

Aspergilozy u dzikich ptaków.

Część II. Patogeneza, diagnostyka i leczenie

Sebastian Gnat, Dominik Łagowski

z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Aspergillosis in wild birds. Part II. Pathogenesis, diagnosis, and treatment

Gnat S., Łagowski D., Sub-Department of Microbiology, Institute of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Aspergillosis holds a very special place in veterinary and human medicine, because it is the main type of mycoses, affecting birds and mammals, including humans. The objective of this review was to synthesize the current knowledge of aspergillosis in wild avifauna in the context of the pathogenesis, diagnosis, and treatment of this infection. Aspergillosis typically occurs after inhalation of ubiquitously available spores, but localized infections of the eye or skin are also possible. Acute disease may occur following exposure to a substantial number of spores from a point source. The more chronic forms are slowly progressing infections that affect birds showing some degree of immunodeficiency and may result from regular inhalation of spores. Aspergillosis usually presents with the development of progressive and severe dyspnea with gasping, accelerated open-mouth breathing, tail bobbing, and sometimes a non-productive cough. Gurgle, rales, or wheezy sounds and a change in the voice may be heard in cases of mycotic tracheitis. Treatment of avian aspergillosis, when possible, is not always successful because of the often advanced stage of the disease when the diagnosis is confirmed, the lack of pharmacokinetic data on antifungal drugs in most avian species, the failure of drugs to penetrate target tissues, and the frequent presence of concurrent diseases and immunosuppression. An oral solution of itraconazole has recently been registered as the first antifungal product for ornamental birds in Europe. Moreover, aspergillosis prevention measures are based on two main axes: controlling the level of exposure and minimizing the stressors.

Keywords: aspergillosis, birds, pathogenesis, diagnostics, treatment.

Aspergilozy obejmują szeroki zakres jednostek chorobowych wywoływanych przez grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus*, pospolicie określane jako kropidlaki. Ich rozpowszechnienie jest bardzo szerokie, spotykane są na całym świecie, a ich zarodniki występują w powietrzu, glebie i rozkładającej się materii organicznej. Pleśnie *Aspergillus* we właściwych warunkach temperatury i wilgotności mogą być zarówno silnie toksyczne, jak i chorobotwórcze. Kontakt z zarodnikami tych pleśni może prowadzić do reakcji alergicznych, powierzchniowych zakażeń skórnych, ograniczonych miejscowo zakażeń inwazyjnych, zakażeń płucnych, czy też chorób rozsianych. Najczęstszą drogą zakażenia jest układ oddechowy. Rzadziej dochodzi do zakażeń drogą pokarmową czy przez uszkodzoną skórę lub śluzówki.

W niniejszym artykule przedstawione są najnowsze dane dotyczące aspergilozy u dzikich ptaków żyjących na wolności i w niewoli. W drugiej części przeglądu literatury scharakteryzowana została patogeneza zakażeń, objawy kliniczne i zmiany histopatologiczne.

Podjęte zostały również zagadnienia związane z leczeniem aspergilozy, a także możliwymi sposobami prewencji zakażeń.

Patogeneza

Głównymi wrotami zakażenia grzybami z rodzaju *Aspergillus* jest zwykle układ oddechowy. Niemniej jednak w literaturze opisane są również aspergilozy oka lub skóry (1, 2). Klasycznie rozróżnia się zakażenie ostre i przewlekłe. W pierwszej z wymienionych postaci choroba najczęściej występuje po ekspozycji na zarodniki pleśni *Aspergillus* spp. znajdujące się w zamkniętej przestrzeni w bardzo dużej liczbie. Niestety, jak dotąd nie określono dawki zakaźnej, która u ptaków immunokompetentnych może wywołać stan chorobowy. Natomiast postaci przewlekłe to wolno postępujące zakażenia, które występują u ptaków wykazujących niedobory odporności i prawdopodobnie wynikają z regularnego wdychania niższych dawek zarodników (3).

Eksperymentalne modele ostrej aspergilozy wskazują, że jeśli dawka nie jest duża, tj. od 10^6 do 10^8 zarodników, rzadko dochodzi do rozwoju choroby u ptaków (4). Podanie dotchawicze (IT) u szpaków (*Sturnus vulgaris*) dawki $1,35 \times 10^6$ zarodników powodowało śmiertelność u 100% ptaków w ciągu 6 dni (5). Inokulum zawierające 1×10^7 i 2×10^7 zarodników wstrzykniętych do piersiowego worka powietrznego powodowało padnięcia u 100% gołębi skalnych (*Columba livia*), ale dawka ta nie spowodowała padnięcia u żadnego z hybrydowych sokołów (*Falco rusticolus* x *F. cherrug*; 6, 7). W innym eksperymencie wszystkie sokoły, tj. sokoły wędrowne (*Falco peregrinus*) i sokoły hybrydowe (*Falco rusticolus* x *F. cherrug*), które otrzymały dotchawiczo dawkę 2×10^7 zarodników, uległy zakażeniu o ostrej postaci, a ich stan pogarszał się w bardzo szybkim tempie (8). Natomiast śmiertelna dawka 50 (LD_{50}) zarodników *Aspergillus* dla przepiórek japońskich (*Coturnix japonica*) została ustalona na poziomie $12,03 \times 10^6$ (9). Na podstawie wyników badań histopatologicznych jako metody diagnostycznej w wywołanej doświadczalnie aspergilozie u sokołów hybrydowych (*Falco rusticolus* x *F. cherrug*) oznaczono dawki zakaźne na poziomie: $MID_{10} = 10^{1,95 \pm 1,26}$, $MID_{50} = 10^{4,52 \pm 0,67}$ i $MID_{90} = 10^{7,10 \pm 1,33}$. Uzyskane w ten sposób dane pozwoliły określić tolerowane stężenie zarodników w powietrzu, czyli takie stężenie zarodników, które wdychane w ciągu 24 godz. przez sokoła nie wywoła ostrego zakażenia na poziomie $86,50 \text{ CFU/m}^3/\text{h}$ (4,10–12). Pomiar stężenia zarodników *Aspergillus fumigatus* w powietrzu wewnątrz pomieszczeń w niemieckim ośrodku hodowli sokołów, trzech kalifornijskich

ośrodkach rehabilitacji dzikich ptaków i jednym włoskim ośrodku rehabilitacji wynosiły odpowiednio 45, 50 i aż 525 CFU/m³ (3). Dane doświadczalne ujawniają istotne trudności w skorelowaniu teoretycznej ekspozycji na dane stężenie zarodników w powietrzu i występowaniu u ptaków aspergilozy. Prawdopodobnie w prawidłowym zrozumieniu tej zależności odgrywa rolę gatunkowa i osobnicza podatność ptaków na zakażenie pleśniami *Aspergillus*. Dodatkowo większość grzybic u ptaków dzikich żyjących w niewoli może być związana z kwestiami stresu związanego z hodowlą, a nie z obecnością określonych populacji grzybów w powietrzu (13). Anatomiczno-fizjologiczne cechy układu oddechowego ptaków oraz ich wrodzona odpowiadź immunologiczna mogą sugerować, że wszystkie gatunki ptaków są podatne na rozwój aspergilozy w sprzyjających warunkach. Zarodniki *A. fumigatus*, gdy są wdychane przez nozdrza, są wystarczająco małe (14), aby ominąć klirens śluzowo-rzęskowy górnych dróg oddechowych i rozprzestrzeniać się poprzez tylne worki powietrzne do płuc (15, 16). Zajęta chorobowo może być również tchawica lub krtań ze względu na osobliwości anatomiczne u ptaków, takie jak pętle tchawicze u łabędzi (17). Worki powietrzne są szczególnie podatne na zakażenie przez pleśnie *Aspergillus*, ponieważ system przepływu powietrza przez te narządy sprzyja odkładaniu się cząstek, a brak dostępnych makrofagów oraz powierzchnia nabłonka prawie pozbawiona mechanizmu transportu śluzowo-rzęskowego uniemożliwia usuwanie ciał obcych (18). Termofilne zarodniki pleśni znajdują w tych organach idealne warunki temperatury i napowietrzania, aby rozpocząć kiełkowanie i wytwarzanie wielokomórkowych strzępek (19). Rozwój grzybni powoduje martwicę tkanek i wywołuje silną reakcję gospodarza, która może mieć przebieg ziarniniakowy i/lub naciekowy, w zależności od statusu immunologicznego ptaka (20). Reakcja ta opiera się na mieszanej odpowiedzi zapalnej, która obejmuje działanie makrofagów, wielojądrowych komórek olbrzymich i heterofilii. Komórki te tworzą się w mięszu płuca w postaci charakterystycznych ziarniniaków wokół centrum martwiczego, zawierającego rozrastające się strzępki grzyba, które mogą być otoczone zewnętrzną warstwą tkanki włóknistej lub stanowić blaszki wyściełające błony worków powietrznych lub drogi oddechowe (21). W badaniach *in vitro* makrofagi gołębi skalnych (*Columba livia*) wykazują ograniczoną zdolność do zabijania fagocytowanych zarodników, ale hamują ich kiełkowanie. Fakt, że wewnątrzkomórkowe kiełkowanie, a następnie śmierć komórki może nastąpić dopiero po wielokrotnym narażeniu na zarodniki, może wyjaśniać ograniczoną skuteczność tej pierwszej linii obrony w przypadkach ekspozycji na wysokie dawki zarodników (22). Granulocyty heterofilne drugiej linii obrony zabijają strzępki grzybów za pomocą mechanizmów zarówno oksydacyjnych, jak i nieoksydacyjnych. Gdy odpowiedź immunologiczna jest mniej skuteczna, reakcje tkankowe obejmują wysiękowe zapalenie z komórkami olbrzymimi, makrofagami, heterofilami i limfocytami. W takim przypadku grzyb może rozprzestrzeniać się z układu oddechowego przez układ krążenia poprzez kości

lub ze ściany worka powietrznego do sąsiednich narządów lub jam. Hematogenne lub limfatyczne rozpowszechnianie elementów grzybów umożliwia penetracja strzępek do naczyń krwionośnych płuc oraz za pomocą makrofagów niosących żywotne zarodniki. W odpowiednich warunkach tlenowych rozmnażanie bezpłciowe grzybów w workach powietrznych jest powszechne, a cechą z nim związaną jest zmiana zabarwienia i struktury ścian worków, które stają się aksamitne i przybierają ciemny kolor o barwie zróżnicowanej w zależności od gatunku *Aspergillus* będącego czynnikiem etiologicznym zakażenia (20). Wykorzystując metody genotypowania, w kilku badaniach wykazano bardzo wysoki polimorfizm w obrębie gatunku *Aspergillus fumigatus* izolowanego ze środowiska lub narządów wewnętrznych zarówno zdrowych, jak i chorych ptaków (23). Pochodzenie tej zmienności, rola rozmnażania płciowego w jej występowaniu oraz przypuszczalne patologiczne implikacje pozostają niejasne (19). Ponadto zakażenia poliklonalne zostały opisane u pingwinów oraz piskląt bociana białego (23, 24).

Z punktu widzenia patogenezy aspergilozy interesujące jest, że wiele gatunków pleśni z rodzaju *Aspergillus* syntetyzuje i wydziela do środowiska wzrostu mykotoksyny. Dokładna rola tych metabolitów wtórnych w rozwoju aspergilozy nie jest do końca wyjaśniona. Wykazano, że alkaloid ergoliny, tj. fumigaklawina A, jest wytwarzany przez *A. fumigatus* w przebiegu ostrej aspergilozy u sokołów (*Falco* sp.; 20). U indyków wysokie stężenia gliotoksyny, czyli mykotoksyny o działaniu immunosupresyjnym, wykryto w płucach ptaków eksperymentalnie zaszczepionych *A. fumigatus* (25). Ponadto limfocyty obwodowe krwi indyków wystawione na działanie wysokich poziomów gliotoksyny albo obumarły, albo wykazywały słabszą odpowiedź limfoblastogenną (26). Niemniej jednak celem tego artykułu nie jest charakterystyka mykotoksykoz (w szczególności spowodowanych spożyciem aflatoksyn), które, jak już wykazano, są odpowiedzialne za wysoką śmiertelność dzikiej awifauny w związku ze spleśniałym ziarnem lub zanieczyszczonymi karmnikami (27, 28).

Objawy kliniczne

Opis objawów klinicznych aspergilozy u dzikich ptaków jest utrudniony, ponieważ chore ptaki żyjące na wolności zwykle są odnajdywane, kiedy znajdują się w stanie agonalnym lub pośmiertnie. Ostra aspergiloza zwykle objawia się dość niespecyficznymi objawami, takimi jak letarg, otępienie i potargane pióra (21). Brak apetytu i anoreksja są również opisywane w ostrej aspergilozie, ale wyraźna utrata masy ciała jest raczej związana z przewlekłymi postaciami choroby. Ptaki żyjące na wolnym wybiegu mogą niechętnie uciekać, chodzić z wysiłkiem i dlatego łatwo je złapać (29). Polidypsja, wielomocz, opadanie skrzydeł, zahamowanie wzrostu i nagła śmierć są objawami opisywanymi w ostatnim stadium choroby. Wszystkie te objawy są podobne do objawów zatrucia łożowcem (3). Sokolnicy zgłaszają, że pierwsze objawy są niespecyficzne i obejmują spadek aktywności, utratę zdolności do

polowania na zdobycz, a nawet latania (30). Bardziej charakterystycznym objawem jest rozwój postępującej i ciężkiej duszności ze słyszalnym westchnieniem, przyspieszonym oddychaniem z otwartym dziobem, podskakiwaniem ogonem, a czasem także kaszlem. W przypadku grzybiczego zapalenia tchawicy można usłyszeć bulgotanie, rżężenie lub świszczący oddech i zmianę barwy dźwięku (31, 32, 33). Nieżyt nosa i zapalenie zatok z obfitymi wydzielinami z noszrzy opisywane są u papug (34). W eksperymentalnym zakażeniu grzybami z rodzaju *Aspergillus* u szpaków, gołębi, przepiórek japońskich i gołębi skalnych często występują objawy oddechowe, przede wszystkim przyspieszenie oddechu, duszność z sapaniem, oddychanie brzuszne, a także inne objawy, tj. depresja, anoreksja i potargane pióra. Rzadziej obserwuje się zielonkawy kałomocz i wymioty (6, 35).

Nietypowe objawy kliniczne mogą dotyczyć narządów innych niż drogi oddechowe. Abrams i wsp. (2) opisali u sokołów (*Falconidae*) ciężkie obustronne zapalenie skóry powiek, które stopniowo rozciągało się do głowy. Natomiast u papug (*Psittaciformes*) stosunkowo często zakażenie umiejscowione jest w wewnętrznych komorach oka, co objawia się epiforą, kurczem powiek, światłowstrętem, obrzękiem okołoooczodołowym i owrzodzeniem rogówki (1, 36). Aspergilozy obejmujące ośrodkowy układ nerwowy powodują utratę koordynacji mięśniowej, skręcenie szyi i utrzymywanie głowy w nieprawidłowych pozycjach (37, 38). U bażantów łownych (*Phasianus colchicus*), kakadu czarnego (*Probosciger aterrimus*) i gągołka (*Bucephala albeola*) zgłaszano nieprawidłowe ruchy kończyn i porażenie związane z uszkodzeniami kręgosłupa lub okolic nerek (39, 40, 41).

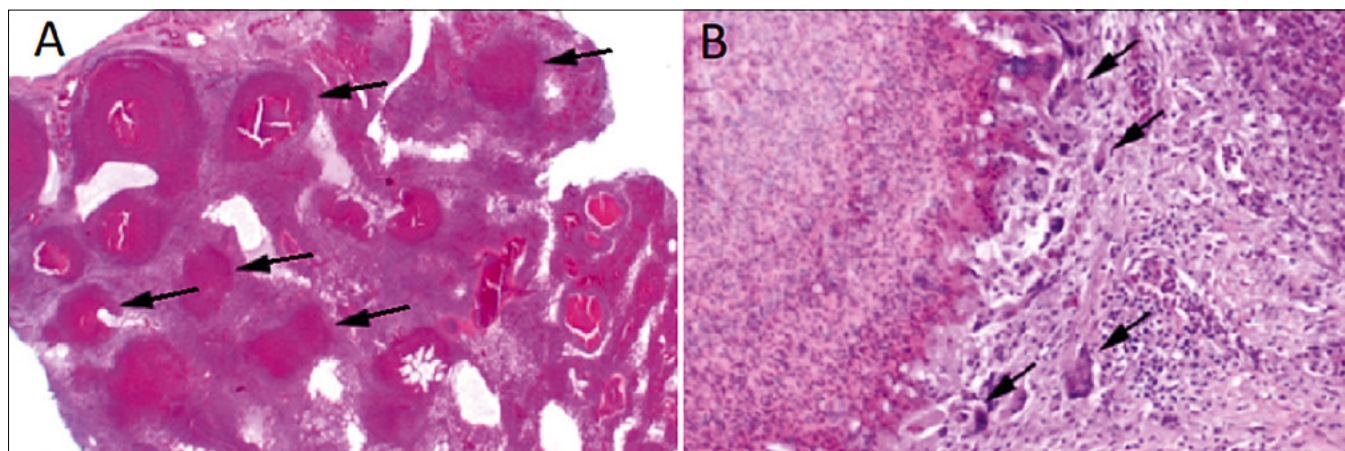
Zmiany patologiczne

Zmiany patologiczne w przebiegu aspergilozy są zróżnicowane w zależności od postaci choroby (23, 31, 32, 37, 42). Ptaki z ostrą aspergilozą są na ogół w ogólnej dobrej kondycji zdrowotnej (43, 44), podczas gdy wyniszczenie z zanikiem mięśni piersiowych i znikomą warstwą tłuszczu podskórnego oraz odwodnienie są cechami zakażenia przewlekłego (45, 46, 47). Horowitz i wsp. (48) ujawnili, że wychudzenie jest skorelowane

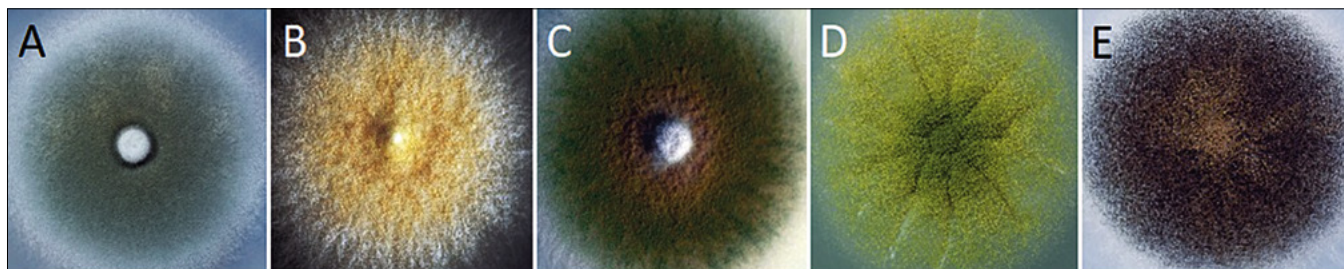
z rozwojem choroby u nurów pospolitych (*Gavia immer*) przebywających w ośrodkach ochrony dzikich ptaków. Souza i Degernes (17) kwalifikowali zakażenie jako łagodne, gdy dotyczyło tylko jednego narządu, m.in. tchawicy, płuc lub worków powietrznych, a jako ciężkie, gdy dotyczyło co najmniej dwóch lokalizacji. Niemniej jednak zajęcie samej krtani lub tchawicy może zagrażać życiu, powodując uduszenie (49). Płuca i tylne worki powietrzne (pary piersiowa i brzuszna) są zajęte przez pleśń częściej niż worki powietrzne przednie (4). W początkowej fazie choroby występują zmiany krwotoczne i obrzękowe, które następnie przekształcają się w zapalenie ziarniniakowe (48). Zmiany makroskopowe obejmują białozółtawe, pojedyncze lub liczne kuliste guzki, od prosówkowych (<1 mm średnicy) do dużych (>40 mm), występujących na błonie surowiczej i mięszu zajętych narządów (38, 50). Podczas koalescencji w workach powietrznych guzki te, różniące się wielkością i kształtem, tworzą serowate blaszki pokrywające pogrubione błony dróg oddechowych, a nawet blokując całe ich światło. Jednocześnie na błonach może zachodzić zarodnikowanie grzybów, o czym świadczy szarozielonkawy do czarnego, bawełnianej tekstury nalot (20, 51).

Histopatologia

Badanie mikroskopowe bioptatów płuc gęsi kanadyjskich (*Branta canadensis*), ofiar epidemii aspergilozy, doprowadziło do opisanego trzech różnych typów infekcji płuc: ostrego krwotocznego zapalenia płuc z niewielką liczbą komórek w drogach oddechowych, postaci podostrej związanej z ziarniniakami serowatymi zawierającymi komórki olbrzymie i grzybnie promienistą oraz przewlekłej, charakteryzującej się rozległą utratą prawidłowej architektury tkankowej po utworzeniu ziarniniaka i hepatyzacji (3). Natomiast na podstawie różnic histopatologicznych Cacciutello i wsp. (20) wyróżnili: głęboką postać guzkowatą aspergilozy występującą w nienapowietrzonym mięszu płuca i powierzchowną postać, rozlaną w napowietrzanej tkance, z ziarniniakami obecnymi także w mięszu płucnym (37, 52). Klasyczna struktura ziarniniaków heterofilnych składa się z centrum martwiczego zawierającego zdegenerowane heterofile



Ryc. 1. Ziarniniaki heterofilne wieloogniskowe (A) oraz warstwa heterofili i makrofagów na obwodzie ziarniniaków (B; zaznaczone strzałkami) w przebiegu aspergilozy u dziwonosa szarobocznego (*Sarkidiornis melanotos*)



Ryc. 2. Zróżnicowanie morfologiczne różnych gatunków pleśni *Aspergillus* powodujących zakażenia u ptaków. A: *Aspergillus fumigatus*; B: *A. terreus*; C: *A. nidulans*; D: *A. flavus*; E: *A. niger*

i promieniowo ułożone elementy grzybowe otoczone nienaruszonymi heterofilami oraz warstwą makrofagów nabłonkowych, wielojądrowych komórek olbrzymich i rzadszych limfocytów lub komórek plazmatycznych (23; ryc. 1). W postaciach przewlekłych skuteczna odpowiedź immunologiczna gospodarza może skutkować utworzeniem warstwy włóknistej otaczającej ziarniniaka.

W płucach naciekowa lub rozlana postać choroby powoduje przekrwienie, mikrokrwotoki, utratę wysięczki nabłonka w oskrzelach i zastąpienie jej wysiękiem zapalnym i komórkami odpornościowymi, głównie zdegenerowanymi heterofilami i makrofagami rozciągającymi się na mięsz obwodowy i opłucną (3). Struktura płuc w konsekwencji może być całkowicie pokryta obszarami martwicy z powodu koalescencji sąsiednich zianiniaków przyoskrzelowych (45, 53). Nagromadzenie różnych elementów grzybiczych, tj. konidioforów, zarodników i strzępek, wysięk zapalny i liczne komórki odpornościowe w drogach oddechowych i wokół nich to wspólne cechy wszystkich postaci aspergilozy (38, 44). Inwazja grzybicza w płucach powoduje krwotoki, zakrzepicę naczyń, zawał tkanek i przypuszczalne rozprzestrzenianie *Aspergillus* do odległych narządów (47, 54). Ściany worków powietrznych są gęsto pokryte przez nacieki zawierające fibrynę, heterofile i makrofagi, natomiast ich powierzchnia jest skolonizowana przez grzybnię z sporadycznie występującymi konidiami (50, 55). Obecność kryształów szczawianu w obszarach martwych jest odkryciem ostatnich lat (55), ale częstość tego zjawiska w aspergilozie ptaków może być niedoszacowana i wymaga dalszych badań.

U kilku gatunków papug (*Psittacidae*) zauważono mikroskopijne zmiany górnych dróg oddechowych, którym prawdopodobnie towarzyszyły zniekształcenia nozdrzy (z obecnością rinolitów) i dzioba, ze strzępkami wypełniającymi jamę nosową i zatoki przynosowe, naciekającymi naczynia krwionośne, pęczki nerwowe, chrząstki małżowin nosowych i kości nosowych (32, 34). W wyciętym oku papugi amazońskiej (*Amazona aestiva*) Hoppes i wsp. (36) opisali rozległe, ciężkie heterofilne, limfocytarne-plazmocytarne i ziarniniakowe zapalenie rogówki, zapalenie twardówki i zapalenie przedniego odcinka błony naczyniowej oka. W przypadku braku zmian histopatologicznych w układzie oddechowym, a stwierdzeniu elementów grzybiczych w rogówce, sugerowane jest bezpośrednie zanieczyszczenie oka przez kontakt. W tych przypadkach wrotami zakażenia nie jest układ oddechowy (3).

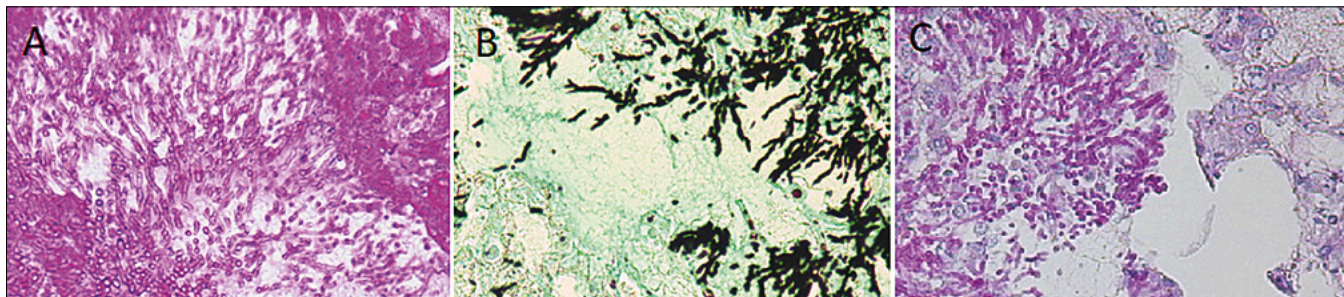
Diagnostyka

Rozpoznanie aspergilozy u dzikich ptaków wykonywane jest zarówno przeżyciowo, jak i/lub pośmiertnie (56). Objawy kliniczne są niespecyficzne, również inne grzyby niż kropidlaki *Aspergillus* wywołują podobne zmiany chorobowe (23, 57). Ponadto, ze względu na wszechobecny charakter pleśni *Aspergillus* w środowisku, dodatni wynik hodowli z powłok lub tkanek układu oddechowego bez towarzyszących zmian może być częsty, ale nie powinien być interpretowany jako pozytywna diagnoza aspergilozy (3). Dlatego ostateczna diagnoza wymaga identyfikacji *Aspergillus* spp. w korelacji z towarzyszącymi zmianami (23).

Hodowla i izolacja czynnika grzybowego do dalszej charakterystyki uważana jest za złoty standard diagnostyki (ryc. 2). W przypadku braku patognomicznych struktur w preparatach, takich jak konidiofory, morfologia strzępek może być myląca, bowiem obraz jest zbliżony z uzyskiwanym dla innych grzybów (ryc. 3). Ponadto stwierdzenie w preparacie histopatologicznym dychotomicznie rozgałęzionych i szklistych strzępek z równoległymi ścianami nie jest wystarczające, a wręcz może prowadzić do



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy uzyskiwany z hodowli *Aspergillus fumigatus* po wybarwieniu błękitem laktofenolowym w powiększeniu 400x



Ryc. 4. Histopatologia biopłatów z płuc u hełmiatki zwyczajnej (*Netta rufina*) z ostrą aspergilozą po barwieniu hematoksyliną i eozyną (A), po barwieniu Gomoriego Grocotta (B) oraz po barwieniu kwasem nadjodowym Schiffa (C)

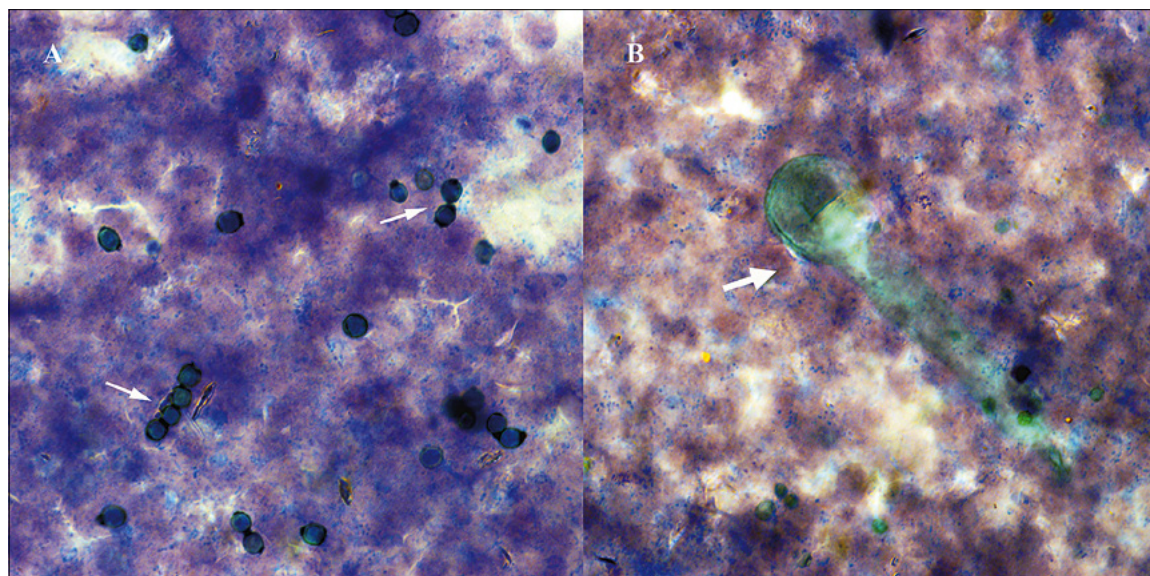
wyników fałszywie dodatnich. W takich wątpliwych przypadkach immunohistochemia z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych lub poliklonalnych jest bardziej wiarygodnym narzędziem do identyfikacji infekcji wywołanych przez *Aspergillus* spp. Metodę tę można wybrać także, gdy posiewy mykologiczne pozostają ujemne (1, 57, 58). Barwienie biopłatów z płuc wykonywane jest najczęściej hematoksyliną i eozyną, niejednokrotnie uzupełniane jest także barwieniem kwasem nadjodowym Schiffa i/lub metodą Gomoriego-Grocotta (20; ryc. 4). Cennym narzędziem wykrywania elementów grzybiczych w skrawkach tkanek jest barwienie fluorescencyjne z użyciem blankoforu (52).

Diagnostyka przeżyciowa ptasiej aspergilozy jest znacznie trudniejsza niż diagnostyka pośmiertna, ponieważ ocena cytologiczna próbek klinicznych jest niejednokrotnie niemożliwa (ryc. 5; 59). Dodatkowo, rozległe zajęcie dróg oddechowych występuje zazwyczaj, zanim pojawią się objawy kliniczne. Pomimo obecności nieswoistych objawów klinicznych aspergilozę należy podejrzewać, gdy osłabione ptaki cierpiące na zaburzenia oddychania nie reagują na leczenie antybiotykami, a dokładny wywiad może ujawnić obecność czynników środowiskowych, predyspozycji gatunkowych lub immunosupresji (59).

U ptaków immunokompetentnych w badaniu krwi można wykazać umiarkowaną lub ciężką leukocytozę

(20 000 do ponad 100 000 komórek na μ l), heterofilię z reaktywnym przesunięciem w lewo (zmiany toksyczne), monocytózę i hiperproteinemię (3). Dane kliniczne i eksperymentalne dotyczące sokołów i papug wskazują, że wzrost β -globulin, hipoalbuminemia oraz obniżony stosunek albumina:globulina (<0,5) także mogą wskazywać na aspergilozę (60, 61, 62). Desoubeaux i wsp. (63) opracowali schemat diagnostyczny, w którym analizowano pomiary 3-hydroksymaślanu, β -globuliny i α 2-globuliny. Ten schemat diagnostyczny wykazywał wysoki poziom swoistości (>90%) i wartości predykcyjnej (\geq 80%). Natomiast ocena dwóch białek ostrej fazy, tj. haptoglobiny i surowiczego amyloidu A u sokołów (62) i przepiórek japońskich (64), nie dała zadowalających wyników diagnostycznych.

Do wykrywania dwóch polisacharydowych składników ściany komórkowej grzyba zaproponowano stosowanie testów ELISA: wykrywającego galaktomannan, specyficzny dla pleśni z rodzaju *Aspergillus*, a także wykrywający β -(1-3)-glukan, specyficzny dla całej grupy grzybów (65). Badania naukowe wskazały jednak niski poziom wrażliwości i słabą korelację między oznaczeniem galaktomannanu a stanem zaawansowania choroby (60, 62, 66, 67). Test z oznaczaniem β -(1-3)-glukanu okazał się bardziej odpowiedni, chociaż wyniki były również zależne od gatunków ptaków, z wyższymi średnimi stężeniami obserwowanymi u zakażonych ptaków



Ryc. 5. Preparat bezpośredni z materiału klinicznego pobranego z dróg oddechowych od papug wybarwiony metodą May Grünwalda-Giemsy (MGG). A: strzałki wskazują na zarodniki *Aspergillus*; B: strzałka wskazuje na konidiofor charakterystyczny dla pleśni z rodzaju *Aspergillus*

morskich w porównaniu do ptaków drapieżnych lub ptaków towarzyszących (68). Metoda PCR, na ogół oparta na amplifikacji i sekwencjonowaniu cząsteczki 18S rRNA, umożliwiła wykrywanie i identyfikację *Aspergillus* spp. z dużą wiarygodnością i specyficznością, niemniej jednak pozostaje wciąż jedynie narzędziem badawczym z rzadkim zastosowaniem diagnostycznym w przypadkach terenowych (69, 70, 71). Testy serologiczne na obecność przeciwciał przeciwko *Aspergillus* zastosowano jak dotąd u papug, ptaków drapieżnych i pingwinów. Jednak wszechobecne rozprzestrzenianie się zarodników *Aspergillus* i wiele zwierząt chorujących z jednoczesną immunosupresją spowodowały uzyskiwanie wysokiego odsetka wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych, co znacznie ogranicza wartość diagnostyczną serologii w diagnostyce aspergilozy (60, 63, 72–74). W badaniu doświadczalnym na modelu ostrej aspergilozy u sokołów wędrownych (*Falco peregrinus*) Wernery i wsp. (8) scharakteryzowali przeciwciała anty-Afm1p (wysokie immunogenne galaktomannoproteina *A. fumigatus*) jako użyteczny marker do odróżnienia ptaków zakażonych od zdrowych w teście ELISA.

Radiografia jest częścią rutynowego badania klinicznego chorych ptaków. Należy zaznaczyć, że obecność objawów radiologicznych wskazuje, że ptaki są już w późnej fazie choroby. Tomografia komputerowa i rezonans magnetyczny oferują większą rozdzielczość i mogą podkreślić inwazyjny charakter choroby u ptaków. Niemniej jednak żadna z tych trzech technik obrazowania nie może jednoznacznie zdiagnozować aspergilozy (75, 76). Natomiast endoscopia umożliwia wykrycie zmian związanych z aspergilozą, takich jak pogrubienie błony worka powietrznego, białozółte, guzkowate ziarniniaki oraz barwny nalot pleśniowy na błonach. Bronchoscopia jest przydatna do wizualizacji zmian w tchawicy i ułatwia ich usunięcie (77).

Leczenie

Leczenie aspergilozy ptaków nie zawsze jest skuteczne ze względu na często zbyt późną diagnozę i zaawansowany etap choroby, brak danych farmakokinetycznych

dotyczących leków przeciwgrzybiczych dla większości gatunków ptaków, słabe przenikanie leków do tkanek docelowych, zwłaszcza do otorbionych zmian ziarniniakowych, oraz częste występowanie chorób współistniejących i/lub immunosupresji u osobników chorych (59; tab. 1). Jeśli chory ptak toleruje znieczulenie, najlepszym sposobem leczenia jest zabieg chirurgiczny polegający na oczyszczeniu chirurgicznym metodą endoskopową materiału serowaciejącego i ziarniniaków, nawet w połączeniu z wczesnym, agresywnym, ogólnoustrojowym leczeniem przeciwgrzybiczym (78, 79). Zabieg próżniowy okazał się skuteczny w usuwaniu zatorów grzybiczych w tchawicy wykrytych za pomocą tracheoskopii u papug (49). Spośród leków przeciwgrzybiczych wysoką skutecznością prezentuje itrakonazol (Fungitraxx, Floris, Vught, Holandia), zarejestrowany jako pierwszy produkt przeciwgrzybiczy dla ptaków ozdobnych w Europie. Biorąc pod uwagę szerokie spektrum działania przeciwgrzybiczego i aktywność grzybobójczą na pleśnie, worykonazol jest coraz częściej stosowany w leczeniu inwazyjnej aspergilozy u ptaków (59, 78).

Wzrost oporności na leki przeciwgrzybicze obserwowany w ostatnich latach nie powinien być lekceważony także w kontekście aspergilozy u dzikich ptaków. Doświadczalnie określono *in vitro* wrażliwość 59 szczepów ptasich *A. fumigatus* na amfoterycynę B, itrakonazol i worykonazol. Cztery izolaty wykazały nabytą oporność zarówno na itrakonazol, jak i worykonazol (80). Dalej izolaty *A. fumigatus* wyizolowane od brytyjskich pingwinów żyjących w niewoli okazały się być wrażliwe *in vitro* na terbinafinę i worykonazol, ale wszystkie były odporne na itrakonazol (81). Badania wrażliwości na leki przeciwgrzybicze w dzikiej awifaunie są rzadkością i ograniczają się do nowo zidentyfikowanych gatunków *Aspergillus* (82). Zdolność lotu pozwala ptakom pokonywać duże odległości między polami uprawnymi, które mogą być traktowane fungicydami. W konsekwencji ptaki mogą w ten sposób przenosić izolaty *Aspergillus*, wśród których są potencjalne szczepy odporne (83). Warto zaznaczyć, że wielolekooporność

Tabela 1. Leczenie przeciwgrzybicze rekomendowane w aspergilozie ptaków

Grupa ptaków	Lek	Dawkowanie	Sposób podania/ dzień
Ptaki lówne	itrakonazol	10 mg/kg m.c.	doustnie, raz bądź dwa razy
	terbinafina	15 mg/kg m.c.	doustnie, dwa razy
Papugi	amfoterycyna B	1 mg/kg m.c.	nebulizacja, dwa lub trzy razy
	itrakonazol	5–10 mg/kg m.c.	doustnie, raz bądź dwa razy
	worykonazol	12–18 mg/kg m.c.	doustnie, dwa razy
Ptaki drapieżne	itrakonazol	5–10 mg/kg m.c.	doustnie, dwa razy przez 5 dni, raz przez 60 do 90 dni
	worykonazol	10–18 mg/kg m.c.	doustnie, dwa razy przez 60 dni
	terbinafina	10–15 mg/kg m.c.	doustnie, dwa razy przez 6–8 tygodni
Ptaki morskie	itrakonazol	10–20 mg/kg m.c.	doustnie, raz
Ptactwo słodkowodne	amfoterycyna B	12,5 mg rozpuszczone w 2,5 ml sterylnej wody	nebulizacja, raz/dzień przez 7 dni
		7,5 mg/kg m.c.	dotchawiczco, trzy razy
		3,25 mg/kg m.c.	dożylnie (w płynach) przez 24 h
	itrakonazol	5–10 mg/kg m.c.	doustnie, raz przez 6–8 tygodni

grzybów z rodzaju *Aspergillus* wykazano w kontekście drobiu (84, 85).

W trakcie terapii aspergilozy u ptaków należy również zadbać o odpowiednie warunki bytowe, przede wszystkim stres związany z terapią musi zostać zminimalizowany, a jakość środowiska zmaksymalizowana (86). Trzytygodniowe leczenie profilaktyczne terbinafiną lub itraconazolem u wysoce wrażliwych gatunków ptaków drapieżnych jest zalecane u ptaków nowo schwytanych lub przyjętych do ośrodka rehabilitacji, w trakcie rui, a nawet systematycznie u młodych odchowanych sokołów (3–120 dni; 3). Protokoły profilaktyczne z itraconazolem są również powszechne u pingwinów trzymany w zoo lub uratowanych po wyciekach ropy naftowej (78). W brazylijskim ośrodku ochrony dzikich ptaków grupy pingwinów, które otrzymały profilaktycznie ten środek przeciwgrzybiczy, miały 1,8 razy mniej zwierząt z aspergilozą w porównaniu z ptakami nieleczonymi (12,2% w porównaniu z 22,9%; 87). Szczepienia przeciwko aspergilozie u ptaków są dostępne, ale ich skuteczność jest dyskusyjna (59, 88, 89).

Prewencja

Środki zapobiegania aspergilozie opierają się na dwóch głównych osiach: kontrolowaniu poziomu narażenia i minimalizowaniu stresorów. Zarządzanie ryzykiem zakażenia w środowisku naturalnym ogranicza się do pierwszej osi. Porzucanie resztek poźniwnych na ziemi i deszczowa pogoda mogą sprzyjać rozwojowi pleśni. W niesprzyjających warunkach, takich jak okresy opadów śniegu lub deszczu, wrony i ptactwo wodne mogą żywić się pozostawionym, spleśniałym ziarnem, np. kukurydzą i kiszonką (3). Możliwe rozwiązania prewencyjne obejmują zakopywanie, przykrywanie lub oranie pod resztkami poźniwnymi oraz ograniczanie dostępu do skażonych pól lub przym za pomocą dźwiękowych urządzeń odstraszających (pirotechniki) w celu przekierowania ptaków do alternatywnych obszarów żerowania (90). Ziarno używane do nęcenia awifauny, łapania w pułapkę lub programów dokarmiania uzupełniającego powinno być odpowiednio przechowywane i kontrolowane. Odłogi dla dzikich zwierząt powinny być regularnie kontrolowane mikrobiologicznie. Utrzymywanie karmników dla ptaków i budek lęgowych wolnych od spleśniałej żywności pozostaje kolejnym elementem prewencyjnym (21).

Warunki życia ptaków dzikich w niewoli pozwalają na dokładniejszą kontrolę środowiska. Aspergiloza nie jest chorobą zakaźną, zatem wielokrotne zakażenia w jednym pomieszczeniu wiążą się z częstym narażeniem, a nie z transmisją międzyosobniczą. Warto zauważyć, że kontrola zanieczyszczenia powietrza zarodnikami *Aspergillus* lub filtracja powietrza mogą znacznie ograniczyć narażenie. Narzędzia do pomiaru stężenia pleśniami *Aspergillus* w powietrzu są dostępne komercyjnie, np. Air Strategie Bioimpactor, Surface Air Systems, CIP 10-M i Aerotech N6. Poziom narażenia monitorowany przez regularne wolumetryczne pobieranie próbek powietrza wykazuje istotne wahania sezonowe, łagodzący wpływ niskich

temperatur poprzez chłodzenie wolierów oraz wysokie ryzyko ekspozycji w dużych ośrodkach rehabilitacji ptaków (12, 13, 91). Dane ilościowe są również przydatne do oceny skuteczności systemów filtracji stosowanych w konwencjonalnych systemach uzdatniania powietrza do ochrony najbardziej wrażliwych gatunków ptaków, takich jak pingwiny. Wysokowydajne filtry HEPA (High Efficiency Particulate Air), choć drogie, wymagają drobiazgowej konserwacji i łatwo ulegają zapchaniu przez zarodniki *Aspergillus*, są najlepszą opcją techniczną (13). W kalifornijskim parku zoologicznym, spośród 22 badanych narzędzi filtrujących, filtry HEPA okazały się mieć najsilniejszy wpływ (skorygowany iloraz szans = 4,33) na zmniejszenie częstości występowania grzybów z rodzaju *Aspergillus* w pomieszczeniach zamkniętych (92). Dodatkowo, pomieszczenia dla zwierząt, klatki transportowe, inkubatory i klujniki powinny być odpowiednio wentylowane, czyszczone i dezynfekowane środkami przeciwgrzybiczymi (enilkonazolem i olejkami eterycznymi) przed użyciem, aby utrzymać niskie ryzyko zakażenia (93). Nigdy nie należy wprowadzać potencjalnych źródeł zarodników, takich jak spleśniała ściółka i pasza. Wreszcie pośredni sposób oceny narażenia na *Aspergillus* spp. może polegać na wielokrotnym badaniu przesiewowym przeciwciał w surowicy ptaków lub żółtkach jaj, jak to już robiono u pingwinów, ale wymaga to dalszych badań (74).

Podsumowanie

Grzyby należące do rodzaju *Aspergillus* są zdolne do wzrostu i namnażania się w wielu środowiskach, stąd ich występowanie jest pospolite. Zarodniki tych oportunistycznych mikroorganizmów, gdy są wdychane, mogą powodować poważne i często śmiertelne infekcje u różnych gatunków dzikich ptaków żyjących na wolności i w niewoli. Diagnostyka tych zakażeń jest skomplikowana, nie ma bowiem jednego wiarygodnego i specyficznego testu. Dopiero połączenie różnych narzędzi diagnostycznych umożliwi poprawną identyfikację czynników etiologicznych. Biorąc pod uwagę niską skuteczność zabiegów terapeutycznych, konieczne jest, aby hodowcy lub lekarze zajmujący się ptakami znali warunki sprzyjające pojawieniu się aspergilozy w celu wprowadzenia odpowiednich środków zapobiegawczych. Regularne czyszczenie i dezynfekcja budek lęgowych, otwieranie baldachimów i dachów w celu zwiększenia ilości światła słonecznego docierającego do dna wolier oraz zapewnienie odpowiedniej wentylacji pomagają zmniejszyć ryzyko aspergilozy.

Piśmiennictwo

1. Carrasco L., Bautista M.J., de las Mulas J.M., Jensen H.E.: Application of enzyme-immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis, candidiasis, and zygomycosis in three lovebirds. *Avian Dis.* 1993, 37, 923–927.
2. Abrams G.A., Paul-Murphy J., Ramer J.C., Murphy C.J.: *Aspergillus blepharitis* and dermatitis in a peregrine falcon-gyr Falcon hybrid (*Falco peregrinus* × *Falco rusticolus*). *J. Avian Med. Surg.* 2001, 15, 114–120.
3. Arné P., Risco-Castillo V., Jouvion G., Barzic C. Le., Guillot J.: Aspergillosis in wild birds. *J. Fungi.* 2021, 7, 241.

4. Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Loc'h G. Le., Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A., Huang W., Chermette R., Guillot J.: *Aspergillus fumigatus* in poultry. *Zwietering MH, ed. Int. J. Microbiol.* 2011, **2011**, 746356.
5. Atasever A., Gümüşsoy K.S.: Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. *J. Vet. Med. Ser. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2004, **51**, 19–22.
6. Beernaert L.A., Pasmans F., Haesebrouck F., Martel A.: Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol.* 2008, **37**, 545–549.
7. van Waeyenberghe L., Fischer D., Coenye T., Ducatelle R., Haesebrouck F., Pasmans F., Lierz M., Martel A.: Susceptibility of adult pigeons and hybrid falcons to experimental aspergillosis. *Avian Pathol.* 2012, **41**, 563–567.
8. Wernery U., Tsang C.C., Hebel C., Damerou A., Kinne J., Cai J.P., Küspert H., Chan K.F., Joseph M., Xue S., Raghavan R., Tang J.Y.M., Syriac G., Lau S.K.P., Jose S., Woo P.C.Y.: Serodiagnosis of aspergillosis in falcons (*Falco* spp.) by an Afmp1p-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses.*
9. Chaudhary S.K., Sadana J.R.: Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) – Clinical signs and haematological changes. *Mycopathologia.* 1988, **102**, 179–184.
10. Dykstra M.J., Loomis M., Reininger K., Zombeck D., Faucette T.: A comparison of sampling methods for airborne fungal spores during AN outbreak of aspergillosis in the forest aviary of the North Carolina Zoological Park. *J. Zoo Wildl. Med.* 1997, **28**, 454–463.
11. Faucette T.G., Loomis M., Reininger K., Zombeck D., Stout H., Porter C., Dykstra M.J.: A three-year study of viable airborne fungi in the North Carolina Zoological Park R.J.R. Nabisco Rocky Coast Acid Exhibit. *J. Zoo Wildl. Med.* 1999, **30**, 44–53.
12. Rivas A.E., Dykstra M.J., Kranz K., Bronson E.: Environmental fungal loads in an indoor-outdoor African penguin (*Spheniscus demersus*) exhibit. *J. Zoo Wildl. Med.* 2018, **49**, 542–555.
13. Dykstra M.J., Reininger K.: Aviary air-handler design and its relationship to fungal spore loads in the air. *J. Zoo Wildl. Med.* 2007, **38**, 540–547.
14. Corbanie E.A., Matthijs M.G.R., Van Eck J.H.H., Remon J.P., Landman W.J.M., Vervaeck C.: Detection of differently sized airborne microspheres in the respiratory tract of chickens. *Avian Pathol.* 2006, **35**, 475–485.
15. Fedde M.R.: Relationship of Structure and Function of the Avian Respiratory System to Disease Susceptibility. *Poult Sci.* 1998, **77**, 1130–1138.
16. Reese S., Dalamani G., Kaspers B.: The avian lung-associated immune system: A review. *Vet. Res.* 2006, **37**, 311–324.
17. Souza M.J., Degernes L.A.: Mortality due to aspergillosis in wild swans in northwest Washington State, 2000–02. *J. Avian Med. Surg.* 2005, **19**, 98–106.
18. Brown R.E., Brain J.D., Wang N.: The Avian Respiratory System: A unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environ Health Perspect.* 1997, **105**, 188–200.
19. Paulussen C., Hallsworth J.E., Álvarez-Pérez S., Nierman W.C., Hamill P.G., Blain D., Rediers H., Lievens B.: Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb. Biotechnol.* 2017, **10**, 296–322.
20. Cacciuttolo E., Rossi G., Nardoni S., Legrottaglie R., Mani P.: Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. *Vet. Res. Commun.* 2009, **33**, 521–527.
21. Alley M.R., Castro I., Hunter J.E.B.: Aspergillosis in hihi (*Notiomytis cincta*) on Mokoia Island. *N Z Vet J.* 1999, **47**, 88–91.
22. Van Waeyenberghe L., Pasmans F., Dherde K., Ducatelle R., Favorel H., Li S.J., Haesebrouck F., Martel A.: Germination of *Aspergillus fumigatus* inside avian respiratory macrophages is associated with cytotoxicity. *Vet. Res.* 2012, **43**, 32.
23. Olias P., Gruber A.D., Winfried B., Hafez H.M., Lierz M.: Fungal pneumonia as a major cause of mortality in white stork (*Ciconia ciconia*) chicks. *Avian Dis.* 2010, **54**, 94–98.
24. Alvarez-Perez S., Mateos A., Dominguez L., Martinez-Navado E., Blanco J.L., Garcia M.E.: Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Vet. Microbiol.* 2010, **144**, 444–449.
25. Latif H., Gross M., Fischer D., Lierz M., Usleber E.: Immunochemical analysis of fumigaclavine mycotoxins in respiratory tissues and in blood serum of birds with confirmed aspergillosis. *Mycotoxin Res.* 2015, **31**, 177–183.
26. Richard J.L., Dvorak T.J., Ross P.F.: Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, *Fresenius. Mycopathologia.* 1996, **134**, 167–170.
27. Lawson B., Robinson R.A., Toms M.P., Risely K., Macdonald S., Cunningham A.A.: Health hazards to wild birds and risk factors associated with anthropogenic food provisioning. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2018, **373**.
28. Richard J.L., Peden W.M., Williams P.P.: Gliotoxin inhibits transformation and its cytotoxic to turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia.* 1994, **126**, 109–114.
29. Bellrose F.C., Hanson H.C.: Aspergillosis in Wood Ducks. *J. Wildl. Manage.* 1945, **9**, 325.
30. Wobeser G., Saunders J.R.: Pulmonary oxalosis in association with *Aspergillus niger* infection in a great horned owl (*Bubo virginianus*). *Avian Dis.* 1975, **19**, 388–392.
31. Rahim M.A., Bakhiet A.O., Hussein M.F.: Aspergillosis in a gyrfalcon (*Falco rusticolus*) in Saudi Arabia. *Comp. Clin. Path.* 2013, **22**, 131–135.
32. Barber A.E., Scheufen S., Walther G., Kurzai O., Schmidt V.: Low rate of azole resistance in cases of avian aspergillosis in Germany. *Med. Mycol.* 2020, **58**, 1187–1190.
33. Fatunmbi O.O., Bankole A.: Severe disseminated Aspergillosis in a captive Abyssinian tawny eagle (*Aquila rapax raptor*). *J. Wildl. Dis.* 1984, **20**, 52–54.
34. Tsai S.S., Park J.H., Hirai K.: Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathol.* 1992, **21**, 699–709.
35. Fischer D., Van Waeyenberghe L., Failing K., Martel A., Lierz M.: Single tracheal inoculation of *Aspergillus fumigatus* conidia induced aspergillosis in juvenile falcons (*Falco* spp.). *Avian Pathology.*
36. Hoppes S., Gurfield N., Flammer K., Colitz C., Fisher P.: Mycotic keratitis in a blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*). *J. Avian Med. Surg.* 2000, **14**, 185–189.
37. Gornatti Churria C.D., Sansalone P.L., Machuca M.A., Vigo G.B., Sguazza G.H., Origlia J.A., Piscopo M. V., Herrero Loyola M.A., Petrucelli M.A.: Tracheitis in a broiler chicken flock caused by dual infection with *Cryptosporidium* spp. (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) and non-hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Brazilian J. Vet. Pathol.* 2012, **5**, 89–93.
38. Nardoni S., Ceccherelli R., Rossi G., Mancianti F.: Aspergillosis in *Larus cachinnans micaellus*: Survey of eight cases. *Mycopathologia.* 2006, **161**, 317–321.
39. Hurley-Sanders J.L., Larsen R.S., Troan B., Loomis M.: Fungal osteomyelitis in two bufflehead (*Bucephala albeola*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2015, **46**, 613–616.
40. Yates V.J., Miller L.T., Jasty V., Willey C.H., Holtzinger M.: Web Necrosis in Mute Swans—a Report of an Outbreak. *Bull. Wildl. Dis. Assoc.* 1969, **5**, 33–34.
41. Greenacre C.B., Latimer K.S., Ritchie B.W.: Leg Paresis in a Black Palm Cockatoo (*Probosciger aterrimus*) Caused by Aspergillosis. *J. Zoo Wildl. Med.* 1992, **23**, 122–126. <http://www.jstor.org/stable/20460279>
42. Spanemberg A., Casagrande R.A., Ferreiro L., Rolim V.M., de Souza S.O., Gonçalves I.C.M., de Oliveira L.G.S., Wouters F., Wouters A.T.B., Fontana C.S., Driemeier D.: Aspergillosis in green-winged saltators (*Saltator similis*) participants in bird singing competitions. *Acta Sci. Vet.* 2012, **40**, 1–6.
43. Locke L.N., Young L.T.: Aspergillosis in a common loon (*Gavia immer*). *Bull. Wildl. Dis. Assoc.* 1967, **3**, 34–35.
44. Palma Leotta M., Pelegrina M., Cáceres A.: Invasive pulmonary aspergillosis in a captive bird *Cyanocitta brissonii* (*Cardinalidae*) in Mendoza, Argentina. *Rev. Vet.* 2015, **26**, 79–81.
45. Jung K., Kim Y., Lee H., Kim J.T.: *Aspergillus fumigatus* infection in two wild Eurasian black vultures (*Aegypius monachus* Linnaeus) with carbofuran insecticide poisoning: A case report. *Vet. J.* 2009, **179**, 307–312.
46. Sato Y., Itagaki T.: Fungal airsacculitis associated with multiple helminth infestations in a black-eared kite (*Milvus migrans*). *Avian Dis.* 2010, **54**, 965–968.
47. Barathidasan R., Singh S.D., Saini M., Sharma A.K., Dhama K.: The first case of angioinvasive pulmonary aspergillosis in a Himalayan Griffon Vulture (*Gyps himalayensis*). *Avian Biol. Res.* 2013, **6**, 302–306.
48. Horowitz D.B., Haebler R.: Demonstration of *Aspergillus* sp. in tissues of the common loon, *Gavia immer*: Incidence, progression, and severity. *J. Histotechnol.* 2001, **24**, 101–106.
49. Westerhof I.: Treatment of tracheal obstruction in psittacine birds using a suction technique: a retrospective study of 19 birds. *J. Avian Med. Surg.* 1995, **9**, 45–49.
50. Leitzke Cabana Á., Eric Thijl Vanstreels R., Orzechowski Xavier M., Gama Osório L. DA., Corrado Adornes A., Meirelles Leite A., Pereira Soares M., Pinho Silva-filho R. DA., Luiz Catão-dias J., Carlos Araújo Meireles M.: Contribucion breve 28 lethal concurrent avian malaria and aspergillosis in magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Boletín Chil. Ornitol.* 2014, **20**, 28–32.
51. Mihaylov G., Petrov V., Marutsov P., Simeonov R., Simeonova G.: A Case of Aspergillosis in a Bearded Vulture (*Gypaetos barbatus*). In: Vol 6; 2008:144–146.
52. Olias P., Gruber A.D., Hafez H.M., Lierz M., Slesiona S., Brock M., Jacobsen I.D.: Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment. *Vet. Microbiol.* 2011, **148**, 348–355.
53. Gulcubuk A., Erdogan-Bamac O., Metiner K., Ozturk G.Y., Ozgur Y., Haktanir D.: A case of pulmonary aspergillosis in white storks. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 2018, **69**, 1004–1009.

54. Mohsen Nouri A.T. and F.A.: Dual Infection of Respiratory Tract with an *Aspergillus* sp. and Bacilli in a Canary (*Serinus canarius*). *Res. J. Poult. Sci.* 2013, **6**, 33–37.
55. Kiser P.K., Meritet D.M., Bildfell R.J.: *Aspergillus* section nigri-associated calcium oxalate crystals in an Eurasian Eagle Owl (*Bubo bubo*). *Case Reports Vet. Med.* 2018, **2018**, 3807059.
56. Savelieff M.G., Pappalardo L., Azmanis P.: The current status of avian aspergillosis diagnoses: Veterinary practice to novel research avenues. *Vet. Clin. Pathol.* 2018, **47**, 342–362.
57. Guarner J., Brandt M.E.: Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011, **24**, 247–280.
58. Li H., Zhu R., She R., Zhang C., Shi R., Li W., Du F., Wu Q., Hu F., Zhang Y., Soomro M.H., Zheng C.: Case Report Associated with Aspergillosis and Hepatitis e Virus Coinfection in Himalayan Griffons. *Bio-med Res. Int.* 2015, **2015**, 287315.
59. Jones M.P., Orosz S.E.: The diagnosis of aspergillosis in birds. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 2000, **9**, 52–58.
60. Cray C., Watson T., Arheart K.L.: Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to aspergillus in avian species. *Avian Dis.* 2009, **53**, 491–494.
61. Kummrow M., Silvanose C., Di Somma A., Bailey T.A., Vorbrüggen S.: Serum protein electrophoresis by using high-resolution agarose gel in clinically healthy and aspergillus species-infected falcons. *J. Avian Med. Surg.* 2012, **26**, 213–220.
62. Fischer D., Van Waeyenberghe L., Cray C., Gross M., Usleber E., Pasmans F., Martel A., Lierz M.: Comparison of diagnostic tools for the detection of aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. *Avian Dis.* 2014, **58**, 587–598.
63. Desoubieux G., Rodriguez M., Bronson E., Sirpenski G., Cray C.: Application of 3-hydroxybutyrate measurement and plasma protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in African penguins (*Spheniscus demersus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2018, **49**, 696–703.
64. Goetting V., Lee K.A., Woods L., Clemons K.V., Stevens D.A., Tell L.A.: Inflammatory marker profiles in an avian experimental model of aspergillosis. *Med. Mycol.* 2013, **51**, 696–703.
65. Latgé J.P., Chamilos G.: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* 2020, **33**.
66. Cray C., Villar D.: Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. *Vet. Clin. Pathol.* 2008, **37**, 328–331.
67. Arca-Ruibal B., Wernery U., Zachariah R., Bailey T.A., Di Somma A., Silvanose C., McKinney P.: Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *Vet Rec.* 2006, **158**, 442–444.
68. Burco J.D., Ziccardi M.H., Clemons K. V., Tell L.A.: Evaluation of plasma (1→3) β-D-glucan concentrations in birds naturally and experimentally infected with aspergillus fumigatus. *Avian Dis.* 2012, **56**, 183–191.
69. Melloul E., Thierry S., Durand B., Cordonnier N., Desoubieux G., Chandenier J., Bostvironnois C., Botterel F., Chermette R., Guillot J., Arné P.: Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, **37**, 271–279.
70. Katz M.E., Mcloon M., Burrows S., Cheetham B.F.: Extreme DNA sequence variation in isolates of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 1998, **20**, 283–288.
71. Kang H.M., Jang H.J., Seo M.K., Lee J.W., Na K.J.: Psittacine beak and feather disease, budgerigar fledgling disease and aspergillosis in an African grey parrot (*Psittacus erithacus*). *J. Vet. Clin.* 2017, **34**, 310–312.
72. Sanchez C.R., Murray S.Z.: Diagnosis and successful treatment of a presumptive case of aspergillosis in a Micronesian kingfisher (*Halcyon cinnamomina cinnamomina*). *Avian Dis.* 2005, **49**, 309–312.
73. Ivey E.S.: Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. *J. Avian Med. Surg.* 2000, **14**, 103–106.
74. German A.C., Shankland G.S., Edwards J., Flach E.J.: Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. *Vet. Rec.* 2002, **150**, 513–518.
75. Vorbrüggen S., Bailey T., Krautwald-Junghanns M.E.: Radiographic findings in raptors affected with a mycosis of the respiratory tract. *Tierarzt Prax Ausgabe K. Kleintiere - Heimtiere.* 2013, **41**, 311–318.
76. Schwarz T., Kelley C., Pinkerton M.E., Hartup B.K.: Computed tomographic anatomy and characteristics of respiratory aspergillosis in juvenile whooping cranes. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 2016, **57**, 16–23.
77. Fischer D., Lierz M.: Diagnostic Procedures and Available Techniques for the Diagnosis of Aspergillosis in Birds. *J. Exot. Pet Med.* 2015, **24**, 283–295.
78. Beernaert L.A., Pasmans F., van Waeyenberghe L., Haesebrouck F., Martel A.: *Aspergillus* infections in birds: A review. *Avian Pathol.* 2010, **39**, 325–331.
79. Divers S.J.: Exotic mammal diagnostic endoscopy and endosurgery. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* 2010, **13**, 255–272.
80. Beernaert L.A., Pasmans F., Van Waeyenberghe L., Dorrestein G.M., Verstappen F., Vercammen F., Haesebrouck F., Martel A.: Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, **53**, 2199–2201.
81. Reed K., Macgregor S.K., Stidworthy M.F., Denk D., Guthrie A.: The isolation and antimicrobial sensitivity of *Aspergillus fumigatus* from frozen respiratory tissues of penguins from zoological collections in the United Kingdom, 2007–2018. *J. Zoo Wildl. Med.* 2020, **51**, 591–597.
82. Vedova R. Della., Hevia A., Vivot W., Fernández J., Córdoba S.B., Reynaldi F.J.: Aspergillosis in domestic and wild birds from Argentina. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2019, **56**, e152460.
83. Melo A.M., Silva-Filho R.P. da., Poester V.R., von Groll A., Fernandes C.G., Stevens D.A., Sabino R., Xavier M.O.: Aspergillosis in free-ranging aquatic birds. *Med. Mycol. Case Rep.* 2020, **28**, 36–38.
84. Ziółkowska G., Tokarzewski S., Nowakiewicz A.: Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. *Poult Sci.* 2014, **93**, 1106–1112.
85. Spanamberg A., Ravazzolo A.P., Denardi L.B., Hartz S.A., Santurio J.M., Driemeier D., Ferreira L.: Antifungal susceptibility profile of *Aspergillus fumigatus* isolates from avian lungs. *Pesqui Vet. Bras.* 2020, **40**, 102–106.
86. Verstappen F.A.L.M., Dorrestein G.M.: Aspergillosis in Amazon parrots after corticosteroid therapy for smoke-inhalation injury. *J. Avian Med. Surg.* 2005, **19**, 138–141.
87. Silva Filho R.P. Da., Xavier M.O., Martins A.M., Ruoppolo V., Mendoza-Sassi R.A., Adornes A.C., Cabana A.L., Meireles M.C.A.: Incidence density, proportionate mortality, and risk factors of aspergillosis in magellanic penguins in a rehabilitation center from Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* 2015, **46**, 667–674.
88. Mateos-Hernández L., Risco-Castillo V., Torres-Maravilla E., Bermúdez-Humarán L.G., Alberdi P., Hodžić A., Hernández-Jarguin A., Rakotobe S., Galon C., Devillers E., de la Fuente J., Guillot J., Cabezas-Cruz A.: Gut microbiota abrogates anti-α-gal 1ga response in lungs and protects against experimental aspergillus infection in poultry. *Vaccines.* 2020, **8**, 1–21.
89. Feldmesser M.: Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. *Med. Mycol.* 2005, **43**, 571–587.
90. Fox A.D., Elmberg J., Tombre I.M., Hessel R.: Agriculture and herbivorous waterfowl: a review of the scientific basis for improved management. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2017, **92**, 854–877.
91. Burco J.D., Massey J.G., Byrne B.A., Tell L., Clemons K. V., Ziccardi M.H.: Monitoring of fungal loads in seabird rehabilitation centers with comparisons to natural seabird environments in northern California. *J. Zoo Wildl. Med.* 2014, **45**, 29–40.
92. Martony M., Nollens H., Tucker M., Henry L., Schmitt T., Hernandez J.: Prevalence of and environmental factors associated with aerosolised *Aspergillus* spores at a zoological park. *Vet. Rec. open.* 2019, **6**, e000281.
93. Ebani V.V., Najar B., Bertelloni F., Pistelli L., Mancianti F., Nardoni S.: Chemical composition and in vitro antimicrobial efficacy of sixteen essential oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* isolated from poultry. *Vet. Sci.* 2018, **5**, doi: 10.3390/vetsci5030062.

Dr hab. Sebastian Gnat prof. uczelni,
e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl