

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 (*Spheniscus 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 mortem*.

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 antibióticos 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, enrofloxacin, estreptomicina e penicilina.

Microorganismo	Cefalosporina (%)			Enrofloxacin (%)			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 enrofloxacin 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 enrofloxacin 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. F.; **Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes**

de leitões com diarreia. 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/Dossierdedoenças.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 cativos 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 Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

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

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