Acta Scientiae Veterinariae, 2024. 52(Suppl 1): 947.

CASE REPORT
Pub. 947

ISSN 1679-9216

Candidose em galinhas d'Angola (*Numida meleagris*)

Candidosis in Guinea Fowl (*Numida meleagris*)

Heitor Dias Carneiro[1], Thomas Salles Dias[1], Daniele Soares Fialho[1], Elisabeth Martins da Silva da Rocha[2], Mariana Tavares Dias[3], Carlos Henrique Campello Costa[3], Virginia Léo de Almeida Pereira[1] & Dayse Lima da Costa Abreu[1]

ABSTRACT

***Background*:** Candidosis is a fungal disease caused by yeast of the genus *Candida*, which affects various bird species. The most common infection method involves ingesting contaminated food or water; however, contaminated environments, such as the litter and facilities may also expose birds to *Candida* spp. Diagnosis relies on lesion observation, direct microscopic examination, or mycological culture for isolation and identification. This report details an outbreak of candidosis in Guinea fowl, confirmed by etiological diagnosis, including isolation, identification, and anatomopathological analysis. ***Cases*:** Birds housed in an intensive Guinea fowl farm exhibited clinical signs in the 2nd week of life. Mortality increased in the 3rd week after the transfer from the rearing area to the ground area, with daily deaths reaching 30-40 birds. The affected birds displayed prostration, emaciation, diarrhea, and ruffled feathers. Tilmicosin-based antibiotic treatment was administered early in life and no response was observed after treatment with antifungal gentian violet. Five 7-week-old Guinea fowl from the farm underwent necropsy to observe macroscopic lesions and collect samples from the esophagus, crop, proventriculus, and intestines for mycological culturing and histopathological analysis using standard techniques. Macroscopic examination revealed alterations such as whitish, circular, and ulcerative lesions in the palate, esophagus, crop, and proventriculus; dilated and empty crops with thickened mucosa; accumulated urate in the ureters; and variations in intestinal mucosal thickness from thickened to thin. Histopathological analysis identified superficial layers of the esophagus, crop, and proventricular mucosa colonized with numerous yeast-like forms and pseudohyphae, characteristic of *Candida* spp. Esophagus and crop samples were cultured on YEPD agar and growth was verified under a stereoscopic microscope for culture purity. Ten colonies were isolated from these cultures, inoculated into YEPD broth tubes, and then incubated at 25°C for 48 h. Microcultures of the isolates on glass slides with 10 x 10 mm YEPD agar fragments were prepared and incubated at 25°C for 5-10 days in a humid chamber. After incubation, lactophenol cotton blue staining was performed, followed by microscopic observation of cellular morphology. The germ tube test was also performed by inoculating the isolates into tubes with 0.5 mL of human serum, incubating them at 37°C for 2 h, and then examining them under an optical microscope. The yeast isolates were tested on CHROMagar® *Candida* medium for chromogenic behavior, incubated at 30°C for 48 h, and the coloration observed was consistent with *Candida albicans*.
***Discussion*:** The observed anatomopathological lesions were consistent with those described in other cases of candidosis. The combination of antimicrobial use and digestive tract lesions supported the presumptive diagnosis of the disease, with a definitive etiological diagnosis confirmed by the mycological culture results. Treatment with gentian violet in water and nystatin in feed failed to yield the expected results. Administering antibiotics early in a bird's life can disrupt the balance of digestive tract microbiota, leading to yeast colonization. All subsequent flocks were treated with probiotics using the competitive exclusion principle to inhibit pathogenic bacterial microbiota growth and maintain a balanced commensal microbiota.

Keywords: Guinea fowl, candidiasis, fungal infection, mycose, microbiota, probiotics.

Descritores: galinha d'Angola, candidíase, infecção fúngica, micose, microbiota, probióticos.

DOI: 10.22456/1679-9216.134768

Received: 29 October 2023 Accepted: 10 March 2024 Published: 4 April 2024

[1]Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária & [2]Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brazil. [3]Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, RJ. CORRESPONDENCE: T.S Dias [thomassalles@id.uff.br]. Faculdade de Veterinária - UFF. Rua Vital Brasil Filho n. 64. CEP 24230-340 Niterói, RJ, Brazil.

INTRODUCÃO

Candidose é uma doença fúngica causada por leveduras do gênero *Candida*, que afeta várias espécies de aves [10,11,13], tendo a *Candida albicans* como o principal agente causador [10,12,16]. É um fungo comensal isolado do trato intestinal e superfícies mucocutâneas, inclusive de aves aparentemente saudáveis [10,14]. A ingestão de alimentos ou água contaminados é o meio mais comum para a infecção. Distúrbios no equilíbrio da microbiota, ou uma debilidade do hospedeiro, mais do que a exposição a uma fonte externa de contaminação, podem desencadear a enfermidade [2].

O diagnóstico é realizado a partir da observação das lesões, observação do agente por exame microscópico direto, usando colorações específicas para fungos, ou realizando cultivos micológicos para isolamento e identificação. Como a *Candida* spp. pode ser isolada também em aves sadias [10], deve se associar o cultivo positivo com a presença das lesões características e com os sinais clínicos. Na rotina laboratorial, diferentes testes são utilizados para diferenciar as espécies de *Candida* spp., tais como: assimilação de nitrogênio e de carboidratos, fermentação de carboidratos, prova da uréia e teste do tubo germinativo. A utilização de meios de cultura cromogênicos facilita o diagnóstico de infecções por *Candida* spp. [4]. A identificação da espécie de *Candida* é de particular importância para o diagnóstico etiológico da doença e confirmação da infecção por *Candida albicans*, espécie que apresenta maior patogenicidade [7].

Este relato reporta um surto de candidose em galinhas d'Angola, confirmado pelo diagnóstico etiológico e anatomopatológico.

CASOS

Foram encaminhadas ao Núcleo de Diagnóstico Avícola da Universidade Federal Fluminense (NUDIAV-UFF), Niterói, RJ, Brasil, 5 galinhas d'Angola com 7 semanas de vida, oriundas de uma criação intensiva que apresentava mortalidade diária de 30 a 40 aves. À anamnese foi informado que as aves começavam a apresentar sinais clínicos já na 2ª semana de vida e a mortalidade se intensificava na 3ª, quando havia transferência da área de cria para uma de recria no chão. As aves afetadas mostravam sinais de prostração, caquexia, diarreia e penas arrepiadas. Nos primeiros dias de vida as aves haviam recebido Tilmicosina[1], um antibiótico macrolídeo com ação predominante contra bactérias Gram-positivas. Após o aparecimento dos sinais clínicos, as aves foram tratadas com violeta de genciana, de ação antifúngica, na água de bebida, mas não houve resposta ao tratamento.

As aves encaminhadas ao laboratório foram eutanasiadas por deslocamento cervical na região atlanto-occipital [3,5] e necropsiadas em seguida, para observação de lesões macroscópicas: no caso da candidose, a cavidade oral, esôfago, inglúvio e proventrículo são os locais mais comumente afetados, com o surgimento de placas difteróides de coloração branco-acinzentada ou amarelada, erosões ou úlceras [6]. Foram coletadas amostras de esôfago e inglúvio com o auxílio de suabes estéreis, para cultivo micológico, e fragmentos de esôfago, inglúvio, proventrículo e intestino, que foram fixados em formalina a 10% para análise histopatológica.

Ao exame macroscópico foram observadas as seguintes alterações: inglúvio dilatado e espessado, sem conteúdo; palato, esôfago, inglúvio e proventrículo com lesões esbranquiçadas, circulares e ulcerativas; acúmulo de urato nos ureteres e mucosa intestinal variando de espessada a adelgaçada (Figuras 1 e 2). Após o processamento histológico as lâminas contendo os cortes de esôfago, inglúvio, proventrículo e intestino foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE)[2] e pelo ácido periódico de Schiff (PAS)[3], sendo examinadas nos aumentos de 4x, 100x e 400x. Na análise histopatológica o esôfago, inglúvio e proventrículo apresentaram as camadas superficiais das mucosas colonizadas por incontáveis formas leveduriformes e pseudohifas, características

Figura 1. Galinha D´Angola. Cavidade oral apresentando lesões diftéricas e ulcerativas na mucosa e na entrada do esôfago.

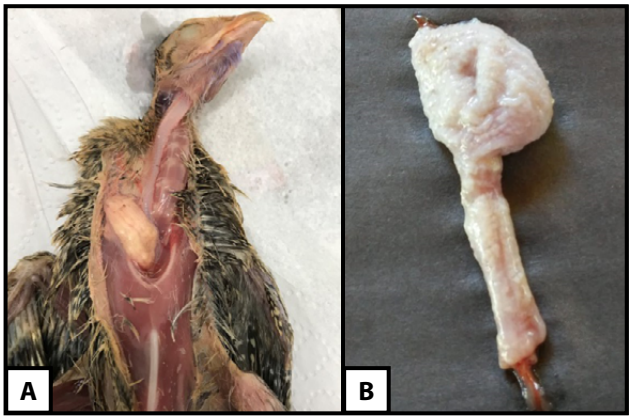

Figura 2. Galinha D´Angola. A- Inglúvio fechado apresentando lesões estriadas esbranquiçadas. B- Inglúvio e entrada do esôfago com abertura longitudinal mostrando a mucosa espessada com lesões diftéricas, ulcerativas e estriadas.

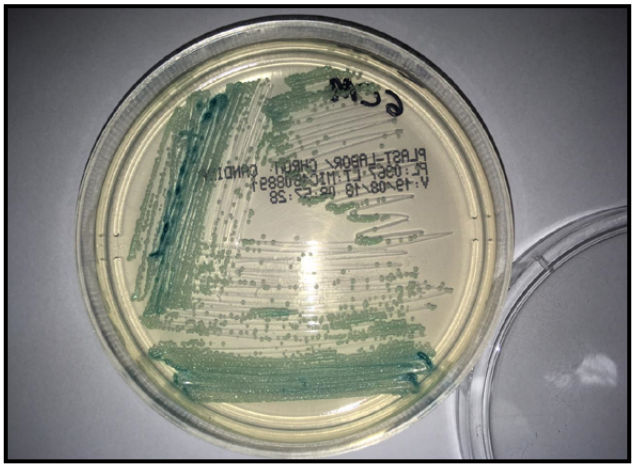

Figura 3. Placa com CHROMagar® *Candida* com crescimento de colônias esverdeadas, características de *Candida* spp.

de *Candida* spp. notando-se ainda, discretos infiltrados inflamatórios linfomonocitários (Figuras 4 e 5).

As amostras de esôfago e inglúvio coletadas com suabes foram cultivadas em ágar malte-levedura (YEPD)[4], para fazer a purificação dos isolados, e incubados a 25ºC durante 48 h. O crescimento foi observado com o auxílio de microscópio estereoscópico, para certificação da pureza das culturas. Após esta etapa foram coletadas 10 colônias que foram semeadas em tubos com caldo YEPD[1] e incubados a 25ºC por 48 h. A partir destes tubos foi realizado o microcultivo dos isolados em lâminas de vidro com fragmentos de 10 x 10 mm de ágar YEPD[1] e incubadas a 25ºC por 5 a 10 dias, em câmara úmida. Após este período as lâminas foram tratadas com lactofenol-azul de algodão e levadas ao microscópio para observação da morfologia celular.

As colônias produzidas no cultivo micológico apresentaram-se lisas e brilhantes, sem rugosidades. Microscopicamente se observou grande quantidade de blastoconídios, alguns clamidoconídios e presença de pseudohifas. A coloração observada no teste de comportamento cromogênico foi compatível com a espécie *Candida albicans*. Os testes utilizados para o diagnóstico etiológico da candidose revelaram apenas a presença da *Candida albicans.*

As leveduras encontradas foram estriadas em meio CHROMagar®Candida[1] (Figura 3), para o teste de comportamento cromogênico e incubadas a 30ºC por 48 h. Este teste foi realizado em triplicata.

A prova do tubo germinativo foi realizada para determinar a capacidade de produção de hifas verdadeiras para a identificação de um isolado leveduriforme desconhecido, permitindo a distinção entre *C. albicans* de outras espécies de leveduras. Essa prova foi realizada, inoculando-se os isolados em tubos com 0,5 mL de soro humano e incubados a 37ºC por 2 h. Após este período foi feita a leitura em microscópio óptico, com uma gota de suspensão entre lâmina e lamínula. Foi observado que todos os isolados testados produziram tubo germinativo e clamidoconídios.

DISCUSSÃO

Candidose é uma micose causada pela infecção por fungos do gênero *Candida,* afetando diversas espécies de aves, sendo *C. albicans* a principal espécie relatada em surtos. Os sinais clínicos da candidose não são

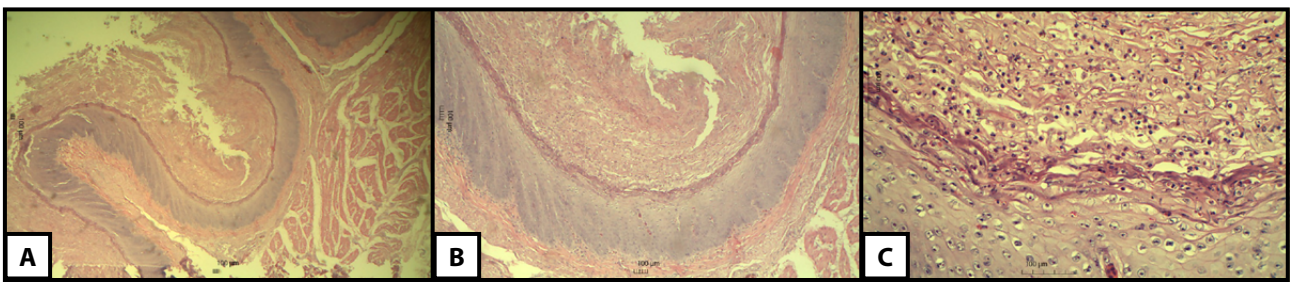

Figura 4. A- Inglúvio: acentuada descamação celular da mucosa [HE; 4x]. B- Inglúvio: destaque maior da descamação celular [HE; 10x]. C- Inglúvio: presença de formas sugestivas de corpos leveduriformes [HE; 40x].

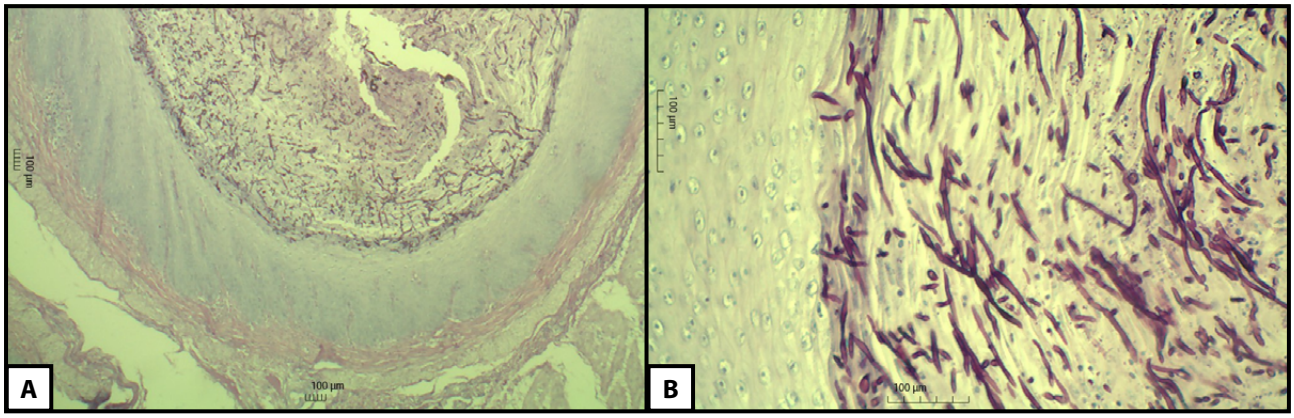

Figura 5. A- Inglúvio: presença de numerosas pseudohifas junto às células descamadas [PAS; 10x]. B- Inglúvio: numerosas pseudohifas nas células descamadas e invadindo o epitélio íntegro superficialmente [PAS; 40x].

característicos, podendo ocorrer apatia, crescimento insatisfatório das aves e penas arrepiadas [6]. As lesões associadas à candidose em aves variam dependendo dos órgãos afetados. No papo, as lesões são caracterizadas pela presença de placas brancas semelhantes a coalhadas na superfície mucosa, que podem levar a um espessamento da parede do papo e uma redução na função do papo. No proventrículo, as lesões são caracterizadas por um espessamento da superfície mucosa, que pode levar a uma redução na função gástrica. No intestino, as lesões podem levar à formação de massas brancas semelhantes a coalhadas no lúmen, bem como um espessamento da superfície mucosa. Na cloaca, as lesões são caracterizadas pela presença de massas brancas semelhantes a coalhadas na superfície mucosa, que podem levar a uma redução na função da cloaca.

O relato do uso de antibiótico tilmicosina, associado às lesões no trato digestivo a partir da 2ª semana de vida das aves deram suporte ao diagnóstico presuntivo da doença. A tilmicosina é um antibiótico macrolídeo bacteriostático de largo espectro sintetizado a partir da tilosina apenas para uso veterinário. Possui um espectro antibacteriano predominantemente eficaz contra *Mycoplasma* spp., *Pasteurella* spp. e vários organismos Gram-positivos [1]. A utilização excessiva de antibióticos pode levar a um desequilíbrio na comunidade microbiana intestinal, favorecendo o crescimento excessivo de *Candida* spp. e aumentando a susceptibilidade à infecção fúngica [15]. O uso de antibióticos causa o desequilíbrio da microbiota do trato digestivo, favorecendo a colonização pela levedura [6,12].

Embora *Candida albicans* seja a espécie mais frequente, vários estudos relatam a presença de infecção mista, por isso é importante o diagnóstico etiológico [10,12-14]. Visto que o agente pode ser isolado de aves sadias [10], é importante associar o cultivo positivo com a presença dos sinais clínicos e das lesões características.

Como a infecção não foi controlada com o uso de antifúngicos, todos os novos lotes foram submetidos ao tratamento com probiótico composto por microrganismos de exclusão competitiva e os processos de higiene de instalações e equipamentos utilizados desde o 1º dia das aves foram revisados. O uso de probióticos tem sido estudado como uma alternativa para mitigar a candidose aviária, uma vez que eles podem ajudar a restaurar a microbiota intestinal normal e reduzir a susceptibilidade das aves à infecção fúngica. Vários estudos científicos têm demonstrado os efeitos benéficos dos probióticos na prevenção e tratamento da candidose aviária [8,9].

Em conclusão, o uso de probióticos pode ser uma alternativa eficaz para mitigar a candidose aviária, ajudando a restaurar a microbiota intestinal normal das aves e reduzindo a susceptibilidade à infecção fúngica. No entanto, é importante destacar que o uso de probióticos deve ser feito de forma adequada e baseada em evidências científicas para garantir sua eficácia na prevenção e tratamento da candidose aviária. As lesões macroscópicas e microscópicas, associadas ao isolamento fúngico, confirmaram o diagnóstico de candidose, causada por *Candida albicans*, em galinhas d'Angola de criação intensiva.

MANUFACTURERS

[1]Elanco. São Paulo, SP, Brazil.
[2]Laborclin Produtos para Laboratórios. São Paulo, SP, Brazil.
[3]EasyPath Diagnósticos. Indaiatuba, SP, Brazil.
[4]Difco Laboratories. Detroit, MI, USA.

***Declaration of interest*.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1 **Abu-Basha E.A., Idkaidek N.M. & Al-Shunnaq A.F. 2007.** Pharmacokinetics of Tilmicosin (Provitil Powder and Pulmotil Liquid AC) Oral Formulations in Chickens. *Veterinary Research Communications*. 31(4): 477-485. DOI: 10.1007/s11259-006-3543-6.

2 **Arné P. & Lee M.D. 2020.** Fungal Infections. In: *Diseases of Poultry.* 14th edn. Chapter 25. Ames: Wiley Blackwell, pp.1109-1133. DOI: 10.1002/9781119371199.ch25.

3 **AVMA. 2020.** *American Veterinary Medical Association guidelines for the euthanasia of animals.* Schaumburg: AMVA, 121p.

4 **Brito E.H.S., Fontenelle R.O.S., Brilhante R.S.N., Cordeiro R.A., Sidrim J.J.C. & Rocha M.F.G. 2009.** Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Ciência Rural*. 39(9): 2655-2664. DOI: 10.1590/S0103-84782009000900046.

5 **CFMV. 2013.** Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados. Brasília: CFMV, 66p.

6 **Dykstra M.J., Charlton B.R., Chin R.P. & Barnes J.H. 2013.** Candidiasis. In: Swayne D.E. (Ed). *Diseases of Poultry.* 13th edn. Ames: Wiley Blackwell, pp.1088-1090.

7 **Fakhim H., Vaezi A., Dannaoui E., Chowdhary A., Nasiry D., Faeli L., Meis J.F. & Badali H. 2018.** Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses*. 61(6): 377-382. DOI: 10.1111/myc.12754.

8 **Jha R., Das R., Oak S. & Mishra P. 2020.** Probiotics (Direct-Fed Microbials) in Poultry Nutrition and Their Effects on Nutrient Utilization, Growth and Laying Performance, and Gut Health: A Systematic Review. *Animals*. 10(10): 1863. DOI: 10.3390/ani10101863.

9 **Kabir S.M.L. 2009.** The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *International Journal of Molecular Sciences*. 10(8): 3531-3546. DOI: 10.3390/ijms10083531.

10 **Kumar S., Kumar M.R., Mahalakshmi V. & Kavitha S. 2017.** Candidiasis in a Parakeet an Avenue to Zooanthroponosis. *Journal of Animal Health and Production*. 5(3): 85-88. DOI: 10.17582/journal.jahp/2017/5.3.85.88.

11 **Lanteri G., Macrì F., Rapisarda G., Basile F., Reale S. & Marino F. 2012.** Systemic candidiasis in farm-reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*) caused by *Leucosporidium* spp. *BMC Veterinary Research*. 8(1): 81. DOI: 10.1186/1746-6148-8-81.

12 **Moretti A., Piergili Fioretti D., Boncio L., Pasquali P. & Del Rossi E. 2000.** Isolation of *Candida rugosa* from Turkeys. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 47(6): 433-439. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2000.00367.x

13 **Mugale M., Bhat A.A., Gavhane D.S. & Bhat S.A. 2015.** Outbreaks of thrush in pigeons in Punjab State of India. *Comparative Clinical Pathology*. 24(3): 635-638. DOI: 10.1007%2Fs00580-014-1958-y.

14 **Osorio C., Fletcher O., Dykstra M.J., Post K. & Barnes H.J. 2007.** Comb candidiasis affecting roosters in a broiler breeder flock. *Avian Diseases*. 51(2): 618-622. DOI: 10.1637/0005-2086(2007)51[618:ccaria]2.0.co;2.

17 **Ventin-Holmberg R., Saqib S., Korpela K., Nikkonen A., Peltola V., Salonen A., de Vos W.M. & Kolho K.-L. 2022.** The Effect of Antibiotics on the Infant Gut Fungal Microbiota. *Journal of Fungi*. 8(4): 328. DOI: 10.3390/jof8040328.

18 **Wyatt R.D. & Hamilton P.B. 1975.** *Candida* Species and Crop Mycosis in Broiler Chickens. *Poultry Science*. 54(5): 1663-1666. DOI: 10.3382/ps.0541663.