

CLASSIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO *BUMBLEFOOT* EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*) E TESTE DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DOS ISOLADOS FRENTE A ANTIMICROBIANOS

ANNA LUIZA SILVA¹, LUIZA DA GAMA OSÓRIO², SÍLVIA REGINA LEAL LADEIRA³; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO²; EMANOELE FIGUEIREDO SERRA³; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁴

¹UFPel/bolsista CNPq – annavet@live.com; ²UFRGS; ³UFPel; ⁴UFPel – meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Uma das doenças de maior morbidade e com fatores limitantes à recuperação de pinguins em centros de reabilitação é o *bumblefoot* (FOWLER; CUBAS, 2001). Essa enfermidade também conhecida como pododermatite é caracterizada por um processo inflamatório podal (RAMIS, 2006; BERK, 2007;). Por promover porta de entrada para contaminação secundária por micro-organismos, podendo cursar com septicemia e óbito, a afecção é de extrema importância na reabilitação de pinguins à vida marinha. (COOPER, 2002).

A síndrome é classificada em três graus (I, II e III), sendo o primeiro o de melhor prognóstico e o último de pior (COOPER, 2002). Quanto mais avançado o grau, mais difícil de obter bons resultados no tratamento (CUBAS; GODOY, 2004). Isso se deve notadamente pela presença de bactérias na lesão, sendo mais frequentemente associadas as do gênero *Staphylococcus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* e *Proteus* sp. (COOPER, 2002). Porém existem poucos estudos com o intuito de identificar os micro-organismos relacionados com o *bumblefoot* (OSÓRIO, 2010; TEIXEIRA, 2008).

Os pinguins com grau II e III de pododermatite, quando há infecção secundária, devem ser tratados com antibioticoterapia, preferencialmente depois de um teste de sensibilidade *in vitro* frente a antimicrobianos (OSÓRIO, 2010; COOPER, 2002). Preconiza-se a realização do teste, pois há relatos de resistências bacterianas aos antimicrobianos em muitas aves silvestres, sem tratamentos anteriores (SANTOS, 2008).

Devido à escassez de estudos com a identificação de micro-organismos associados à enfermidade e a importância em se fazer teste para avaliar qual o princípio ativo com melhor resposta, o objetivo desse estudo foi classificar as bactérias relacionadas ao *bumblefoot* em Pinguins-de-Magalhães (*Spheñiscus magellanicus*) e realizar teste *in vitro* dos isolados frente a antibióticos de uso rotineiro na clínica veterinária.

2. METODOLOGIA

Para o estudo da microbiologia podal, analisou-se 128 Pinguins-de-Magalhães, que estavam em recuperação no Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM)/FURG. Sendo 100 animais *in vivo* e 28 *post morten*.

Nos animais *in vivo* coletou-se material dos coxins direito e esquerdo com e sem pododermatite, através de fricção de swab estéril após limpeza com gaze estéril. Os swabs foram encaminhados para processamento no Setor de Bacteriologia do Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (FaVet – UFPel). E nos pinguins que foram a óbito

coletou-se um fragmento de ambos os coxins plantares e também se conduziu as amostras ao Setor de Bacteriologia da FaVet – UFPel para o processamento.

No Laboratório as amostras foram processadas em duplicata nas placas de petri contendo ágar sangue 5% de sangue ovino e ágar MacConkey e se utilizou a técnica de esgotamento. Após as placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas.

Realizou-se exame direto em todas as colônias por meio da coloração de Gram, onde os micro-organismos foram qualificados. Para classificação da espécie, as colônias foram submetidas a provas bioquímicas e a capacidade de hemólise, produção de catalase e coagulase.

As bactérias isoladas foram submetidas a teste de sensibilidade *in vitro* frente aos anticrobianos enrofloxacina, estreptomicina, cefalosporina e penicilina, pela técnica de difusão em ágar. Para realização dos testes foram preparados inóculos bacterianos em solução salina estéril a partir de uma alçada da colônia, ajustados na escala 1 de McFarland ($3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL). Os inóculos foram semeados em toda superfície de uma placa de Petri contendo meio de cultivo Muller Hinton, e depois de decorrido 5 minutos se distribuiu os discos de papel impregnados com antibiótico em alta concentração, correspondendo a 10UI de penicilina, 30µg de cefalotina, 5µg de enrofloxacina, 10µg de estreptomicina.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, e a leitura dos resultados foi realizada através da medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, confrontado com uma tabela pré-estabelecida de valores de eficácia da droga frente a determinados micro-organismos, gerando resultado de resistência, sensibilidade ou resistência intermediária.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das patas sem infecção houve crescimento bacteriano em 84 amostras (83,17%) obtendo-se 101 isolados. Tendo 17 diferentes crescimentos em associação, sendo eles de poliflora; interação de *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.; *Staphylococcus* sp.; *Staphylococcus* sp. associado a *Kurthia* sp.; *Staphylococcus* spp. e poliflora; um com *Staphylococcus* sp. associado à *E. coli* e um com *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp.

Observou-se crescimento bacteriano com mais padrões de interações entre espécies nos coxins plantares sem infecção do que nas lesões infectadas. Tal fato é explicado quando considera-se que nas aves sem contaminação, todos os micro-organismos isolados encontram-se em equilíbrio e nas infecções há o predomínio do agente causador da infecção (MULLER & KIRK, 1996).

Dos membros com infecção isolou-se bactérias em 86 amostras (88,89%). Tendo crescimento associado de poliflora, interação de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. e crescimento de diferentes cepas do gênero *Staphylococcus*.

O *Proteus* spp. foi isolado somente de animais com lesões plantares infeccionadas. Estes dados vão de acordo com o descrito por Cantón e Moreno (2006) que relatam a bactéria como incomum em indivíduos hígidos.

Das coletas *post mortem* isolou-se das lesões podais *Staphylococcus* spp.; *E. coli*; bastonete gram negativo não identificado, poliflora, *Corynebacterium* spp.; *Streptococcus* spp., e cocobacilo gram negativo não identificado. Placas sem crescimento bacteriano representaram 11,36% do número total de amostras. Bactérias do gênero *Streptococcus* não foram isoladas em colheitas realizadas *in vivo*. Este gênero é composto por micro-organismos naturalmente patogênicos, não

sendo encontrado em animais saudáveis (TORTORA, 2000), exatamente como relatado no presente estudo.

Os antibiogramas de todas as bactérias isoladas tanto de lesões *in vivo* quanto *post mortem* resultaram em maior sensibilidade das cepas frente ao antibiótico cefalosporina. Os valores estão descritos em Tab.1.

Tabela 1. – Susceptibilidade dos microorganismos isolados de coxins plantares de pinguins-de-magalhães à cefalosporina, enrofloxacina, estreptomicina e penicilina.

Microrganismo	Cefalosporina (%)			Enrofloxacina (%)			Estreptomicina (%)			Penicilina (%)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Gênero <i>Staphylococcus</i>	100	0	0	93,2	0	6,8	54,1	6,6	39,3	34,7	0	65,3
▪ <i>Staphylococcus</i> hemolítico	100	0	0	33	0	67	0	100	0	0	0	100
▪ <i>Staphylococcus</i> não hemolítico	100	0	0	100	0	0	50	0	50	50	0	50
▪ <i>Staphylococcus</i> coagulase positive	100	0	0	100	0	0	50	0	50	50	0	50
▪ <i>Staphylococcus</i> coagulase negative	100	0	0	100	0	0	88,9	0	11,1	30,8	0	69,2
▪ <i>S. intermedius</i>	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100
▪ <i>S. aureus</i>	100	0	0	50	0	50	0	50	50	0	0	100
▪ <i>Staphylococcus</i> sp.	100	0	0	97,9	0	2,1	43,7	0	56,3	38	0	62
<i>Corynebacterium</i> sp.	92,9	0	7,1	61,5	23,1	15,4	66,7	13,3	20	50	0	50
<i>Kurthia</i> sp.	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100
<i>Alcaligenes</i> sp.	100	0	0	0	100	0	0	0	100	100	0	0
<i>E. coli</i>	0	33,3	66,7	100	0	0	33,3	0	66,7	0	0	100
TOTAL	95,3	1,2	3,5	88,2	4,3	7,5	55,5	6,2	38,3	36,7	0	63,3

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

A cefalosporina foi a droga que obteve maior atividade frente à maioria das cepas. Esse antibiótico também é indicado no tratamento de colibaciloses, porém no presente estudo, o percentual de sensibilidade das cepas de *E. coli* foi nulo, o que discorda de estudos anteriores (MOREIRA; SILVA; MESQUITA, 2010). Sendo que essa resistência pode estar relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos em Medicina Veterinária. (BACCARO et al., 2002).

A enrofloxacina foi o segundo fármaco com melhor resposta, seguida da estreptomicina. E o antimicrobiano cujas cepas apresentaram maior percentual de resistência foi a penicilina, o que vai de acordo com estudos anteriores com bactérias do gênero *Staphylococcus* (MOREIRA; SILVA; MESQUITA, 1997) e *E. coli* (BACCARO, 2002), que também demonstraram alta resistência de diferentes agentes frente a esta droga.

4. CONCLUSÕES

Nas condições descritas no presente estudo pode-se descrever quais as bactérias que estavam associadas ao *bumblefoot* de Pinguins-de-Magalhães. E que a cefalosporina foi o antibiótico que obteve melhor atividade sobre as cepas avaliadas, seguida de enrofloxaxina e estreptomicina. Por outro lado, a penicilina foi o fármaco menos eficaz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACCARO, M.; MORENO, A. M.; CORRÊA, FERREIRA, A. J.; P.; CALDERARO, F.; **Resistência antimicroiana de amostras de Escherichia coli isoladas de fezes**

de leitões com diarréia. Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, v. 69, p. 15-18, abr/jun, 2002

BERK, J. **Can alternative kinds of litter reduce foot pad lesions in female turkeys** In: **Proceedings** of the 4th International Symposium on Turkey production, 21-23 junho 2007, Berlin, Germany, 2007.

CANTÓN, R.; MORENO, M. P. S.; *Proteus penneri*. **Microbiologia clínica**, p. 1-11, 2006. Disponível em: www.seimc.org . Acesso em 20/09/2013.

COOPER, John E. **Birds of Prey: Health and disease**. Ed. Blackwell, 2002. 345p.

CUBAS, Z. S.; GODOY, S. N.; **Algumas doenças de aves ornamentais**, 2004. Disponível em: <http://canarilalmada.com/download/download/Dossierdedoencas.pdf> . Acesso em 15/09/2013.

FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S.; *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*, 1 ed. USA: 2001.

MOREIRA, P. C.; SILVA, L. A. F. S.; MESQUITA, A. J.; **Resistência de *Staphylococcus* sp. isolados do leite de vacas com mastite clínica na bacia leiteira de Goiânia**. Pesquisa Agropecuária Tropical, vol. 27, nº 2, 1997.

MULLER & KIRK. Dermatologia de pequenos animais / Danny W. Scott, William H. Miller, Craig E. Griffin. Ed. Interlivros, 1996. 1142p

OSÓRIO, L. da G.; **Estudo Do Bumblefoot (Pododermatite) Em Pinguins-De-Magalhães (*Spheniscus Magellanicus*) Em Centro De Recuperação**. 2010. Dissertação (Mestrado em Veterinária Preventiva) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

RAMIS, Antonio J. **Patologia cutânea em aves**. Departament de Patologia Faculdade de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona. p. 1 – 9, 2006

SANTOS, Helton Fernandes. Anticorpos contra vírus de aves em galinhas de terreiro e cracídeos. **Identificação e susceptibilidade a antimicrobianos da microbiota de cracídeos cativeiros no RS, Brasil. 2008**. 55f. Dissertação (mestrado em medicina veterinária preventiva) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

TEIXEIRA, Vinícius de Queiroz. **Anatomopatologia e bacteriologia da pododermatite em frangos de corte sob inspeção sanitária**. 2008. 51f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnólogo de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. Ed. Artmed, 2000. 827p.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FAPERGS, CAPES, CRAM e MicVet.