mas também muito da sua experiência. Obrigado por ter aceitado colaborar comigo neste trabalho.

O meu sincero agradecimento à empresa Sociedade Agrícola Quinta da Freiria, na pessoa do Sr. José António e ao Sr. Professor Engenheiro Manuel Chaveiro Soares pela oportunidade de realizar o meu estágio curricular.

Aos meus pais, pois sem eles nada teria sido possível, chegar onde sempre sonhei chegar. Agradeço a força prestada, a vossa compreensão, por acreditarem em mim, a companhia diária, ainda que a separação fosse de 316 km, pareceu sempre muito menos. E não esqueço a minha Licenciatura anterior de Enfermagem Veterinária, que foi muito importante para mim, que me deu a “bagagem” certa para seguir o meu caminho. Por tudo pais, estou grata!

À minha filha maravilhosa de uma forma muito especial, por eu ter tido um lugar na minha vida para ela, e hoje eu ter um lugar na vida dela. Obrigada pelos abraços calorosos e sinceros. Pela imensa companhia e a extraordinária compressão que admira a todos. Obrigada querida!

Um muito obrigada à minha irmã, sobrinha e cunhado pelo incentivo e força.

Ao meu namorado agradeço toda a ajuda, apoio e por acreditar em mim.

À Dona Alice, uma jóia, o meu sincero e profundo obrigado. É sem dúvida o que de maior valor deixo em Vila Real, mas vem comigo no coração para a vida.

Agradeço à minha família todo o apoio e carinho.

Aos meus amigos muito obrigado.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

O meu muito obrigada a todos!



## Resumo

*Aspergillus fumigatus* é um fungo, ubiqüitário, saprófito, oportunista, sendo este considerado o agente etiológico patogénico mais comum e que mais promove doenças respiratórias em aves e em pessoas imunodeprimidas. Este agente patogénico pertencente ao complexo *Fumigati*, desenvolve-se facilmente no trato respiratório de aves e humanos, nos ninhos, camas e no solo. A exposição/inalação a conídios deste fungo pode causar aspergilose, responsável pelas primeiras causas de morbidade e mortalidade sobretudo em aves domésticas. Causando assim perdas económicas consideráveis neste setor.

Um conhecimento detalhado deste agente etiológico, é essencial para a implementação de um programa de prevenção das infeções causadas por este fungo minimizando assim as perdas na produção avícola, salvaguardando a saúde pública.

O objetivo do presente trabalho prendeu-se essencialmente com uma revisão, através da reunião do conhecimento disponível acerca de *Aspergillus fumigatus*, para uma aquisição de conhecimentos atualizados deste agente no setor de reprodução avícola em Portugal, bem como, estratégia para a sua prevenção. Outro objectivo consistiu no estudo da prevalência do género *Aspergillus* numa amostra de 405 ovos para consumo. A prevalência do género *Aspergillus* em cultura foi de 28,9% (IC 95%: 24,5% -33,3%). A prevalência da espécie *Aspergillus fumigatus* em cultura foi de 7,0% (IC 95%: 3,7%-10,3%).

Os resultados deste estudo sugerem elevada prevalência do género *Aspergillus* e de *Aspergillus fumigatus* em casca de ovos.

**PALAVRAS - CHAVE:** Fungo, *Aspergillus fumigatus*, prevalência, ovos.

## Abstract

*Aspergillus fumigatus* is a ubiquitous, saprophytic, opportunist fungus, considered the most common and pathogenic etiological agent that promotes most breathing diseases in birds and in immunocompromised persons. This pathogen belongs to *Fumigati* complex, and develops easily in the respiratory tract of birds and humans in nests. Bedding and soil exposure/inhalation conidia of this fungus can cause aspergillosis, responsible for leading causes of morbidity and mortality especially in birds. Thus, this fungus can cause substantial economic losses in this sector.

A detailed knowledge of the etiological agent is essential for prevention of infections caused by this fungus, in order to accomplish one effective therapy, and minimizing losses in poultry production, assuring public health.

The aim of this work, it's to gathering available knowledge about *Aspergillus fumigatus*, in order to acquiredata knowledge of this agent in the poultry breeding sector in Portugal, as well strategies for their prevention.

An epidemiological study on the prevalence of the genus *Aspergillus* in a sample of 405 eggs for consumption was performed. The prevalence of the genus *Aspergillus* in culture was 28.9% (95% CI: 24.5% -33.3%). The prevalence of the species *Aspergillus fumigatus* culture was 7.0% (95% CI: 3.7% -10.3%).

The results suggest a high prevalence of the genus *Aspergillus* and *Aspergillus fumigatus* in shell eggs.

**KEYWORDS:** Fungus, *Aspergillus fumigatus*, prevalence, eggs.

## Índice geral

---

AGRADECIMENTOS .....	VIII
RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	XII
ÍNDICE GERAL .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XV
ÍNDICE DE TABELAS .....	XV
LISTA DE ABEVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS .....	XVI
<b>Capítulo 1. Revisão de Literatura .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento da produção avícola .....	2
1.2 A moderna produção avícola .....	2
1.2.1 Consumo de carne e ovos .....	3
1.2.2 Contribuição do melhoramento genético/ resistência das aves .....	4
1.2.3 Saúde e biossegurança .....	5
1.2.4 Doenças fúngicas de importância crescente em medicina veterinária .....	6
1.3 Aspergilose aviária .....	8
1.3.1 Etiologia .....	8
1.3.2 Importância económica .....	9
1.3.3 Epidemiologia e patogenia .....	10
1.3.4 Quadro clínico lesional .....	12
1.3.5 Diagnóstico clínico e laboratorial .....	14
1.3.6 Controlo, prevenção e tratamento .....	18
1.3.7 Fatores de risco .....	20
1.4 Centro de incubação .....	22
1.4.1 Incubação artificial .....	22
1.4.2 Máquinas de incubação verticais .....	22
1.4.3 Programa sanitário .....	22
1.4.4 Ovos.....	24
1.4.5 Desinfecção do ovo .....	25
1.4.6 Fumigação com formalina .....	26

1.4.7 Ovo para consumo .....	26
<b>Capítulo 2. Objetivos desta dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária .....</b>	<b>28</b>
2.1 Descrever as atividades desenvolvidas durante a realização do estágio curricular numa empresa de Multiplicação avícola ( <i>Gallus gallus</i> ) .....	28
2.2 Determinar a prevalência de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Aspergillus fumigatus</i> na casca de ovos para consumo .....	28
<b>Capítulo 3. Atividades desenvolvidas durante a realização do estágio curricular numa empresa de multiplicação avícola (<i>Gallus gallus</i>) .....</b>	<b>29</b>
3.1 Atividades desenvolvidas durante a realização do estágio curricular numa empresa de multiplicação avícola ( <i>Gallus gallus</i> ) .....	30
3.2 Empresa de multiplicação avícola .....	31
<b>Capítulo 4. Determinar a prevalência de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Aspergillus fumigatus</i> na casca de ovos para consumo .....</b>	<b>37</b>
4.1 Determinar a prevalência de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Aspergillus fumigatus</i> na casca de ovos para consumo .....	38
4.2.1 Material e métodos .....	38
4.2.2 Análise de dados .....	39
4.2.3 Resultados .....	40
4.2.4 Discussão .....	42
<b>Capítulo 5. Considerações finais .....</b>	<b>45</b>
5.1 Considerações finais .....	46
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>48</b>

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> A) Pavilhão de postura - Exemplar de um macho reprodutor; B) Pavilhão de recria- exemplar de parte de um bando (capítulo 1) .....	2
<b>Figura 2.</b> A) Pneumonia granulomatosa num caso de aspergilose pulmonar na qual aparecem múltiplos granulomas de 1-2 mm no parênquima pulmonar; B) Aerosaculite granulomatosa num caso de aspergilose (capítulo 1) .....	14
<b>Figura 3.</b> <i>Aspergillus</i> (capítulo 1) .....	16
<b>Figura 4.</b> A e B Visualização ao microscópico ótico de <i>Aspergillus fumigatus</i> (capítulo 1) .....	16
<b>Figura 5.</b> Aspeto macroscópico das colónias características de <i>Aspergillus fumigatus</i> (capítulo 1) .....	16
<b>Figura 6.</b> Núcleo de cria /recria (capítulo 3) .....	30
<b>Figura 7.</b> Centro de incubação - Pintos do dia (capítulo 3) .....	32
<b>Figura 8.</b> A) Colheita da amostra a partir da casa do ovo; B) Repicagem da colónia de fungos (capítulo 4) .....	39
<b>Figura 9.</b> A) Preparação de lâminas com colónias de fungos à chama do Bico de Busen; B) Lâminas com colónias de fungo com uma gota de corante lactofenol com azul de algodão (capítulo 4) .....	39
<b>Figura 10.</b> A) <i>Aspergillus fumigatus</i> em cultura de PDA, após sete dias de crescimento a 28°C nos meios de cultura Agar; B) Visualização ao microscópio ótico de <i>Aspergillus fumigatus</i> com ampliação de 40x (capítulo 4) .....	42

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Prevalência de <i>Aspergillus</i> spp. na casca de 405 ovos .....	40
<b>Tabela 2.</b> Prevalência de <i>Aspergillus niger</i> na casca de 405 ovos .....	41
<b>Tabela 3.</b> Prevalência de <i>Aspergillus fumigatus</i> na casca de 405 ovos .....	42

## Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

---

***Aspergillus spp.*** Várias espécies do género *Aspergillus*

**DGAV** Direção Geral de Alimentação e Veterinária Portugal

**ELISA** Ensaio imunoenzimático

**IC** Intervalo de confiança

**OIE** Organização Mundial de Saúde Animal

**p** Probabilidade

**PCR** Reação em cadeia da polimerase

**PDA** (Potato Dextrose Ágar) - meio de crescimento não específico

**spp** Espécies

**UTAD** Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

## **Capítulo 1. Revisão da Literatura**

---

1.1 Enquadramento da produção avícola; Revisão da literatura sobre aspergilose aviária.

## 1.1 Enquadramento da produção avícola

### 1.2 A moderna produção avícola

A propósito da incubação, refira-se, nos atuais sistemas de exploração intensiva de galinhas reprodutoras, foi eliminada a incubação natural, nomeadamente porque, durante a referida fase, a ave interrompia a postura e, por conseguinte, a produção de ovos sofreria um decréscimo acentuado (Soares, 1997). Na verdade, nas últimas décadas a avicultura tem sido exercida em moldes cada vez mais eficientes e responsáveis (Soares, 2008).

Com a produção intensiva (bandos e densidades maiores), criou-se a necessidade de uma maior, e mais especializada, atenção à saúde dos bandos. Isto porque, com bandos e densidades maiores, existem as condições ótimas/ideais para a multiplicação, disseminação e perpetuação de vários agentes patogénicos nas aves e a ocorrência de surtos de doenças para as explorações (Sesti, s.d). A saúde de um bando, com o advento da exploração intensiva, é encarada como prioritária no contexto da adoção de políticas de produção e de sanidade. Neste contexto, o conceito de prevenção reúne um conjunto de ações destinadas fundamentalmente a impedir, prevenir que os agentes infecciosos atinjam os efetivos animais. No que respeita a avicultura é de fácil compreensão que qualquer medida que vise isolar um agente, combater alguma doença ou impedir o seu surgimento no efetivo, não se realiza isoladamente neste ou naquele caso individual (Louzã, 1983).



**Fig 1.** A) Pavilhão de postura - exemplar de um macho reprodutor; B) Pavilhão de recria - exemplar de parte de um bando  
(Fonte: foto original)

Para se poder assegurar o bom estado de saúde de um bando deve-se começar por colocar as aves saudáveis num espaço limpo. A limpeza e a desinfeção complementam-se e são muito importantes para a produção. Dai que tem de existir um equilíbrio entre “molhar” a limpar, e os químicos utilizados. Dependendo do tipo de exploração avícola e dos pavilhões deve-se aplicar um programa específico (Ledour, 2008).

Em avicultura a resposta a muitos problemas de doença prendem-se com questões de manejo (Louzã, 1983).

As aves exploradas intensivamente, mesmo em sofisticadas unidades industriais, não escapam ao condicionamento biológico do seu relacionamento com o meio que as rodeia. Com efeito, as diferentes espécies animais procuram em todas as circunstâncias naturais encontrar uma situação de equilíbrio, de cada um dos indivíduos que as compõem, com o meio ambiente. Por outras palavras, pode dizer-se que manifestam a todo o momento a sua imensa capacidade biológica de adaptação (Louzã, 1983).

De acordo com Louzã (1983), o sucesso ou o fracasso na implementação das medidas preventivas é resultante direta do grau de preparação, da capacidade de execução e da dedicação dos intervenientes.

Um outro aspeto muitíssimo importante na indústria avícola moderna é a preocupação com a saúde pública (Sesti, s.d). O respeito pelas normas da proteção animal, e o tratamento humano dos animais, são importantes para a salvaguarda da saúde dos animais e a garantia da qualidade e segurança alimentar (DGAV, 2016).

### **1.2. 1 Consumo de carne e ovos**

O setor avícola tem um papel de destaque na indústria agroalimentar portuguesa e da Comunidade Europeia, que se reflete nas respetivas economias. Apesar das dificuldades colocadas por um mercado internacional muito competitivo e pelo facto da Comunidade Europeia ser excedentária na produção de carne de aves e ovos, considera-se que o setor avícola português tem tido sucesso devido à sua capacidade produtiva, à qualidade do produto e sua competitividade no mercado externo (Lima, 2005).

Os produtos avícolas - carne e ovos, proporcionam ao Homem alimentos altamente nutritivos (Santos, 2013). No que respeita à carne de aves, diversos são os atributos que justificam a preferência manifestada por nutricionistas e consumidores: excelente valor nutritivo (rica em proteínas de alto valor biológico e com baixa

concentração energética), apreciadas propriedades organoléticas, preço reduzido, e facilidade de confeção (em Portugal, a maioria do consumo corresponde a frangos adquiridos em churrasqueiras) (Soares, 2008).

A carne de aves, relativamente ao autoaprovisionamento, situa-se perto da autossuficiência (92%), ao contrário de todas as outras carnes, sendo a média geral para o setor das carnes de 74%. Portugal está entre os países europeus com maior consumo de carne de frango, com um consumo *per-capita* superior aos 24 kg / hab. / ano, sendo a segunda mais consumida, logo depois da carne de porco (Santos, 2013).

Segundo Santos (2013), a produção de aves tem registado, ao longo dos anos, um crescimento sustentado, sendo que a região centro inclui a maioria das empresas do setor. A proporção de aves abatidas na região, relativamente ao total do país representa cerca de 77%.

Relativamente aos ovos contêm fontes proteicas, sendo considerado um alimento rico em proteína de elevada qualidade e com baixo teor de gordura. Apresenta uma grande variedade de vitaminas essenciais, minerais e oligoelementos (Egg info, 2016).

No caso dos ovos, a taxa de autoaprovisionamento é de 101%: importam-se cerca de 12 mil toneladas por ano e exportam-se 14 mil. Um português consome em média, 154 ovos/ano, o que está abaixo da média europeia (Santos, 2013).

### **1.2.2 Contribuição do melhoramento genético/ resistência das aves**

A avicultura industrial nas últimas décadas teve um respeitável aumento na taxa de crescimento de frangos. Esta foi devido a um excelente trabalho realizado pelas várias empresas de genética avícola, juntamente com um apropriado conhecimento das necessidades nutricionais destas aves melhoradas. Não obstante, para que as aves cresçam às taxas atuais é necessário que o seu metabolismo trabalhe sempre no limite fisiológico (Sesti, s.d).

Parece que o frango de hoje é menos resistente aos desafios normais do dia-a-dia da criação relativamente às alterações de temperatura, elevada densidade animal. Importa referir que a genética está cada vez mais avançada para as altas produções, mas dessa forma as aves também se tornam cada vez menos resistentes, o que torna importante otimizar as condições de biossegurança nas explorações (Ledour, 2008).

No sentido de aumentar a produtividade são vários os domínios que têm sido incrementados, sendo exemplos, o melhoramento genético, alimentação e a incubação artificial (Soares, 1997).

### **1.2.3 Saúde e Biossegurança**

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), formada em 1924, surge na necessidade de combater as doenças dos animais a nível mundial, constituindo assim o motivo pela qual foi criada a Organização Internacional de Epizootias, como resultado do acordo internacional assinado a 25 de Janeiro de 1924. Em Maio de 2003 converteu-se na Organização Mundial de Saúde Animal, mas mantém o seu acrónimo histórico (OIE, 2016).

A incidência e gravidade de muitas doenças, assim como o bem-estar animal, vêm-se afetados pelo grau de stresse que as aves sentem (Ross, 2013).

Segundo Louzã (1983), questões como a localização da exploração, a implantação dos pavilhões e a sua orientação, a distância de outras, a proximidade e/ ou serventia de estradas ou caminhos de acesso público, e o próprio projeto e construção dos pavilhões são fatores de grande importância na ocorrência de muitas doenças. Deve-se preconizar um programa adequado de biossegurança para controlar introdução de organismos/agentes causadores de doenças.

A biossegurança é o termo utilizado para descrever a estratégia geral ou o conjunto de medidas tomadas para erradicar doenças infecciosas numa área de produção (Cobb, 2008).

As boas práticas de manejo e os altos padrões de biossegurança podem prevenir muitas doenças nas aves (Ross, 2013). Os processos de certificação, tal como o *Hazard Analysis Critical Control Points* (HACCP), compreendem uma série de medidas que visam reduzir a entrada de agentes patogénicos, reduzir riscos de contaminação bacteriana e fúngica. Este controlo deve ser rigoroso em toda a cadeia de produção avícola (Cardoso *et al.*, 2009).

Em situações de doença, os sinais clínicos muitas vezes não são fáceis de identificar e muito menos de diferenciar. Daí que, seja muito importante aprender a observar o comportamento, a condição corporal das aves, bem como, a realização de necropsia de cadáveres de animais que morreram por causas desconhecidas (Houriet, 2007).

Um dos primeiros sinais clínicos de doença é a redução no consumo de água e do alimento (Ross, 2013).

O tratamento oportuno e apropriado de um incidente de doença pode minimizar os efeitos adversos na saúde, bem-estar e rendimento reprodutivo das aves (Ross, 2013).

#### **1.2.4 Doenças fúngicas de importância crescente em medicina veterinária**

As doenças fúngicas são um grupo de doenças de crescente importância fundamentalmente pelas seguintes razões: trata-se de microrganismos ubiqüitários na natureza, com ampla distribuição no ambiente, e por isso, de erradicação impossível. O problema acontece quando surge em indivíduos imunodeprimidos. Outra razão é a dificuldade na prevenção destas doenças, com ausência quase total de vacinas, bem como, a problemática do tratamento: o número de fármacos antifúngicos disponíveis é muito inferior aos antibacterianos, com muito maior dificuldade para a sua obtenção, com maiores efeitos secundários, e com a possibilidade de aparecimento de resistência da mesma forma que sucedeu com os antibióticos no tratamento frente às bactérias (Garcia *et al.*, 2000).

No que respeita à aspergilose aviária – que mais importa considerar no presente trabalho - é uma doença fúngica infecciosa, não contagiosa, causada por espécies do género *Aspergillus*, em particular *Aspergillus fumigatus* (Beernaert *et al.*, 2010). A aspergilose aviária continua a ser uma importante patologia respiratória das aves (Pascal *et al.*, 2011).

O género *Aspergillus* é constituído por inúmeras espécies de fungos filamentosos septados e hialinos. Os esporos de *Aspergillus* estão presentes no ar que respiramos. Por definição, a atmosfera, que nos rodeia e que inalamos, contém um número significativo de partículas em suspensão e muitas dessas partículas são esporos fúngicos. A inalação dos esporos não é problemática por si, é necessário que existam situações fisiopatológicas que predisponham o aparecimento de infeções como imunodepressão, fenómenos alérgicos ou lesões pulmonares anatómicas ou vasculares que afetem a circulação do ar na árvore brônquica ou a oxigenação dos tecidos<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> <http://www.atlasmicologia.blogspot.pt/p/aspergillus-e-um-genero-de-fungos.html>- Patologia Clínica CHUC Coimbra Portugal)

A aspergilose foi descrita há muitos anos, mas continua a ser uma das principais causas de mortalidade em aves em cativeiro e, menos frequentemente, em aves de vida livre (Beernaert *et al.*, 2010).

Não obstante, segundo Garcia *et al.* (2000) a aspergilose refere-se a uma alteração menos frequente nas aves de cria intensiva, relacionada com situações de stress e falta de higiene.

O diagnóstico das doenças aviárias apresenta dificuldades, visto os sinais clínicos serem muito imprecisos e comuns a muitas doenças (Esteban, 1978).

### 1.3 Aspergilose aviária

A aspergilose aviária é uma doença fúngica infecciosa, não contagiosa, causada principalmente pelo agente *Aspergillus fumigatus* (Beernaert *et al.*, 2010). Este é de longe, o agente mais comum nos casos de aspergilose. É uma doença micótica importante (Akan *et al.*, 2001), secundária multifatorial onde se destacam como fatores primários principalmente a imunossupressão, stresse, má nutrição, corticoterapia ou antibioterapia prolongada (Marrieto *et al.*, 2008).

*Aspergillus fumigatus* é considerado como um dos principais agentes em patologias respiratórias em aves. Contudo, outras espécies como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus* também podem ser isolados a partir de casos de aves com aspergilose (por vezes em infecções mistas), mas com muito menos frequência de *Aspergillus fumigatus* (Pascal *et al.*, 2011). No caso da aspergilose as principais espécies envolvidas nos surtos são *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* (Ceolin *et al.*, 2012). Sendo *Aspergillus fumigatus* responsável por aproximadamente 95% dos casos, e *Aspergillus flavus* é o segundo agente mais comum associado a infecções em aves (Tell, 2005).

Segundo Tell (2005), a aspergilose é rara em mamíferos, não obstante cães, cavalos, vacas e golfinhos são suscetíveis. Em contraste com os mamíferos, os animais que são particularmente suscetíveis a *Aspergillus fumigatus* são as aves, incluindo as aves de capoeira (Akan *et al.*, 2001). Sendo esta uma das principais causas de morbidade e mortalidade em aves (Tell, 2005).

Apesar do termo aspergilose se referir usualmente a aspergilose pulmonar (pulmões, sacos aéreos), a doença também se manifesta como sistêmica, oftálmica, síndrome encefálica, e também afeta a pele ou osso.

Surto da doença de várias espécies de *Aspergillus* são comuns em pintos e perus (Akan *et al.*, 2001).

#### 1.3.1 Etiologia

Aspergilose é uma doença, fúngica, causada por espécies ubiqüitárias do género *Aspergillus* que tem aproximadamente 180 espécies (Moreira, 2015) e que se encontra em quase todo o mundo (Qing *et al.*, 2016). A espécie predominante é *Aspergillus*

*fumigatus* provavelmente devido ao pequeno tamanho dos esporos, quando comparados com *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus* ou *Aspergillus nidulans*. Outras espécies raras que foram isoladas são *Aspergillus terreus* e *Eurotium amstelodami* (Beernaert *et al.*, 2010; Moreira, 2015). As várias espécies de *Aspergillus* existem em vida livre na natureza onde proliferam com grande facilidade. Os esporos disseminam-se por via aérea (Esteves *et al.*, 1992).

O género *Aspergillus* pertence ao Reino: Fungi, Divisão: *Ascomycota*, Classe: *Eurotiomycetes*, Ordem: *Eurotiales*, Família: *Trichocomaceae*. O género *Aspergillus* foi classificado em 1729 por Micheli. A cabeça de esporos é a primeira estrutura que se observa num estudo detalhado da colónia. O arranjo, a forma, tamanho e cor das cabeças são características das espécies e, em menor extensão dos grupos a que pertencem.

### **1.3. 2 Importância económica**

Seguramente, os processos respiratórios e os digestivos são os principais causadores de perdas económicas na produção avícola (Majó *et al.*, 2011).

A aspergilose é a infeção micótica oportunista, que causa elevada morbidade e mortalidade induzindo a perdas económicas significativas (Leishangthem *et al.*, 2015). Os custos económicos da aspergilose são mais aparentes na produção de galinhas e perus (Moreira, 2015). A incidência da doença crónica não é muito elevada, mas na indústria aviária tem perdas económicas significativas quando as aves adultas sucumbem da doença (Calmek *et al.*, 1997; Akan *et al.*, 2001; Moreira, 2015).

O tratamento da aspergilose em aves de produção é difícil e inviável economicamente (Ceolin *et al.*, 2012).

Quando o ambiente em que os frangos se encontram é contaminado por esporos, apesar das aves estarem aparentemente saudáveis, sofrem perdas de produtividade, o que compromete a eclodibilidade com a consequente queda da produção de ovos. Outro fator importante é a contaminação da superfície do ovo que compromete o ambiente das incubadoras. Assim, a qualidade dos pintos fica comprometida quando a superfície do ovo é contaminada por fungos (Moreira, 2015).

### 1.3.3 Epidemiologia e Patogenia

A aspergilose foi descrita pela primeira vez no século XIX, no entanto a sua patogenia ainda está a ser investigada (Moreira *et al.*, 2015).

O agente mais comum da aspergilose é *Aspergillus fumigatus*, no entanto todas as espécies de *Aspergillus* são ubiqüitários devido à sua capacidade nutricional, que habitualmente ocorre no solo, em sedimentos e em matéria orgânica (Moreira, 2015).

Segundo Ceolin *et al.* (2012), a ocorrência de aspergilose depende da dose inalada de conídios e da suscetibilidade do hospedeiro. A inalação é considerada a principal via de infeção por *Aspergillus fumigatus* em aves (Beernaert *et al.*, 2010). A concentração dos esporos no ambiente das aves é um importante fator de predisposição juntamente com outros como a ventilação, humidade, a temperatura as condições sanitárias bem como a qualidade do alimento (Moreira, 2015). No caso de *Aspergillus fumigatus*, uma única cabeça de esporos pode produzir mais de 50.000 conídios, com 2,5-3,0 µm de diâmetro (Williams *et al.*, 2000). Os esporos são demasiado pequenos para serem retidos completamente na cavidade nasal ou na traqueia, sendo que alguns atingem os pulmões e sacos aéreos. Fatores que comprometam a imunidade da ave também podem predispor à micose. São exemplos desta situação a administração de tetraciclina ou esteróides a longo prazo, doença óssea metabólica, elevada densidade populacional e a fome (Beernaert *et al.*, 2010).

A contaminação inicial de um aviário pode ocorrer através do uso de cama contaminada ou com a introdução de animais mais velhos que tenham inalado, e que estejam contaminados com os esporos da incubadora (Moreira, 2015). As incubadoras têm um papel importante no desenvolvimento da aspergilose caso o ambiente se encontre contaminado. Não raras as vezes, a introdução do *Aspergillus* spp. nas incubadoras, ocorre com a contaminação na casca de ovo contaminada proveniente das instalações de recria (Dykstra *et al.*, 2013).

O padrão patológico da aspergilose resulta também da dose inalada dos conídios e da suscetibilidade de espécies virulentas. O género *Aspergillus* está entre as micotoxinas mais comuns e é descrita por micotoxinas que interferem com a resistência a várias infeções. As toxinas produzidas pelo agente patogénico *Aspergillus* spp. podem estar envolvidas na patogenia aviária (Cacciuttolo *et al.*, 2010).

A gliotoxina é uma das muitas toxinas produzidas por *Aspergillus fumigatus* (Calmek *et al.*, 1997), e que constitui provavelmente um fator de virulência que

contribui para as mudanças patológicas na aspergilose (Moreira, 2015).

A suscetibilidade das aves pode ser devido a características anatómicas, fisiológicas ou do sistema respiratório imune, quando comparada com os mamíferos (Tell, 2005). Relativamente às diferenças anatómicas das aves inclui a não existência de epiglote, a falta de diafragma e uma distribuição limitada de células ciliadas no trato respiratório. A presença de sacos aéreos cavernosos e a temperatura elevada que têm as aves podem promover o desenvolvimento de fungos (Ceolin *et al.*, 2012).

Os mamíferos imunocompetentes são naturalmente resistentes à aspergilose pulmonar. A menos que sejam sujeitos/expostos em doses elevadas a conídios. Devido à sua distribuição ubiqüitária e a condições favoráveis, como espaços fechados, todos os efetivos aviários estão em risco a *Aspergillus* spp. (Moreira, 2015).

As aves apresentam maior suscetibilidade nas primeiras semanas de idade, tornando-as mais resistentes à infecção na idade adulta (Tessari *et al.*, 2004; Celion *et al.*, 2012). As aves imunodeprimidas são as mais suscetíveis (Celion *et al.*, 2012).

Existem vários tipos de afeções de aspergilose em avicultura: pulmonar, sistêmica, dermatológica, onfalites, osteomielite, oftálmica (Moreira, 2015) e aneurisma aórtico (Celion *et al.*, 2012).

Embora a aspergilose seja, predominantemente, uma doença do trato respiratório, todos os órgãos podem ser envolvidos, levando a uma variedade de manifestações que variam de aguda a infecções crônicas (Beernaert *et al.*, 2010). Apesar das diversas formas clínicas de apresentação da doença, a forma respiratória, afeta sobretudo os pulmões e sacos aéreos, e é a de maior ocorrência (Celion *et al.*, 2012).

A aspergilose pode ocorrer como uma doença aguda, com elevada taxa de mortalidade e de elevada morbidade em aves jovens. A forma crônica surge em aves adultas (Calnek *et al.*, 1997; Akan *et al.*, 2001; Houriet, 2007; Celion *et al.*, 2012).

O tipo e a gravidade da doença dependem do estado fisiológico do hospedeiro e as espécies de *Aspergillus* envolvidos (Aquino *et al.*, 2008).

A incidência da forma crônica não é muito elevada, mas na indústria aviária tem perdas económicas significativas quando as aves adultas sucumbem da doença (Calnek *et al.*, 1997; Akan *et al.*, 2001; Celion *et al.*, 2012). O trato respiratório é o principal local de desenvolvimento de *Aspergillus fumigatus* levando à insuficiência respiratória grave e à aerosaculite granulomatosa associada e pneumonia (Pascal *et al.*, 2011).

São descritas duas formas de reação tecidual na aspergilose: a granulomatosa (nodular profunda) e infiltrativa (forma superficial difusa). Após uma breve exposição

aos aerossóis em 24h depois os conídios de *Aspergillus fumigatus* podem ser encontrados no sistema circulatório. Os sacos aéreos tornam-se opacos, com focos brancos lesionais disseminados. Os granulomas heterofílicos apresentam-se com centros necróticos e elementos fúngicos que podem ser encontrados antes das 24 h após a infecção do saco aéreo. Os macrófagos no sistema respiratório, vão ser fagocitados e os esporos que se movem via/sistema circulatório e linfático para outros órgãos. Após 6 dias de exposição inflamatória e necrótica o foco regride nas aves sobreviventes. A forma mais frequente da doença é a aspergilose pulmonar que ocorre mais sobretudo em aves jovens (Moreira, 2015).

Segundo Moreira (2015), a principal fonte de contaminação do ambiente são os resíduos contaminados. No entanto, ao que parece a vacinação *in ovo*, é também fonte primária de aspergilose em aves jovens (os fungos penetram na casca do ovo durante a incubação, contaminando assim os pintos). Geralmente, quando ocorre um surto em pintos, *Aspergillus* spp. pode ser encontrado (na incubadora, e nas condutas de ventilação. Os embriões dos ovos são muito suscetíveis a *Aspergillus fumigatus* e a contaminação do embrião leva a importantes perdas de eclodibilidade. Em pintos, contaminados no ovo ou durante a incubação, a doença é conhecida como pneumonia de incubadora e é altamente fatal nos primeiros dez dias de vida (Celion *et al.*, 2012).

#### **1.3.4 Quadro Clínico e Lesional**

O trato respiratório das aves apresenta particularidades anatómicas e fisiológicas que facilitam a ocorrência de doenças, principalmente de origem microbiológica. Sendo este, constituído por duas narinas, laringe, traqueia, siringe, brônquios primários, secundários e terciários, pulmões e sacos aéreos. Entre as estruturas do trato respiratório das aves, há duas que facilitam a ocorrência de doenças respiratórias. O ducto que interliga os seios nasais a cavidade oral é extremamente estreito, disposto de tal forma que a drenagem natural de secreções é impedida e o aparelho mucociliar, que é encontrado por toda a extensão do trato respiratório (principalmente nos brônquios), não é encontrado nos sacos aéreos, no que se traduz em maior gravidade no caso de comprometimento patológico destes (Marrieto *et al.*, 2008).

As infecções respiratórias nas aves são processos multifatoriais em que geralmente participa um agente causal primário e agentes secundários que, uma vez produzida a lesão no aparelho respiratório, contribuem para agravar o problema. Em

geral, as lesões observadas são, inespecíficas ou, o resultado do efeito de mais de um agente patogénico. Apesar disso, algumas lesões podem ser indicativas da implicação de um determinado agente (Majó *et al.*, 2011).

Os sinais clínicos das doenças respiratórias aviárias podem ser: diminuição de atividade, inquietação, aumento da frequência respiratória, respiração profunda, sons estertores, postura de bico aberto, pescoço esticado, atos de sacudir a cabeça, lacrimejamento, espessamento de pálpebras, penas perioculares aderidas e afonia. Alguns agentes patogénicos respiratórios concentram-se no sistema respiratório superior e podem causar tumefação e edema de parte da cabeça em virtude de infeções nos seios nasais. As lesões mais profundas observadas são traqueíte, bronquite, pneumonia e aerossaculite (Marrieto *et al.*, 2008).

No que se refere aos sinais clínicos e às lesões da aspergilose a ter, podem ser subtis. Problemas respiratórios e disfuncionais podem ser encontrados em casos de aspergilose (Moreira, 2015). Os sinais clínicos são inespecíficos normalmente (letargia, inapetência e anorexia) ou pode estar relacionado com compromisso do sistema respiratório (rinite, alteração na vocalização, dispneia (Tell, 2005), respiração ofegante, cianose, hiperpneia (Akan *et al.*, 2001). A aspergilose em si não produz vocalização (ex. estertores), mas quando associada a outras patologias respiratórias produz vocalização. A redução da mobilidade, sonolência e a febre são relativamente frequentes (Moreira, 2015). As manifestações clínicas dependem da dose de infeção, a distribuição dos esporos, doenças pré-existentes, e da capacidade de resposta imunológica do hospedeiro (Beernaert *et al.*, 2010).

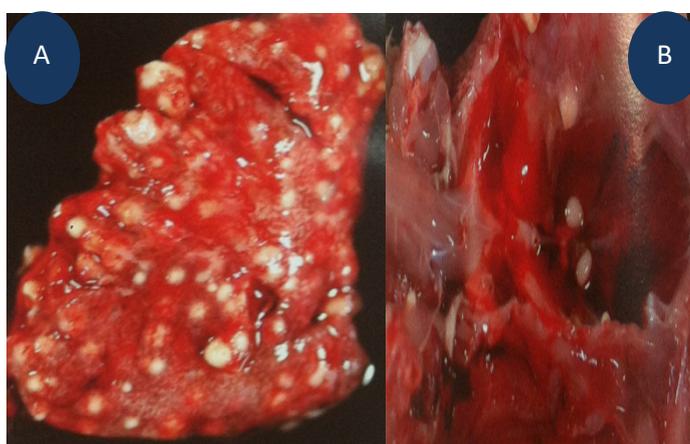
Celion *et al.* (2012) referem que a aspergilose pode ser classificada de acordo com a distribuição das lesões na serosa e no parênquima de um ou mais órgãos.

A mortalidade varia entre os 10 e os 100% e são descritas secreções nasais e oculares serosas. As galinhas adultas com aspergilose severa podem ter graves dificuldades respiratórias e a produção de ovos declina. Nos casos agudos, numerosos nódulos caseosos podem apresentar-se no pulmão e nos sacos aéreos que podem conter nódulos esféricos (granulomas causados por *Aspergillus* spp.). Exsudados caseosos na siringe e traqueia podem bloquear a passagem do ar de forma grave. As lesões cerebrais podem ocorrer e são descritas como áreas brancas circunscritas. A ascite é uma sequela frequente da aspergilose pulmonar (Moreira, 2015).

Numa pneumonia granulomatosa, macroscopicamente observa-se a presença de pequenos nódulos, granulomas, no parênquima pulmonar (figura 2 A). Pode ser

confundida com tumores, daí que seja necessário realizar exames histológicos. As pneumonias granulomatosas estão associadas a duas causas principais. Sendo as mais frequentes as infecções fúngicas, maioritariamente associadas a *Aspergillus* spp. Contudo, ainda que menos frequente hoje em dia, as pneumonias granulomatosas também são características da tuberculose. Em todos os casos a histopatologia permite diferenciar estas causas (Majó *et al.*, 2011).

De acordo Majó *et al.* (2011), nos casos de aerosaculite granulomatosa observa-se a presença de nódulos, granulomas ou placas, na superfície do saco aéreo (figura 2 B), que se associa principalmente a infecções fúngicas.



**Fig 2.** A) Pneumonia granulomatosa num caso de aspergilose pulmonar na qual aparecem múltiplos granulomas de 1-2 mm no parênquima pulmonar; B) Aerosaculite granulomatosa num caso de aspergilose (Fonte: Majó *et al.*, 2011)

De acordo com Leishangthem *et al.* (2015) sinais clínicos da aspergilose são inespecíficos e dependem do sistema envolvido. A aspergilose pulmonar é geralmente diferenciada de outras doenças respiratórias por lesões granulomatosas presentes na necropsia. Mas também é necessário diferenciar de outras micoses e mibobacterioses, tais como, clamidiose, tuberculose, neoplasia, deficiência de vitamina A, doença bacteriana, candidíase, ascite, hepatomegália e pneumonia.

### 1.3.5 Diagnóstico Clínico e Laboratorial

Com o fim de estabelecer o diagnóstico das infecções micóticas, é indispensável a ação coordenada do clínico com o laboratório. O clínico elabora uma história, realiza

um exame físico detalhado, ordena e obtém as amostras apropriadas que devem ser enviadas ao laboratório (Arteaga *et al.*, 2003).

As amostras vão acompanhadas de uma folha de requisição, na qual solicita-se a análise. É indispensável conhecer a data e hora da colheita da amostra, bem como, realizar a correta colheita e preparação das amostras para a eficácia da análise. Os procedimentos realizados no laboratório com vista ao estabelecimento do diagnóstico incluem: a visualização do agente etiológico nas diferentes amostras obtidas, incluindo a demonstração do agente nos tecidos; o processamento das amostras e inocular em meios de cultura adequados para a identificação do agente; por meio de técnicas imunológicas para a determinação de anticorpos e antigénios circulantes no soro e em fluidos corporais; e a aplicação de técnicas de biologia molecular para a demonstração do ADN ou ARN específicos do fungo. Na maior parte dos casos, estes procedimentos confirmam ou excluem a etiologia fúngica (Arteaga *et al.*, 2003).

### **Identificação do fungo *Aspergillus fumigatus***

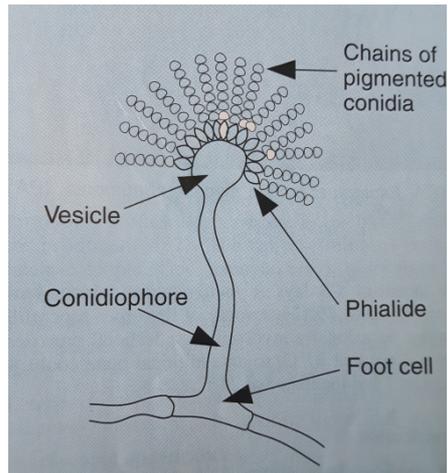
#### Morfologia da colónia

*Aspergillus fumigatus*: a colónia tem um aspeto macio e branco à primeira vista, rapidamente se torna aveludada ou granular de um verde-azulado brilhante na cor. As colónias mais velhas podem assumir uma coloração cinza esfumada (Quinn *et al.*, 1994).

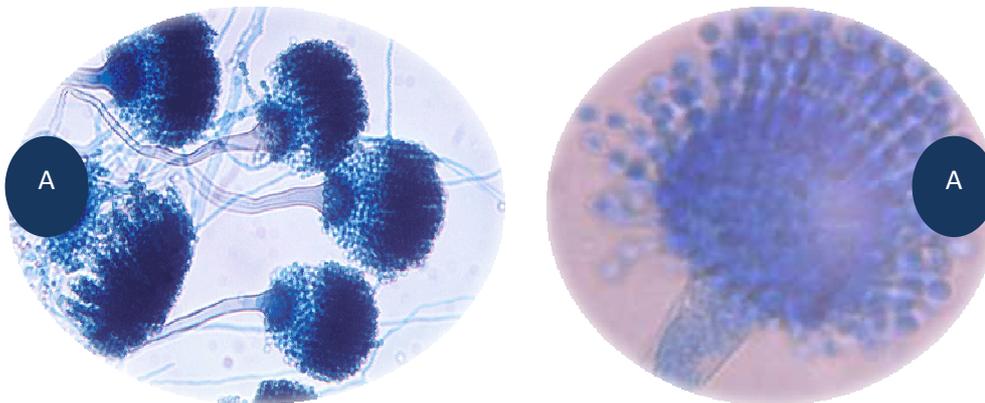
#### Aspeto microscópico

As observações microscópicas podem ser efetuadas em lactofenol com azul de algodão. As cabeças de frutificação indicam o género, mas uma experiência acrescida torna-se necessária para a especiação (Quinn *et al.*, 1994).

*Aspergillus fumigatus* : conidióforos apresentam um comprimento moderado e apresentam uma "célula pé" característica nas suas bases. As vesículas são em forma de cúpula e a metade superior até dois terços suportam fiáides a partir da qual longas cadeias de conídios verdes, globosos e espinhosos, (2-3 µm) são suportados. Estas cadeias tendem curvar-se para dentro (Quinn *et al.*, 1994)



**Fig 3.** *Aspergillus*  
(Fonte: Quinn *et al.*, 1994)



**Fig 4.** A e B) Visualização ao microscópico ótico de *Aspergillus fumigatus*  
(Fonte: adaptado de Gefor, 2016)



**Fig 5.** Aspeto macroscópico das colônias características de *Aspergillus fumigatus*  
(Fonte: adaptado de Gefor, 2016)

Os sinais de aspergilose não são específicos (Beernaert *et al.*, 2010; Arné *et al.*, 2011; Leishangthem *et al.*, 2015), tornando o diagnóstico difícil (Beernaert *et al.*, 2010; Leishangthem *et al.*, 2015) além disso, nenhum teste tem elevada sensibilidade e especificidade (Beernaert *et al.*, 2010).

A visualização de nódulos no exame de necropsia e o isolamento e identificação do fungo *Aspergillus* integram o método mais indicado para diagnosticar os agentes da doença (Celion *et al.*, 2012).

O diagnóstico *ante - mortem* de aspergilose, particularmente nos casos crónicos, continua a ser um desafio (Arné *et al.*, 2011). Num exame *post - mortem* baseado na caracterização de nódulos caseosos nos pulmões ou sacos aéreos de aves afetadas é usualmente o método de diagnóstico usado (Moreira, 2015). Aspergilose é frequentemente diagnosticada em exame *post - mortem* (Calnek *et al.*, 1997; Leishangthem *et al.*, 2015). Por vezes é possível observar o crescimento dos fungos e a esporulação dos nódulos caseosos ou placas nomeadamente nos casos aéreos, confirmação que deve ser feita pelo isolamento e identificação do fungo causador (Calnek *et al.*, 1997). No exame da necropsia observam-se os granulomas na serosa e parênquima do trato respiratório. Mas, o diagnóstico definitivo baseia-se no isolamento de *Aspergillus* espécies de cultura ou pela deteção do organismo durante o exame histológico (Arné *et al.*, 2011; Leishangthem *et al.*, 2015).

É fundamental saber que muitas aves podem hospedar *Aspergillus* conídios no sistema respiratório o que conduz a uma infeção latente sem sintomas clínicos ou lesões macroscópicas. Além disso, *Aspergillus fumigatus* pode não ser a causa primária, ou pode estar associada a outros agentes patogénicos, tais como *Aspergillus niger*, ou de *Aspergillus flavus* (Arné *et al.*, 2011).

O método tradicionalmente utilizado para o diagnóstico de *Aspergillus fumigatus* requer alguns dias para observar o seu crescimento, sendo demorado e com especificidade moderada. Os métodos de laboratório para o diagnóstico de *Aspergillus fumigatus* incluem examinação direta ao microscópio (Qing *et al.*, 2016).

As amostras de agentes saprófitos ubiqüitários devem ser recolhidas cuidadosamente usando condições assépticas. A deteção dos organismos durante o exame histológico é outro método de diagnóstico definitivo. Testes serológicos como o ELISA e técnicas de PCR foram desenvolvidas, mas são limitadas devido à natureza não específica do antigénio fúngico e amplo número de fungos. No entanto, a imunohistoquímica anticorpo monoclonais ou policlonais, é bom e eficaz sistema de

identificação do *Aspergillus fumigatus* nas espécies da lesão histopatológica (Arné *et al.*, 2011).

O diagnóstico geralmente baseia-se num acumular de evidências a partir da história (Beernaert *et al.*, 2010), a apresentação clínica, hematologia e bioquímica, sorologia, alterações radiográficas, endoscopia e cultura do fungo (Beernaert *et al.*, 2010). Pode ser benéfico, mas estes exames complementares não estão disponíveis no contexto de aves de capoeira (Leishangthem *et al.*, 2015). É importante mencionar que o isolamento em si não permite a confirmação do diagnóstico porque os organismos do *Aspergillus* spp. são ubiqüitários. Contudo uma cultura microbiológica de um órgão colhido de forma asséptica é considerada um bom método de diagnóstico (Moreira, 2015).

Ainda no que respeita á história da ave, esta pode revelar um evento relacionado uma situação de stresse e/ou alguns fatores ambientais subjacentes e/ou uma condição de imunossupressão ou tratamento. Os sinais clínicos dependem de forma de aspergilose que a ave desenvolve e quais os órgãos que estão envolvidos (Beernaert *et al.*, 2010). A forma crónica afeta aves mais velhas e é mais difícil de diagnosticar (Moreira *et tal.*, 2015).

Caso o diagnóstico seja precoce, o prognóstico geralmente é favorável, tanto é assim, que por exemplo determinados autores recomendam que após o crescimento de uma só colónia de *Aspergillus* a partir de amostras da siringe se deva iniciar o tratamento antifúngico em qualquer caso (Garcia *et al.*, 2000).

### **1.3.6 Controlo, Prevenção e Tratamento**

A única forma de se manterem os sistemas de produção e os seus respetivos bandos, livre ou controlados, no que diz respeito à presença de agentes infecciosos é através da utilização de um programa efetivo de biossegurança. Este deverá contemplar todos os aspetos gerais da Medicina Veterinária preventiva bem como conter aspetos exclusivos direcionados a cada sistema de produção em particular (Sesti, s.d). A higiene e a prevenção são as ferramentas mais importantes para proteger as aves (Moreira *et al.*, 2015). Importa salientar que as explorações têm crescido em tamanho e densidade animal e, por este motivo, foi criado um ambiente ideal para que agentes como *Aspergillus* spp. possam prosperar (Pascal *et al.*, 2011). Um surto de aspergilose geralmente ocorre numa exploração específica, numa altura específica do ano,

particularmente durante o inverno em ambientes fechados (Moreira, 2015).

As auditorias de rotina em todos aspetos de um programa de biossegurança em funcionamento são parte essencial do processo. É através destas auditorias que muitas adaptações, ajustes e melhorias são realizados no programa de biossegurança. Idealmente, estas auditorias devem ser realizadas por Médicos Veterinários e externos ao processo. Só assim, as “falhas da rotina” poderão ser identificadas e corrigidas (Sesti, s.d). A efetividade dos programas estabelecidos de saúde e biossegurança deve supervisionar-se por rotina, e deve-se registar de forma clara e detalhada (Ross, 2013).

A infeção por *Aspergillus* spp. é moderadamente controlada pela desinfeção da incubadora. A amostra e monitorização do equipamento é uma boa forma de controlar o problema ao nível da incubadora (Moreira, 2015). Os resíduos e alimentos bolorentos devem ser evitados ao nível da exploração e uma desinfeção regular da comida e dos utensílios e da água ajuda a eliminar a infeção (Houriet, 2007; Moreira, 2015). Segundo Moreira (2015), a prevenção é a melhor forma de controlo.

O tratamento das aves infetadas é bastante difícil e às vezes não tem eficácia em casos respiratórios severos (Moreira *et al.*, 2015) e, é inviável economicamente, fazendo com que toda a atenção esteja direcionada para a prevenção e o controle nos aviários e na incubação (Ceolin *et al.*, 2012). Sendo o tratamento da aspergilose aviária um desafio devido a uma série de fatores, nomeadamente o conhecimento limitado da farmacocinética de agentes antifúngicos em diferentes espécies de aves, a inflamação granulomatosa que torna difícil para o fármaco atingir o fungo alvo, a presença de doença concomitante e/ou imunossupressão, e a fase tardia em que as aves apresentam (Beernaert *et al.*, 2010).

O tratamento dos resíduos com uma solução de Enilconazol é uma opção bastante dispendiosa (Moreira, 2015). Este fármaco pertence á classe dos imidazóis. Os imidazóis com um grupo éter e que formam uma classe importante de agentes antifúngicos. Um outro composto de éter é Imazalil. Este derivado de Imidazol é usado na proteção de plantas (Imazalil) e como um agente antimicótico em veterinária (Enilconazol). Tem sido desenvolvido como um desinfetante antimicótico. Sendo a sua atividade excelente contra *Aspergillus fumigatus* em Caldo Sabouraud foi inibida em 0,1-1mg/G (Bossche *et al.*, 2003).

Segundo Tell (2005), as opções de tratamento ainda são escassas, mas o aumento da incidência da doença em seres humanos conduziu a um aumento de estudo, de investigação na área, o que pode beneficiar tanto a medicina humana e veterinária.

A resistência ao fármaco foi referida em medicina humana e este pode ser um importante fator de contribuição para falta de eficiência, contudo este fato ainda não é bem, estudado. O futuro conhecimento da aspergilose aviária pode contribuir para novas vacinas eficazes (Moreira, 2015).

A terapia é geralmente ineficaz contra aspergilose aviária e as vacinas não estão disponíveis comercialmente, não tendo aplicação prática, nem se obteve uma vacina eficaz (Pascal *et al.*, 2011; Leishangthem *et al.*, 2015).

A imunidade após a vacinação de proteção pode ser útil no tratamento e prevenção da aspergilose aviária. No entanto, as tentativas para elaborar estratégias de vacinação parecem questionáveis em animais imunodeprimidos, pelo que seria necessária imunização passiva com imunoglobulinas. No entanto, diferentes estratégias de vacinação têm sido testadas em aves usando diferentes preparações de vacinas, mas com resultados inconsistentes (Beernaert *et al.*, 2010).

### **1.3.7 Fatores de Risco**

Nesta revisão bibliográfica parece pertinente fazer uma breve referência a alguns dos fatores de risco mais frequentemente associados ao surgimento de *Aspergillus fumigatus*.

A maior dificuldade na prevenção e no controle da aspergilose é que *Aspergillus* podem estar presentes em todas as fases da produção avícola. As infecções por estes agentes geralmente ocorrem pela inalação de conídios presentes na ração e na cama do ninho ou do aviário e pela contaminação dos ovos durante a incubação (Celion *et al.*, 2012).

Nas explorações, os bandos de menor qualidade, em consequência de má qualidade do alimento, de doença ou envelhecimento são um fator de risco no aparecimento de fungos, a incorreta medição da temperatura, pode proporcionar a quebra da casca do ovo, os ovos sujos, condições de armazenamento ou de transporte não adequadas, a falta de higiene, o alimento contaminado são exemplos disso mesmo (Intervet, 2006).

A qualidade da cama num pavilhão avícola é um fator de tal forma importante para o rendimento da indústria de carne de aves na atualidade que necessita que lhe seja prestada a maior atenção. Há várias razões para a cama ficar demasiado molhada. Considera-se, contudo, que é aconselhável ter entre 20-25% de humidade. Um valor 26-

39% de humidade provocará grandes problemas e irá gerar prejuízos, mas se for de 40% então a situação é problemática (Marshall, 2015). O material de cama que se utiliza dependerá do custo e da disponibilidade, e esta deve ter as seguintes propriedades: absorver bem a humidade, ser biodegradável, ser cómoda para a ave, apresentarem um baixo nível de pó, estarem livres de contaminantes e provir de uma fonte biossegura que conte com uma disponibilidade permanente (Ross, 2013).

Os materiais utilizados para as camas em avicultura procedem de subprodutos industriais, cujas características apresentam geralmente uma elevada capacidade de isolamento e absorção de humidade (Agrinews, 2015).

Nunca devem utilizar-se na produção avícola materiais de cama de fraca qualidade, espessos, húmidos ou com aspeto bolorento (Agrinews, 2015). As aparas de madeira branca, aparas de madeira vermelha, cascas de semente de girassol, miolo de noz (amendoim) são exemplos de materiais utilizados para a cama. Importa salientar que este último, material não será o mais recomendável, pois a sua capacidade de retenção de humidade não é a melhor. Por outro lado, são propensos a criar fungos se forem armazenados incorretamente (Marshall, 2015).

A aparas de madeira de qualidade é o melhor material. O serrim de madeira, casca de arroz e palha traçada, também podem ser utilizados (Agrinews, 2015).

No centro de incubação, associado ao risco de aparecimento do *Aspergillus fumigatus* estão os ovos contaminados, partidos ou sujos provenientes do núcleo de postura; se os ventiladores e filtros estiverem contaminados por falta de higiene, dificuldade de uma limpeza eficaz das condutas de ventilação; o equipamento de transferência e de vácuo mal ajustado ou com precária higiene; resíduos das incubadoras e das eclosoras; materiais de cartão ou de madeira contaminado; “Layout” do centro de incubação menos satisfatório: inexistência de separação de zonas sujas e zonas limpas; o uso de desinfetantes com atividade antifúngica limitada (Intervet, 2006).

Em pintos acabados de eclodir a infeção ocorre após a inalação de um grande número de esporos, num ambiente contaminado. Estes são particularmente vulneráveis durante os primeiros dias de vida, uma vez que, o seu sistema respiratório é imaturo. Os pintos infetados, logo após a eclosão sofrem lesões no sistema respiratório e por vezes no sistema nervoso central (Intervet, 2006).

De acordo com Tessari *et al.* (2004) as condições propícias de temperatura (30°C) e humidade de (80%) intensificam o crescimento de *Aspergillus spp.*, a temperatura e a humidade em ambientes avícolas, quer seja em pavilhões de reprodutoras ou de frangos

de carne, nomeadamente durante a incubação.

Considerando os principais fatores de risco apontados, refere-se em seguida o que é importante no estudo de *Aspergillus fumigatus* isto em centros de multiplicação avícola, nomeadamente nos centros de incubação como risco elevado de contaminação.

## **1.4 Centro de incubação**

### **1.4.1 Incubação artificial**

A história das máquinas modernas de incubação está associada aos avanços científicos e tecnológicos que se registaram a partir de meados do século XVIII, com destaque para a invenção do termómetro, do termóstato e do higrómetro; posteriormente, da energia elétrica (Soares, 1997).

Nos últimos anos, várias foram as modificações ocorridas nos centros de incubação, como: introdução da monitorização por computador, controle das máquinas, automatização de vários processos diários de operação. Além disso, houve um aumento na consciencialização da importância da incubação no controle de doenças (Cobb, 2008).

A incubação representa um ambiente crítico e potencial fonte de contaminação da casca de ovos. Deste modo, a garantia da qualidade do ponto de vista microbiano, e produtividade dependem da adoção de medidas sanitárias direcionadas a impedir a entrada de agentes patogénicos, bem como a redução de carga microbiana existente (Cardoso *et al.*, 2009). Os cuidados com higiene devem ser rigorosos na incubação. Uma vez detetada a fonte de contaminação, esta deve ser eliminada, além da implementação de antifúngicos, conforme o local e o substrato de contaminação (Ceolin *et al.*, 2012).

### **1.4.2 Máquinas de incubação verticais**

Atualmente, nos centros de incubação de carácter comercial e de grande capacidade, não se utilizam incubadoras de tipo horizontal, pois são de baixa capacidade de carga e ocupam um espaço relativamente grande (Soares, 1997).

### **1.4.3 Programa Sanitário**

A seguir apresentam-se as características que um programa sanitário deve apresentar (Cobb, 2008):

1. Um programa sanitário deve ser elaborado para o controle de contaminação, e os resultados do programa devem ser conferidos regularmente usando processos-padrão de monitorização bacteriológica (Placa de Agar e zaragatoa de contato).
2. As fontes de contaminação, além de ovos contaminados e penugem dos pintos, podem ser: ar; pessoas; animais, como ratos, insetos; equipamentos, como caixas, bandejas e carrinhos.
3. Assegurar que todos os funcionários e visitantes usem roupas adequadas de proteção. O uso de fardas de cores diferentes é uma boa prática, de acordo com os diferentes locais de trabalho dentro do centro de incubação (zona limpa ou suja) ou de acordo com cada função. Isso ajuda a identificar a deslocação incorreta de funcionários e na prevenção de contaminação cruzada. Antes da utilização de qualquer desinfetante, é importante a remoção de toda a matéria orgânica. Por exemplo, as eclosoras devem ser lavadas por inteiro com água e detergentes antes de serem desinfetadas.
4. Os desinfetantes devem ser usados seguindo exatamente as recomendações e instruções do fabricante. Nem todos os desinfetantes são compatíveis; a maioria deles é tóxico e todos devem ser manuseados com cuidado.
5. Assegurar que os funcionários estejam cientes das exigências de armazenamento, manuseio e mistura correta dos desinfetantes usados. Obter dos fabricantes informações sobre os desinfetantes e seguir cuidadosamente as instruções.
6. Os desinfetantes usados devem estar de acordo com as regulamentações governamentais.
7. Efetuar testes de sensibilidade para determinar qual é o desinfetante mais efetivo.

De acordo com o estudo de Cardoso *et al.* (2009), que teve como objetivo principal avaliar as condições microbiológicas de um centro de incubação, foi utilizada a técnica da Placa de Sedimentação. Neste estudo concluíram que a avaliação da qualidade sanitária deve ser realizada periodicamente. A monitorização microbiológica pode ser realizada por meio de exposição de placas, que provavelmente é a mais utilizada pelo seu equilíbrio entre eficiência, simplicidade e custos. Embora não seja uma técnica extremamente precisa, os seus resultados são indicadores de boa qualidade microbiológica.

Em 2000, foi publicado um estudo de referência, no qual dizia respeito ao desenvolvimento de *Aspergillus fumigatus* no ovo. A incubação foi necessária para predispor o ovo à infecção fúngica.

Segundo o estudo de Williams *et al.* (2000), os constituintes do ovo mostram claramente que apresentam diferentes potenciais de crescimento para o *Aspergillus fumigatus*. Enquanto que, a gema do ovo é um meio nutritivo necessário para sustentar o crescimento do fungo, bem como, a gema, fresca ou incubada, já a clara do ovo (albumina) fresca ou incubada, não permite o crescimento do fungo. Assim como, a membrana sozinha também não suporta o crescimento, tal como as membranas da casca, quando em contacto com a albumina, fresco ou incubado, também, não suportam o crescimento do fungo *Aspergillus fumigatus*.

Na clara do ovo não foi identificado nenhum composto antifúngico específico, contudo as propriedades inibidoras relativamente à atividade da protease podem servir para bloquear o crescimento de fungos. *Aspergillus fumigatus* cresceu na membrana da superfície da casca quando a membrana estava em contacto com a gema. A gema fresca ou incubada parece ser a fonte nutritiva necessária para apoiar a proliferação (Williams *et al.*, 2000).

Em 1967, infetou-se experimentalmente *Aspergillus fumigatus* em ovos para incubação, por imersão dos ovos em água com conídios do fungo. Tendo observado que ovos férteis foram consideravelmente mais suscetíveis à infecção fúngica que os ovos inférteis. Uma possível explicação para as suas observações é que a capacidade do fungo para ganhar acesso à gema foi melhorada em ovos férteis (Williams *et al.*, 2000). Dificilmente durante a fase de incubação apresenta crescimento zero de colónias bacterianas e fúngicas (Cardoso *et al.*, 2009).

#### **1.4.4 Ovos**

O embrião e o conteúdo do ovo devem ser mantidos nas melhores condições possíveis para uma boa incubabilidade e qualidade do pinto, desde a postura até à incubação dos ovos (Cobb, 2008; Ross, 2013). Ovos sujos, partidos, pequenos, muito grandes, dupla gema, qualidade da casca frágil, ovos deformados são exemplos de ovos não aptos para a incubação (Cobb, 2008).

A estrutura da casca do ovo explica a necessidade de certos procedimentos nas explorações como “limpar” os ovos podem agravar os problemas de contaminação. Por

exemplo, se se esfregam ou raspam os ovos que estão ligeiramente sujos para retirar a sujidade superficial da casca, parte do pó que se produz como resultado da manipulação pode penetrar nos poros da casca e desta forma provocar a oclusão dos mesmos. Em consequência disso mesmo os poros tapados impedem as trocas gasosas e, limitará a disponibilidade de oxigénio para o embrião. Os problemas de contaminação também podem agravar se molharem por qualquer motivo durante a colheita (Ross, 2013).

#### **1.4.5 Desinfecção do ovo**

A desinfecção com formaldeído continua a ser o método mais eficiente (e o de maior preferência) para desinfetar as superfícies das cascas dos ovos incubáveis.

Assumindo que a fumigação se realiza corretamente, este método consegue excelentes taxas de eliminação de microrganismos na superfície da casca sem molhá-lo, sem deteriorar a cutícula e sem afetar o embrião que esta dentro do ovo. Não obstante, alguns países hoje em dia proíbem o seu uso, devido ao risco potencial contra a saúde e segurança em humanos quando não utilizado corretamente (Ross, 2013).

A seguir apresentam-se os procedimentos corretos relativos à fumigação (Ross, 2013):

1. A fumigação com formaldeído deve-se realizar sempre seguindo as indicações de segurança. Sempre que se utilize formaldeído, devem-se cumprir as regras locais que regem a saúde e segurança dos trabalhadores das explorações.
2. Fumigar os ovos com formaldeído pelo menos uma vez antes da saída da exploração.
3. Assegurar-se de que os ovos se encontram bem separados em bandejas de plástico, em cartões ou bandejas de incubação. As bandejas de cartão tendem a absorver o gás.
4. Assegurar-se de que a sala de fumigação esteja bem selada durante o processo de fumigação e deste modo permitir que o gás circule pelo menos durante 20 minutos após.
5. Aquecer a) 10 g de grânulos de paraformaldeído, ou b) uma mistura de 43 ml de formalina (37,5%) e 21g) de permanganato de potássio por m<sup>3</sup> da área a fumigar.
6. Assegurar-se que a temperatura do ambiente seja de 24° C e a humidade relativa

não seja inferior a 65%.

7. Utilizar um ventilador de recirculação durante a fumigação para ajudar a repartir o gás fumigante entre os ovos.
8. Assegurar-se de que todo o gás saiu por completo da sala antes que os trabalhadores entrem de novo e retirem os ovos. Deve-se periodicamente verificar utilizando um medidor apropriado.

#### **1.4.6 Fumigação com Formalina**

Nos locais onde é permitido o uso da formalina, deve realizar-se num curto espaço de tempo após a desinfecção. As superfícies devem estar húmidas e a temperatura mínima dos pavilhões deve ser de 21 °C. A fumigação não é eficaz a temperaturas mais baixas e a humidades relativas inferiores a 65% (Ross, 2013).

As portas, ventiladores, grades de ventilação e janelas devem estar fechadas. Deve-se seguir as instruções do fabricante no que respeita ao uso de fumigantes.

#### **1.4.7 Ovo para consumo**

Entende-se por galinhas poedeiras, as aves da espécie *Gallus gallus* que tenham atingido a maturidade sexual e sido criadas para a produção de ovos não destinados à incubação (DGV, 2016).

Define-se por ovos - os ovos com a sua casca - com exceção dos partidos, incubados ou cozinhados, provenientes de aves de criação e próprios para consumo humano direto ou para a preparação de ovo-produtos (DGAV, 2016).

Existem dois grandes grupos de sistemas de produção para galinhas poedeiras: o sistema de gaiolas e os sistemas alternativos – ou sistemas de produção no solo. Nos sistemas alternativos ou de solo as aves podem ter acesso ao ar livre (galinhas criadas ao ar livre) ou estarem apenas confinadas aos pavilhões (galinhas criadas no solo). Existe ainda a possibilidade das galinhas serem exploradas num modo de produção biológico<sup>2</sup>.

A produção de ovos para consumo humano tem como principal objetivo oferecer um produto que mantenha a sua qualidade original. Entenda-se por qualidade todo o conjunto de características inerentes do ovo que determina o seu grau de aceitabilidade.

---

<sup>2</sup> <http://www.ovoscac.com/classificacao.php?m=5>

A qualidade do ovo inclui as características físicas visíveis e ainda sabor e odor, podendo ser influenciada por vários fatores (Magalhães *et al.*, 2012).

O documento *Codex Alimentarius* é composto por vários documentos com normas e diretrizes relativos a boas práticas de biossegurança e higiene nas diversas etapas da produção avícola, tendo como propósito que seja assegurada a segurança e qualidade dos ovos e ovoprodutos nomeadamente para a *Salmonella* sp. (*Codex Alimentarius*, 2016).

Segundo as novas normas de comercialização de ovos, estes possuem um código identificativo do país de origem, do modo de produção, da região agrícola em que é produzido e do respetivo aviário. Uma informação que permitirá ao consumidor optar por ovos nacionais ou de outro estado-membro, por ovos provenientes da produção biológica, das galinhas ao ar livre, das galinhas no solo ou das galinhas de aviário<sup>2</sup>.

O centro de classificação é um local onde todos os ovos produzidos são reunidos para serem devidamente conduzidos para o mercado<sup>3</sup>.

Segundo o Regulamento (CE) N° 853/2004 de 29 de abril, os centros de embalagem devem ter os equipamentos necessários para manusear e avaliar os ovos, o que inclui o equipamento de miragem (ovoscópio), um dispositivo para estimar a altura da câmara-de-ar e um equipamento para fazer a classificação dos ovos pelo peso.

---

<sup>2</sup> <http://www.ovoscac.com/classificacao.php?m=5>

<sup>3</sup> [http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=103](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=103)

## Capítulo 2.

---

O objetivo do presente trabalho prendeu-se essencialmente com o aumento do conhecimento acerca de *Aspergillus fumigatus* em casca de ovos para consumo.

Constituem objetivos desta dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária:

- 2.1. Descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio numa empresa de multiplicação avícola (*Gallus*);
- 2.2. Determinar a prevalência de *Aspergillus* spp. e *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos para consumo.

### **Capítulo 3.**

---

3.1 Atividades desenvolvidas durante a realização do estágio curricular numa empresa de multiplicação avícola (*Gallus gallus*).

### 3.1 Atividades desenvolvidas durante a realização do estágio curricular numa empresa de multiplicação avícola (*Gallus gallus*)

Ao fazer-se a história da evolução da avicultura através dos tempos, com especial realce para os, últimos anos, tem vindo a conquistar um crescimento notável.

A elevada especialização e intensificação exigida à produção intensiva avícola e entre outros requisitos, contribuíram para o meu interesse pela área e motivaram-me a realizar o estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária em avicultura, e em particular na área da Sanidade Animal associada à produção de galinhas reprodutoras. O cumprimento de tal vontade, foi realizado na empresa Sociedade Agrícola Quinta da Freiria S.A- Pinto Valouro (Portugal), pertencente ao Grupo Valouro - o maior grupo económico Agroalimentar português e um dos maiores da Europa. Um grupo económico que possui uma estratégia de integração vertical, encerrando toda a fileira, tendo como atividades desde a cria/recria de galinhas reprodutoras, produção de ovos para incubação, produção de pintos do dia, produção de frango, perus, patos, abate de aves, transformação, distribuição e comercialização de produtos alimentares.

Durante a realização do estágio curricular tive oportunidade de conhecer um dos centros de incubação da empresa – centro de incubação da Freiria, diversos núcleos avícolas de cria/recria de reprodutoras, tais como o da Pena Branca I, da Barragem, de São José III, do Pó, e em dois núcleos de reprodutoras em postura o da Freiria e o da Lamarosa. E também tive a oportunidade de estar no Laboratório de *Salmonella* sp. O único no país privado que é acreditado.



**Fig 6.** Núcleo de cria /recria  
(Fonte: Foto original)

O presente capítulo, teve como objetivo descrever as atividades realizadas durante o estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária realizado na Quinta da Freiria S.A- Pinto Valouro (Portugal), no período compreendido entre Outubro, Novembro e Dezembro.

### **3.1 Empresa de multiplicação avícola**

A Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria, S.A, empresa integrada no grupo Valouro, está dedicada essencialmente à produção avícola, nas vertentes da multiplicação/incubação e da engorda de frangos, de perus e de patos. Esta empresa, foi criada em 1986 e surgiu da necessidade de ocupar um segmento da fileira capacidade máxima instalada total na ordem das 476 000 frangas, produz cerca de 1,6 milhões de aves do dia (pintos) por semana. O Grupo Valouro, cuja denominação se deve ao topónimo relativo à localização da primeira unidade - o sítio do Vale de Ouro, na freguesia da Marteleira, tem mais de 130 anos de história. Deste grupo fazem parte empresas como a Avibom, Interaves, Kilom, Rações Valouro e Sociedade Agrícola da Quinta da Freiria, estando o seu núcleo sediado na região Oeste. Refira-se que o Grupo Valouro, é o maior grupo económico privado do setor agroalimentar português, líder de mercado no setor da carne de aves nacional e com exportação para Espanha e Médio Oriente. Deste modo, representa quer para a região quer para o país um elevado potencial para o desenvolvimento económico (Horizonte de Projeto, 2010).

A atividade começou com a multiplicação de galinhas reprodutoras pesadas, com uma capacidade de produção de 250 000 aves do dia por semana. Em 1991 a empresa alargou a sua atividade à multiplicação de patos, na Quinta da Lapa, em Torres Vedras<sup>4</sup>.

Graças à implementação das corretas normas de biossegurança, de bem-estar animal e ambientais, onde a empresa foi pioneira a nível nacional nestes domínios, levou à certificação da fileira de frango e de pato segundo a ISO 9001:2008. São estas ferramentas que ajudam na obtenção de ovos de incubação e de aves do dia de elevado potencial zootécnico e sanitário<sup>4</sup>.

A empresa de multiplicação avícola contempla três fases distintas: a fase de cria/recria, a fase de reprodução/postura e a última no centro de incubação, onde nascem os pintos do dia.

---

<sup>4</sup> [http://www.pintovalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt\\_PT/?ObjectPath=/Shops/3130-160315/Categories/Sobre\\_a\\_Pinto\\_Valouro](http://www.pintovalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/3130-160315/Categories/Sobre_a_Pinto_Valouro)

Na empresa de multiplicação avícola em questão, os ovos incubáveis de galinhas reprodutoras pesadas para a produção e comercialização usa as estirpes convencionais Ross 308, HUBBARD JV, Cobb 500; estirpes de crescimento lento Redbro Mini X Redbro CN<sup>4</sup>.

Durante a realização do estágio curricular tive oportunidade num primeiro momento de ficar num dos centros de incubação da empresa – centro de incubação da Freiria. O centro de incubação mencionado localiza-se no concelho do Bombarral (Distrito Leiria). Acompanhei a rotina diária, desde a receção diária de ovos provenientes dos pavilhões de postura, o seu armazenamento, a incubação, a eclosão, a triagem dos pintos (seleccionados de acordo com algumas características, nomeadamente, os que tem penugem bem seca, longa, fofa, umbigos cicatrizados, olhos brilhantes, pintos ativos, pintos com ausência de deformidades).



**Fig.7** Centro de incubação - Pintos do dia  
(Foto: foto original)

No segundo momento de estágio, estive em núcleos de cria/recria, como o da Pena Branca I, com localização no concelho de A dos Cunhados, (Distrito Torre Vedras); o núcleo da Barragem, com localização no concelho do Bombarral, (Distrito de Leiria); o núcleo São José III, com localização no concelho de Alcobaça (Distrito de Leiria); no núcleo do Pó, com localização no concelho do Bombarral, (Distrito de Leiria).

---

<sup>4</sup>[http://www.pintoalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt\\_PT/?ObjectPath=/Shops/3130160315/Categories/Sobre\\_a\\_Pinto\\_Valouro](http://www.pintoalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/3130160315/Categories/Sobre_a_Pinto_Valouro)

No decorrer do estágio, tive a oportunidade de acompanhar o trabalho realizado pela Dra. Teresa Coutrim, Médica Veterinária. De uma forma geral, as visitas do Médico Veterinário assistente consistem na observação do comportamento dos animais, do manejo geral e nível de conforto e bem-estar. A detecção precoce a eventuais sinais de doença é fundamental, tais como comportamentos anormais.

Na fase de cria/recria as aves para reprodução (estirpes pesadas) são acolhidas até às 20-24 semanas de idade. Nesta fase supra referida, fêmeas e machos são criados em separado, com condições de manejo distintas. Tendo como objetivo que o bando atinja o peso corporal adequado e a uniformidade corporal e sexual por volta das 20 semanas de idade. A cria compreende os primeiros 7 a 10 dias de vida do pinto.

No núcleo da Pena Branca I acompanhei a preparação da receção dos pintos, bem como, a respetiva receção dos mesmos.

À chegada e antes da distribuição dos pavilhões 6 pintos são sacrificados por lote. Para realizar colheita de sangue para o despiste de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma syanovie*, fez-se em laboratório de campo.

O manejo inicial dos pintos deve ter como objetivo estabelecer um lote saudável desde o primeiro dia de vida. É essencial que os pintos permaneçam o menos tempo possível mantidos nas caixas (maior risco de desidratação, o que resultaria numa redução do bem-estar animal, na uniformidade e no crescimento, assim como um “arranque” deficiente do pinto. Observar o comportamento dos pintos à chegada, ver se todos os pintos têm um correto acesso às linhas de água (bebedouros), à comida (que está espalhada pelos tapetes no chão). Supervisionar o papo (nas primeiras 48h – que deve estar cheio, no entanto as primeiras 24h são as mais críticas. Noutras visitas da Médica Veterinária, observar de uma forma geral o comportamento do bando, se estão espalhados, ou se juntos num cantinho, a preparação e a vacinação (incluindo a análise à água de bebida quando se administram vacinas na mesma).

Nos dias seguintes é importante ir avaliando a condição corporal, consistência das fezes, problemas podais, sinais de stresse e agressividade, assim como as contagens de mortalidade e a abertura de cadáveres.

Diariamente acompanhei as funcionárias na sua rotina, em tarefas como, varrer os tapetes, espalhar ração, anotação das taxas de mortalidade, o controlo e registo diário do consumo da água, quantidade da ração, controlo da temperatura, ventilação, as horas da luz, as pesagens semanais, ir aumentando gradualmente o tamanho dos parques. Um lote que seja uniforme é mais fácil de manejo do que um lote desigual.

Acompanhei a fase crítica da transição da migalha para o granulado.

Relativamente ao programa de horas de luz, nesta fase da cria/recria é decrescente e constante.

Pontos-chave nesta na fase: alojar os pintos num pavilhão que esteja limpa e seja biossegura; controlar a propagação de doenças aplicando o sistema de uma idade por exploração (tudo dentro, tudo fora) nos pavilhões; seguir um programa de higiene recomendado e contar com um procedimento de prova para avaliar a eficácia; pré-aquecimento do pavilhão e estabilizar a temperatura e humidade pelo menos 24 horas antes da chegada dos pintos; assegurar que a cama e a água estão limpas; adequar os equipamentos para permitir aos pintos o acesso a água e ao alimento facilmente; descarregar e alojar os pintos o mais rapidamente possível; não deixar caixas vazias; revistar o alimento, a água a temperatura e a humidade depois de 1 a 2 hora, e fazer os ajustes necessários. O nível de humidade durante os primeiros 3 dias deve ser de 60-70%, a temperatura é um aspeto fundamental, deve manter nos valores recomendados; supervisionar a temperatura e humidade frequentemente, estabelecer uma taxa mínima de ventilação desde o primeiro dia para proporcionar ar fresco e eliminar os gases residuais, evitar correntes de ar, responder às diferenças do comportamento dos pintos (Ross, 2013).

No núcleo da Barragem, núcleo de São José III e do Núcleo do Pó, acompanhei os bandos com diferentes semanas de idade por volta das 18 semanas e por volta das 23 semanas respetivamente. Sendo que acompanhei a vacinação, desparasitação, visitas da Médica Veterinária responsável pelos núcleos, nomeadamente na observação da conformação das aves (os aumentos adequados do peso corporal durante este período garantem aos machos um reforço de uma condição física ótima, uniforme assim como a fertilidade, e nas fêmeas uma transição suave e uniforme a madurez sexual e a produção de ovos), a rotina diária das funcionárias como as pesagens totais, identificação de erros de sexagem. No núcleo de São José III, acompanhei a transferência de milhares de aves (são transferidas do núcleo de cria/recria para os pavilhões de reprodução e postura entre as 20 e as 24 semanas de idade), a vacinação, e as condições em que é feito o transporte. Primeiro faz-se a transferência dos machos e depois noutro dia vão as fêmeas. Faz-se a desparasitação três dias antes da transferência e voltam a ser desparasitadas 15 depois da chegada aos pavilhões de reprodução/ postura.

Acompanhei os trabalhos realizados após a transferência, todas as medidas de limpeza e higiene-sanitária que tem se ser realizadas de forma adequada.

Pontos-chave nesta fase: assegurar que cada ave tem um espaço de solo adequado para cada ambiente. Pode ser necessário reduzir a densidade populacional. Cumprir a legislação local; se se aumenta a densidade populacional, também se deve ajustar apropriadamente a ventilação; os comedouros, os bebedouros. A uniformidade das aves ver se é afetada negativamente se o espaço do comedouro e ou a distribuição das aves é limitada, assegurar-se de que há suficiente espaço de comedouro para o número de aves; o espaço entre os comedouros deve permitir um fácil acesso às aves. Supervisionar os pesos corporais semanalmente, que seguem o perfil dos objetivos de peso; maximizar a uniformidade do peso corporal e a maturidade sexual. Há que conseguir que as aves com pesos abaixo consigam o objetivo no momento que se dê o estímulo luminoso. Seguir as recomendações dos programas de iluminação. Administrar alimento adicional no dia antes e no dia depois da transferência. Assegura-se de que os machos e as fêmeas tenham ingerido alimento e água mediante a avaliação do papo cheio e a supervisão do comportamento alimentício (Ross, 2013).

No decurso do estágio, num terceiro momento estive no núcleo de Postura o da Freiria, com localização no concelho do Bombarral, (Distrito de Leiria), onde foi possível acompanhar a rotina diária das funcionárias. Como alimentação, espalhar o carbonato de cálcio, apanhar os ovos do chão, abertura dos cadáveres, desparasitação, a recolha dos ovos das passadeiras, a colocação dos ovos nas carrinhas transportadoras que tem como destino o centro de incubação da Freiria. E também estive núcleo de Postura da Lamarosa, com localização no conselho do Bombarral (Distrito de Leiria) onde acompanhei os trabalhos relativos a limpeza e desinfecção dos pavilhões.

A fase de reprodução e postura, tem início às 25 semanas de idade. Relativamente ao programa de horas de luz, nesta fase da reprodução/postura é crescente e constante. Estimular também com o alimento.

Os machos e fêmeas alojadas no mesmo pavilhão, normalmente numa por proporção de 1 macho para 10 fêmeas.

Pontos-chave nesta fase: proporcionar sistemas de alimentação separados para machos e fêmeas. Os sistemas de alimentação para as fêmeas devem ter grades para evitar o acesso dos machos, e os comedouros para os machos devem elevar-se a uma altura que não permita o acesso das fêmeas. Observar o comportamento alimentar diariamente para assegurar que ambos os sexos se estão a alimentar separadamente, que os comedouros dos machos estejam a altura apropriada e que o espaço de comedouro e a distribuição do alimento são os adequados. Verificar diariamente que não há danos,

irregularidades ou espaços sem grades no sistema de alimentação das fêmeas (Ross, 2013).

A nível laboratorial tive oportunidade de ver a realização das análises de uma amostra de cama (estilha e arroz) para posterior análise na deteção de *Aspergillus fumigatus* no Laboratório de Microbiologia. Enquanto no Laboratório de Ensaios acompanhei a receção de amostras, como por exemplo as botinhas.

Este laboratório é destinado a apoiar as rigorosas medidas de biossegurança aplicadas na atividade de produção de ovos para incubação e pintos do dia. Neste âmbito, no referido laboratório monitoriza-se a higiene das instalações – aviários e centros de incubação – das viaturas, utilizadas no transporte de ovos e de pintos do dia, e também da água para abeberamento administrada às aves. Adicionalmente, o laboratório está acreditado como Laboratório de Ensaios, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2000, para a pesquisa de *Salmonella* sp. em fezes de aves, de acordo com a norma ISO 6579:2002 Amd. 1:2007:Anexo D (Número de acreditação pelo Instituto Português de Acreditação: L061. É muito intensa a atividade desenvolvida no laboratório, em ordem à realização de um cabal controlo microbiológico, tendo assim efetuado cerca de 14 mil análises no ano 2015<sup>4</sup>.

No sentido de complementar o meu estágio, para além das atividades desenvolvidas nos diferentes núcleos de cria/ recria, postura, fiz horas complementares de estudo no escritório da Quinta da Freiria.

Considerando o objetivo anteriormente referido, importa centrar a nossa atenção sobre um estudo da prevalência de *Aspergillus* spp. e *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos para consumo.

---

<sup>4</sup>[http://www.pintovalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt\\_PT/?ObjectPath=/Shops/3130160315/Categories/Sobre\\_a\\_Pinto\\_Valouro](http://www.pintovalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/3130160315/Categories/Sobre_a_Pinto_Valouro)

## Capítulo 4.

---

4.1 Determinar a prevalência de *Aspergillus* spp. e *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos para consumo.

## **4.1 Determinar a prevalência de *Aspergillus* spp. e *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos para consumo**

### **4.2.1 Material e métodos**

Neste trabalho efetuou-se um estudo epidemiológico com o objetivo de monitorizar a contaminação fúngica da casca de ovo de uma amostra de conveniência de 405 ovos caseiros e comerciais. Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se uma prevalência esperada de 50% com um erro de 5% e um nível de confiança de 95%. As colheitas foram realizadas nos meses de setembro de 2015 a abril de 2016. Nas colheitas efetuadas foram utilizadas placas de Petri contendo Potato Dextrose Agar, específico para a identificação de fungos. Para a colheita de amostra foi efetuado um esfregão na casca de cada ovo com uma zaragatoa esterilizada embebida em soro fisiológico numa área bitolada de 4 cm<sup>2</sup>. Foi calculada a prevalência e os respetivos intervalos de confiança (IC) 95%. Durante um período que variou entre 4 a 7 dias, as placas foram colocadas na estufa a 28°C para que ocorresse desenvolvimento fúngico.

As colónias fúngicas observadas apresentavam grande diversidade. Assim, para que se garantisse o seu isolamento, as diferentes colónias tiveram de ser repicadas para novas placas, este processo foi sempre realizado perto da chama de um bico de Bunsen garantindo a assepsia, e recolocadas na estufa até que o seu desenvolvimento garantisse que possuíam estruturas e esporos passíveis de serem analisados.

Este procedimento possuiu um tempo de duração variável, pois foi diretamente dependente do número e tipo de colónias presentes em cada uma das placas.

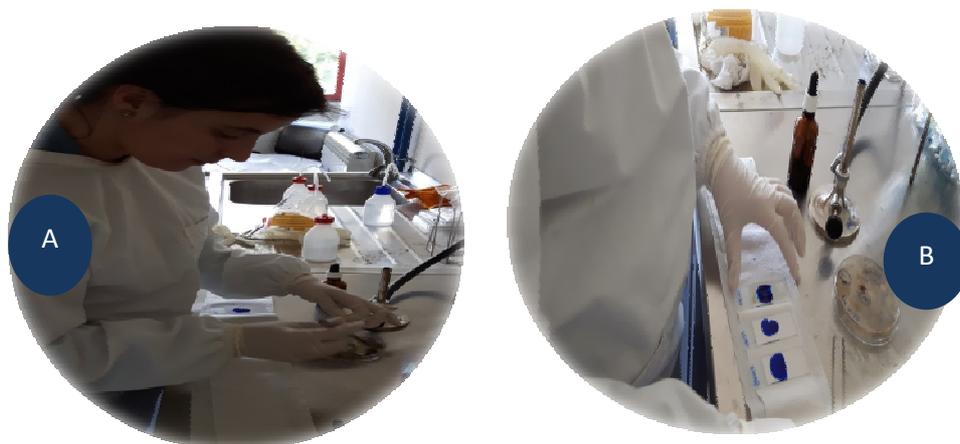
A identificação fúngica de cada uma das colónias foi feita recorrendo a, análise macroscópica de acordo com as características descritas por Rippon em 1988 e ao site, (Mycology online – (University of Adelaide, 2001). As estruturas microscópicas foram também analisadas recorrendo-se à técnica de lactofenol com azul de algodão, que cora de azul as estruturas dos fungos: micélio, as hifas e os esporos, e comparadas com as existentes no site de Micologia da Universidade de Adelaide na Austrália (Mycology online - University of Adelaide, 2001).

Este método consiste na impressão do fungo num pedaço de fita-cola, colocado sobre a colónia a analisar e pressionado com uma pinça esterilizada. Esta impressão é depois colocada sobre uma lâmina sobre uma gota de Lactofenol com Azul de Algodão, previamente colocada. Observa-se posteriormente ao microscópio ótico.

Após cada uma das colónias ser observada e comparada com a bibliografia já referida, foi identificado o género fúngico a que pertencia e, quando possível a espécie.



**Fig 8.** A) Colheita da amostra a partir da casa do ovo; B) Repicagem da colónia de fungos  
(Fonte: foto original)



**Fig. 9** A) Preparação de lâminas com colónias de fungos á chama do Bico de Busen; B) Lâminas com colónias de fungo com uma gota de corante lactofenol - azul de Algodão  
(Fonte: foto original)

#### 4.2.2 Análise de dados

A análise estatística de dados, obtidos como resultados laboratoriais e através das variáveis associadas aos ovos, foi efetuada com recurso ao programa SPSS® 22.0. O estudo da associação entre variáveis foi efetuada pela análise do qui-quadrado e pelo teste exato de Fischer com um nível de probabilidade ( $p$ )  $<0,05$ .

### 4.2.3 Resultados

Efetuuou-se um estudo na casca de 405 ovos dos quais 44,0% (n=178) eram de origem caseira e 56,0% (n=227) eram de origem comercial. Na casca do ovo foram isoladas diferentes colónias fúngicas.

Dentro dos ovos comerciais 2,6% eram da classe XL, 41,4% pertenciam à classe M, 45,8% eram da classe M e 10,1% eram da classe S.

Os ovos caseiros pertenciam a diferentes explorações caseiras enquanto que os ovos comerciais foram adquiridos em 6 superfícies comerciais.

A prevalência do género *Aspergillus* em cultura foi de 28,9% (IC 95%: 24,5% - 33,3%). A prevalência do género *Aspergillus* na casca de ovos caseiros foi de 39,3% (IC 95%: 32,1%- 46,5%). A prevalência do género *Aspergillus* na casca de ovos comerciais foi de 20,7% (IC 95%: 15,4%-25,9%). As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas (p=0,000) (Tabela1).

A prevalência de *Aspergillus* em ovos comerciais foi superior nos ovos de classe M (24,0%; IC 95%: 15,8%-32,2%) seguido dos ovos de classe L (18,1%; IC 95%: 10,3%-25,9%) mas as diferenças encontradas não foram significativas (p=0,727).

Não se observaram diferenças significativas entre o isolamento de *Aspergillus* nas diferentes superfícies comerciais (p=630).

**Tabela 1** – Prevalência de *Aspergillus* spp. na casca de 405 ovos.

	Ovos testados (n)	Distribuição relativa	Cultura de <i>Aspergillus</i> spp. positivas (n)	Prevalência 95% CI (%)	Intervalo de confiança (%)
Origem dos ovos	p=0,000				
Caseiros	178	44,0%	70	39,3%	32,1%- 46,5%
Comerciais	227	56,0%	47	20,7%	15,4%-25,9%

A prevalência da espécie *Aspergillus niger* em cultura foi de 8,4% (IC 95%: 5,7% -11,1%). A prevalência do género *Aspergillus niger* em casca de ovos caseiros foi de 14,0% (IC 95%: 8,9%-19,1%). A prevalência do género *Aspergillus niger* na casca de ovos comerciais foi de 4,0% (IC 95%: 1,5%-6,6%). As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas ( $p=0,000$ ) (Tabela1).

A prevalência de *Aspergillus niger* em ovos comerciais foi superior nos ovos de classe M (2,9%; IC 95%: 0,0%- 6,1%) seguido dos ovos de classe L (6,4%; IC 95%: 1,5%-11,4%). Não se observaram isolamentos nas classes XL nem S. As diferenças encontradas não foram significativas ( $p=0,270$ ).

Não se observaram diferenças significativas entre o isolamento de *Aspergillus niger* nas diferentes superfícies comerciais ( $p=0,081$ ).

**Tabela 2** – Prevalência de *Aspergillus niger* na casca de 405 ovos.

	Ovos testados (n)	Distribuição relativa	Cultura de <i>Aspergillus</i> spp. positivas (n)	Prevalência 95% CI (%)	Intervalo de confiança (%)
Origem dos ovos	$p=0,000$				
Caseiros	178	44,0%	25	14.0 %	8.9%- 19.1%
Comerciais	227	56,0%	9	4,0%	1.5%-6.6%

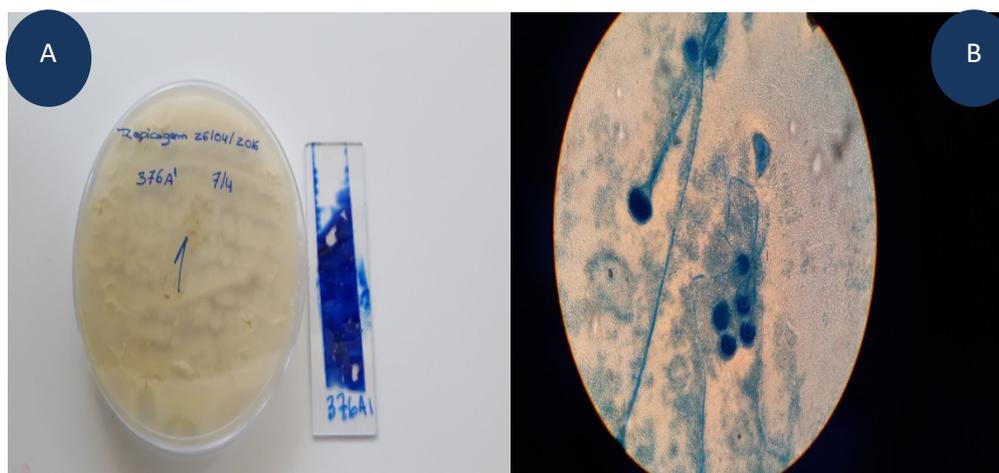
A prevalência da espécie *Aspergillus fumigatus* em cultura foi de (7,0% (IC 95%: 3,7%-10,3%). Não se isolou *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos caseiros. A prevalência do género *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos comerciais foi de 7,0% (IC 95%: 3,7%-10,3%). As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas ( $p=0,000$ ) (Tabela 3).

A prevalência de *Aspergillus fumigatus* em ovos comerciais foi semelhante em ovos de classe L (8,5%; IC 95%: 2,9%-14,1%) e em ovos de classe L (7,7%; IC 95%: 2,9%- 12,9 %). Não se observaram isolamentos nas classes XL nem S. As diferenças encontradas não foram significativas ( $p=0,204$ ).

O isolamento de *Aspergillus fumigatus* foi superior nos ovos comerciais provenientes de uma superfície comercial, relativamente às outras cinco ( $p=0,000$ ).

**Tabela 3** – Prevalência de *Aspergillus fumigatus* na casca de 405 ovos.

	Ovos testados (n)	Distribuição relativa	Cultura de <i>Aspergillus</i> spp. positivas (n)	Prevalência 95% CI (%)	Intervalo de confiança (%)
Origem dos ovos	p=0,000				
Caseiros	178	44,0%	0	0.0 %	—
Comerciais	227	56,0%	16	7,0%	3.7%-10.3%



**Fig.10** A) *Aspergillus fumigatus* em cultura de PDA, após sete dias de crescimento a 28°C nos meios de cultura Agar; B) Visualização ao Microscópio ótico de *Aspergillus fumigatus* com ampliação de 40x (Fonte: foto original)

#### 4.2.4 Discussão

Importa, considerar que os resultados obtidos neste estudo devem ser entendidos como à luz de uma amostra de conveniência. Quanto mais aleatórias forem as amostras, mais seguras poderão ser as conclusões. Em estudos futuros, será importante que estas condicionantes sejam necessariamente observadas.

Relativamente a estudos em *Aspergillus fumigatus* em casca de ovos para consumo, não existem muitos (Williams *et al.*, 2000).

Os resultados do presente estudo sugerem elevada prevalência do género *Aspergillus* em casca de ovos. No presente estudo, não se verificam diferenças significativas, tendo a prevalência do género *Aspergillus* e das espécies de *Aspergillus niger* ter sido superior em ovos caseiros.

No presente estudo a prevalência de *Aspergillus fumigatus* na casca de ovos para consumo foi também elevada.

De fato, o estudo mostrou que existe contaminação fúngica na casca de ovo de uma amostra de conveniência de 405 ovos caseiros e comerciais. As colónias fúngicas apresentam grande diversidade sendo que os mais prevalentes foram o *Aspergillus niger* e o *Aspergillus fumigatus*.

Entre os prováveis meios de contaminação estão o contato das cascas dos ovos com as fezes das aves, no momento da postura ou no próprio ninho, além da questão da manipulação sob condições inadequadas, ou o armazenamento por tempo prolongado, aumentando a carga microbiana dos ovos (Fraga *et al.*, 2010). Por outras palavras o mesmo será dizer que, o aparecimento dos fungos está associado à limpeza e integridade da casca.

De acordo com um estudo de Fraga *et al.* (2010) na qual foi avaliada a incidência de fungos em ovos, de acordo com a integridade da casca, a embalagem e tempo de armazenamento, concluiu-se que a relação direta da qualidade da casca com o desenvolvimento de fungos sobre a sua superfície pode ser reduzida, com o revestimento da embalagem em filme plástico, providência tão mais importante quanto maior for o período de armazenamento dos ovos.

Segundo Leishangthem *et al.* (2015) todas as aves são suscetíveis à aspergilose. E como a aspergilose acomete também os humanos, sendo estes sensíveis à infeção em casos de debilidade ou imunodepressão, é fundamental que se continuem a realizar estudos.

Fraga *et al.* (2010) reportam que, os ovos têm sido apontados como veiculadores de alguns agentes microbianos, causando surtos de intoxicações de maior e menor gravidade.

As hifas de fungos podem desenvolver-se na superfície das cascas dos ovos, provocando aumento dos poros e inclusive favorecendo a penetração de bactérias. Deste modo, as fissuras representam uma condição favorável ao desenvolvimento fúngico. A

superfície da casca dos ovos, imediatamente após a postura, por ser húmida, favorece a aderência dos conídios presentes no ambiente, favorecendo a sua germinação por esporos e penetração das hifas pelos poros da casca (Fraga *et al.*, 2010).

Em termos de saúde pública isto pode representar que o homem pode estar exposto a estes fungos durante a manipulação do ovo, nos momentos que antecedem a sua confeção. O ser humano encontra-se diariamente exposto a inúmeros agentes potencialmente patogénicos, contudo, é raro que adquira uma infeção devido à eficácia dos seus mecanismos de defesa (Prata, 2007). *Aspergillus* apresentam capacidade de infetar o homem e animais ou vegetais podendo causar infeção (Lacaz *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2009). As várias espécies de *Aspergillus* têm sido anteriormente descritas com os alergénios fúngicos responsáveis pela indução de reações alérgicas, tais como asma alérgica, alveolite alérgica extrínseca e aspergilose broncopulmonar alérgica (Zanjani *et al.*, 2012). É um dos géneros fúngicos mais referenciados como oportunista, especialmente, em pacientes hospitalizados, a realizar imunossupressoras (Greco *et al.*, 2014).

De referir que, os mamíferos imunocompetentes são naturalmente resistentes à aspergilose pulmonar. A menos que sejam sujeitos/ expostos a doses elevadas a conídios. Apesar disto, a aspergilose em humanos aumentou bastante nos últimos anos, em parte devido a complicações da terapêutica imunossupressora (Moreira, 2015). As opções de tratamento ainda são escassas, mas o aumento da incidência da doença em seres humanos conduziu a um aumento de estudo, de investigação na área, o que pode beneficiar tanto a medicina humana e veterinária (Tell, 2005). A qualidade e segurança alimentar são uma preocupação constante para o consumidor. Para que esta seja garantida é necessário controlar desde as matérias-primas ao produto final.

## **Capítulo 5.**

---

### **5.1 Considerações finais.**

## 5.1 Considerações finais

O estudo em foco permitiu compreender melhor a prevalência de *Aspergillus* em ovos, que pode influenciar a qualidade do alimento e com fortes implicações em saúde pública.

O presente estágio resulta de uma experiência muito motivante na área da medicina de produção, no setor da avicultura. Três meses de estágio curricular foram um tempo demasiado curto para a aquisição de experiência em condições de campo, mas a experiência possibilitou atingir o meu principal objetivo de observar e compreender particularmente as aves reprodutoras.

No decurso do meu estágio curricular, deparei-me com alguns desafios que me possibilitaram uma visão mais realista sobre a importância da Medicina Veterinária na produção animal e do papel essencial que o Médico Veterinário tem. As explorações têm crescido em tamanho e densidade animal e, nestas circunstâncias, não raras as vezes, cria-se um ambiente propício para que agentes como *Aspergillus fumigatus* prosperem. Neste contexto, as perspetivas globais tentam-nos a procurar e a realizar as melhores práticas de manejo, podendo assim melhorar a rentabilidade de uma exploração, todos os fatores que possam contribuir para tal, devem ser geridos de forma adequada, uma vez que são cruciais para o seu sucesso.

O setor avícola, considerado um setor de mão-de-obra especializada e personalizada, necessita de formação contínua para manter e melhorar os resultados produtivos. Deste modo, é imprescindível controlar o cumprimento das regras de segurança e implementação das normas de bem-estar animal. Adotando medidas profiláticas corretas e rigorosas, conducentes a um declínio notável dos riscos de origem biológica. Dar formação contínua passa pelos Médicos Veterinários de campo, e técnicos intervenientes do setor, com ações de sensibilização e consciencialização e responsabilização de todas as partes envolvidas.

Os requisitos sanitários, requisitos de controlo de qualidade e do bem-estar animal cada vez maiores, geram aumento de custos. No entanto, uma conclusão aceite pela generalidade dos autores da bibliografia consultada aponta como essencial a prevenção, a implementação de programas de biossegurança. Devendo-se também olhar com atenção para o comportamento dos produtores e das decisões tomadas.

Fazer controlo microbiológico frequente aos locais propícios ao desenvolvimento do fungo, para que se o fungo for detetado possam ser tomadas

medidas adequadas.

Como nota final, importa recordar que o controlo mais efetivo das doenças associadas com aves, é o que realizamos desde a prevenção. Sendo esta a medida mais sensata e prudente para evitar o aparecimento da doença.

## Referências bibliográficas

- Agrinews (2015). Qual o melhor material a seleccionar para ter uma boa cama em avicultura. *Aves e Ovos* (238), 7.
- Akan, M., Hazroğlu, R., İlhan, Z., Sarayyupoğlu, B., Tunca, R. (2002). A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Dis*, 46 (2), 497-501.
- Arné, P., Thierry, S., Wang, D., Deville, M., Le Loc'h, G., Desoutter, A., Féménia, F., Nieguitsila, A., Huang, W., Chermette, R. and Guillot, J. (2011). *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *Inter Microbiol*, 2011, 746356.
- Aquino, S., Greiner, R., Konietzny, U., Hasegawa, R.H., Alves dos Reis, T., Corrêa, B., Villavicencio, A.L. (2008). Use of PCR for detecting *Aspergillus flavus* in maize treated by gamma radiation process. *Food Biotech*, 22, 150-159.
- Arteaga, M.A., Gordo, E.C. (2003). Procedimentos diagnósticos - Exames diretos. *Micosis Humanas*. 2ª Edição. Faculdade de Medicina de Medellín, Colombia, 1.
- Beernaert, L.A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F., Martel, A. (2010). *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathol*, 39, 325-331.
- Bossche, H. Vanden, Engelen, M., Rochette F. (2003). Antifungal agents of use in animal health – Chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J Vet Pharmacol. Therap*, 26, 5-29.
- Cacciuttolo, E., Rossi, G., Nardoni, S., Legrottaglie, R. and Mani, P. (2009). Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Vet Res Commun*, 33 (6), 521-527.
- Calnek, B.W., Barnes, H. J., Beard, C.W., McDougald, L. R., Saif, Y.M. (1997). *Diseases of Poultry*. American Association of Avian Pathologists. 10ª Edição, 351-356.
- Cardoso, A.L.S.P., Tessari, E.N.C., Kanashiro, A.M., Stoppa, G.F.Z., Luciano, R.L., Castro, A.G.M. (2009). Avaliação da qualidade sanitária de incubatório por meio de placas de sedimentação. *Arq Inst Biol*, 76 (2) 279-283.
- Codex Alimentarius*, (2016). *Code of Hygienic Practice for Eggs and Egg Products*– International Food Standards, WHO & FAO. [Online] <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/> (Acesso 1 de Outubro de 2016).
- Ceolin, L.V., Flores, F., Corrêa, I.M.O., Lovato, M., Galiza, G.J.N.G., Kommers, G.D., Risso, Nathália & Santurio, Janio Morais. (2012). Diagnóstico macro e microscópico de Aspergilose em frangos de corte. *Acta Sci Vet*, 40 (3), 1061.

Cobb - Vantress (2008). *Guia de Manejo de Incubação Cobb*. [Online] [http://www.cobb-vantress.com/languages/guidefiles/e420c01f-a164-4890-9963-60c1e332bf40\\_pt.pdf](http://www.cobb-vantress.com/languages/guidefiles/e420c01f-a164-4890-9963-60c1e332bf40_pt.pdf) (Acesso 18 de Abril de 2016).

Cobb - Vantress (2008). *Manual de Manejo de Frangos de Corte*. [Online] <http://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Cobb-Manual-Frango-Corte-BR.pdf> (Acesso 18 de Abril de 2016).

DGAV, 2016. *Galinhas Poedeiras*. [Online] <http://www.dgv.minagricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=151825&cboui=151825> (Acesso 4 Junho de 2016).

DGAV, 2016. *Géneros Alimentícios – Ovos*. [Online] <http://www.dgv.minagricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=188312&generico=152938&cboui=152938> (Acesso 4 de Junho de 2016).

Dykstra, M.J., Charlton, B.R., Chin, R.P., Barnes, H.J. (2013). Fungal Infections – Aspergillosis. In: D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, V. Nair (eds). *Diseases of Poultry*. Iowa State Press. Iowa, USA, 1077-1088.

Egg Info, (2016). *Egg Nutrition Information*, [Online] <http://www.egginfo.co.uk/egg-nutrition-information> (Acesso 11 de Outubro de 2016).

Esteves, J., Baptista, A., Rodrigo, F. (1992). *Dermatologia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1156.

Fraga, Marcelo E., Curvello, Fernando A., Magalhães, Ana P.C., Morenz, Mirton J. F. (2010). Avaliação da presença fúngica em ovos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras- Med Vet.*, 32 (2), 71-74.

Garcia, M.E, Blanco, J.L. (2000). Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Rev Iberoam Micol*, 17, 2-7.

Greco, R., Mancini, N., Peccatori, J., Cieri, N., Vago, L., Giglio, F., Morelli, M., Ghidoli, N., Carletti, S., Levati, G., Crucitti, L., Sala, E., Lupo Stanghellini, M. T., Lorentino, F., Forcina, A., Pavesti, F., Carrabba, M., Markt, S., Assanelli, A., Marcatti, M., Bernardi, M., Corti, C., Doglioni, C., Scarpellini, P., Burioni, R., Bonini, C., Clementi, M. & Ciceri, F. (2014). Early molecular diagnosis of aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia. *Heart Lung Vessel* 6 (2), 119-124.

Horizonte de Projecto (2010). *Instalação existente de produção avícola – aviário da quinta da Lapa II – da sociedade agrícola da quinta da Freiria, S.A. localizado na freguesia de A-dos-Cunhados concelho de Torres Vedras. Estudo de*

*Impacte Ambiental*. [Online] [http://siaia.apambiente.pt/AIADOC/AIA2429/RNT\\_Quinta-da-Lapa-II\\_EIA-859-2010.pdf](http://siaia.apambiente.pt/AIADOC/AIA2429/RNT_Quinta-da-Lapa-II_EIA-859-2010.pdf) (Acesso 19 de Abril de 2016).

Houriet, J. (2007). *Guías práctico de Enfermedades más comunes en aves de corral (Ponedoras y Pollos)*. [Online] [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_aves/enfermedades\\_aves/90-enfermedades.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/90-enfermedades.pdf) (Acesso 10 Abril de 2016).

Intervet (2006). *Aspergillus Control in Hatcheries with Clinafarm®*. [Online] [http://www.merck-animal-health-usa.com/binaries/IS-3083\\_Clinafarm\\_Detailer\\_Updated\\_wPages\\_Clinafarm\\_Brochure\\_Updated\\_tcm96-85648.pdf](http://www.merck-animal-health-usa.com/binaries/IS-3083_Clinafarm_Detailer_Updated_wPages_Clinafarm_Brochure_Updated_tcm96-85648.pdf) (Acesso 8 de Maio de 2016).

Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins- Vaccari, E.M & Takahashi de Melo, N. (2002). Tratado de micologia médica, 44, 297-298.

Lasheras Esteban, J. (1978). Manual de avicultura. Lisboa, Litexa, 238.

Ledour, L., Lines, C. (2008). Programa geral de desinfeção de explorações avícolas. Aves e Ovos (167), 4.

Lima, M., (2005). A evolução da avicultura Portuguesa e os desafios internacionais do sector. Socampestre, (5), 34.

Louzã, A.C. (1983). Doenças das Aves. Publicações Ciência e Vida Lda., Lisboa, 7- 22.

Leishangthem, G.D, Singh, N.D, Brar, R.S, Banga, H.S. (2015). Aspergillosis in avian species: a review. J Poul Sci Thechnol, 3 (1), 1-14.

Magalhães, A.P.C., Curvelho, Fernando A., Morenz, J.M., Calixto, L.F., Rezende, S. R. F. (2012). Qualidade de ovos comerciais de acordo com a integridade da casca, tipo de embalagem e tempo de armazenamento. Ver. De Ci. da Vida, RJ, EDUR, 32 (2) 51-62.

Majó, N., Dolz, R. (2011). Atlas de la necropsia aviar. SERVET, Merial, 32- 38.

Marshall, Ken (2015). Manter a cama do pavilhão seca para garantir um bom rendimento do bando. Aves e Ovos, (238), 4.

Marietto-Gonçalves, G., Lima, E., Andriguetti-Filho, R. (2008). Doenças respiratórias em aves atendidas no laboratório de Ornitologia da Fmvz-unesp/Botucatu-sp, Brasil, nos anos de 2005 a 2006 Archi Vet Sci, 13 (1), 40-45.

Mycology, 2001. University of Adelaide. [Online] <http://www.mycology.adelaide.edu.au/> (Acesso 2 de Abril de 2016).

Moreira F.A., Cardoso L., Coelho A.C. (2015) Assessment of *Aspergillus* spp. In a modern broiler breeder structure. Avian Biol Res, 8 (1), 35-40.

Moreira F.A., (2015). Contribution to the study of emerging infectious diseases in broiler breeders. Tese de doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

OIE, (2016). About us. [Online] <http://www.oie.int/> (Acesso 8 de Agosto de 2016).

Parkhurst, C. and Mountney, G. (1988). Poultry meat and egg production. New York: Van Nostrand Reinhold Co. 2ª Edição, 144.

Prata, A. (2007). Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humana- Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia. Universidade de Aveiro Departamento de Biologia.

Quinn P.J. Carter, M. E., Markey, B.H., Carter, B. R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology Wolf. London Wolfe, 1ª Edição, 391- 393.

Regulamento (CE) N° 853/2004 de 29 de Abril.

Ribeiro, L.C., Hahn, R.C., Favalessa, O.C., Tadano, T.& Fontes, C.J.F. (2009). Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brasil, 2005-2008. Rev Soc Bras Med Trop, 42 (6), 698-705.

Ross, (2013). Manual de Manejo. Aviagen 11-156.

Santos, H.,P. (2013). *Caderno de trabalho GT6 I Aves e Ovos*. [online] <http://inagri.org/wp-content/uploads/2013/06/Caderno-de-Trabalho-2%C2%AA-ST-Aves-e-Ovos.pdf> (Acesso 23 de Julho de 2016).

Sesti, L., (s.d.) *Biosseguridade em Avicultura: controle integrado de doenças*. [Online] [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/biosseguridade\\_em\\_avicultura\\_controle\\_integrado\\_de\\_doencas\\_000fyh9f5g002wx5ok0pvo4k3glwvvh1.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/biosseguridade_em_avicultura_controle_integrado_de_doencas_000fyh9f5g002wx5ok0pvo4k3glwvvh1.pdf) (Acesso 23 Março de 2016).

Soares, M.C. (1997). Incubação; Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1-40.

Soares, M. (2008). Avicultura eficiente Mitos, sucessos e ameaças. Aves e Ovos (167), 4.

Tang, Q., Tian, S., Yu, N., Zhang, X., Jia, X., Zhai, H., Sun, Q. and Han, L. (2016). Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol.,54 (4),950-955.

Tell, L. (2005). Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med Mycol*, 43 (1), 71-73.

Tessari, E.N.C., Cardoso, A.L.S.P., Castro, A.G.M., Kanashiro, A.M.I., Zanatta, G.F. (2004). Prevalência de aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade. *Arq. Inst Biol*, 71 (1),75-77.

Zanjani, L.S., Bakhtiari, A., Sabokbar, A., Khosravi, A.R, Bahonar, A.& Memarnejadian, A. (2012). Sensibilisation of asthmatic patients to extracted antigens from strains of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *J Medi Mycol*, 22 (1), 58-63.

Williams, C.J., Brake, J. (2000). Evaluation of application methods for control of *Aspergillus fumigatus* proliferation on the air cell membrane of in ovo injected broiler eggs. *Poult Sci*, 79, 1531-1535.

Williams, C.J., Murray, D.L., Brake, J. (2000). Development of a model to study *Aspergillus fumigatus* proliferation on the air cell membrane of in ovo injected broiler eggs. *Poult Sci*, 79, 1536-1542.

#### Cibergrafia consultada

1. <http://www.atlasmicologia.blogspot.pt/p/aspergillus-e-um-genero-de-fungos.html>- Patologia Clínica CHUC Coimbra Portugal (Acesso 10 de Maio de 2016).
2. [http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id\\_item=103](http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=103) (Acesso 6 de Junho de 2016).
3. <http://www.ovoscac.com/classificacao.php?m=5> (Acesso 25 de Setembro de 2016).
4. [http://www.pintoalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt\\_PT/?ObjectPath=/Shops/3130-160315/Categories/Sobre\\_a\\_Pinto\\_Valouro](http://www.pintoalouro.pt/epages/3130160315.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/3130-160315/Categories/Sobre_a_Pinto_Valouro) (Acesso 6 de Junho de 2016).
5. <http://www.gefor.4t.com/hongos/aspergillusfumigatus.html> (Acesso 17 de Setembro de 2016).

### **Agradecimento**

Agradeço reconhecidamente ao Senhor José António, administrador do Grupo Valouro por ter aceite o meu estágio na Quinta da Freiria, bem como, ao Senhor Professor Engenheiro Manuel Chaveiro em ter orientado o meu estágio.