

Identificação da microbiota da orofaringe e cloaca em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre do Pantanal-MS

MÁRCIA REGINA LOIKO¹
FERNANDA DE SOUZA ABILHEIRA²
NEIVA ROBALDO GUEDES³
DANIEL THOMPSEN PASSOS⁴
TANIA DE AZEVEDO WEIMER⁵
SÉRGIO JOSÉ DE OLIVEIRA⁶
MARIÂNGELA DA COSTA ALLGAYER⁷

RESUMO

*Estudos relacionados com sanidade estão sendo realizados para a conservação da arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) em vida livre. Amostras de cloaca e orofaringe de 14 filhotes foram analisadas através de métodos microbiológicos padronizados. Bactérias Gram negativas e leveduras estão presentes na microbiota dos filhotes sadios desta espécie, sendo os microrganismos *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* e leveduras presentes na cloaca e orofaringe, enquanto *Proteus sp.* ocorreu apenas em orofaringe e *Salmonella sp.* em cloaca.*

Palavras-chave: arara-azul-grande, *Anodorhynchus hyacinthinus*, microbiota, cloaca, orofaringe.

¹Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Aluna de Iniciação Científica voluntária PROICT/ULBRA

²Aluna da Residência Médico Veterinária/ULBRA

³Professora do Curso de Biologia/UNIDERP, Presidente do Instituto Arara Azul

⁴Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁵Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA, do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁶Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

⁷Professora - Orientadora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA e Doutoranda em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (angelallgayer@uol.com.br)

ABSTRACT

Investigations about the health status of wildlife Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) have being performed in order to contribute to conservation program of this species. Cloaca and oropharynx samples were obtained from 14 nestlings and analyzed with standard microbiological methods. Gram negative bacteria and yeasts occurred in normal nestling of this species, the isolated microorganisms being *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, and yeasts from cloaca and oropharynx, while *Proteus sp.* occurred only in oropharynx and *Salmonella sp.* only in cloaca.

Keywords: *Hyacinth Macaw, Anodorhynchus hyacinthinus, microbiota, cloaca, oropharynx.*

INTRODUÇÃO

Uma das questões mais relevantes no contexto atual é a conservação do meio ambiente, em especial a biodiversidade e o patrimônio natural. Uma das ferramentas crescentes em importância para a conservação desta biodiversidade é a “Medicina da Conservação”, em outras palavras, o trabalho médico-veterinário aplicado aos conceitos e necessidades conservacionistas. Neste contexto, o estudo das enfermidades infecciosas afetando animais selvagens ganha especial destaque, devido às doenças exercerem importante e crescente impacto sobre as populações nativas e mantidas em cativeiro.

A determinação da prevalência e da distribuição de patógenos, especialmente os transmissíveis nas populações selvagens é tarefa urgente e prioritária (OTTO, 1998). Ballou et al. (2000) ressaltaram que a qualificação e quantificação do risco da ocorrência de uma determinada enfermidade, e conseqüentemente de seu impacto sobre a biodiversidade, estão subordinadas ao conhecimento das informações epidemiológicas dos agentes mórbidos e de suas relações com os hospedeiros potenciais.

Segundo Catão-Dias (2003) no Brasil, em virtude de sua magnífica biodiversidade e do estado delicado em que muitas espécies animais se encontram, é urgente o desenvolvimento de pesquisas, além do apoio às já existentes, que investiguem a ocorrência natural de patógenos e suas correspondentes enfermidades. Atualmente, com a constante ação antrópica sobre o meio ambiente e a conseqüente degradação da natureza, a compreensão dos processos naturais das doenças nos animais, suas dinâmicas e impactos nas populações selvagens, é uma ferramenta valiosa em prol da conservação de nossa riquíssima biodiversidade.

No Brasil, cerca de 20 % dos psitacídeos encontram-se na lista dos animais ameaçados de extinção. A arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) é o maior exemplar da família Psittacidae (SICK, 1997) e encontra-se nesta lista, mas sua situação começou a mudar com as atividades do Projeto Arara Azul no Pantanal-MS. Vários estudos foram e estão sendo realizados com esta arara e uma série de conhecimentos sendo adquiridos sobre a espécie em vida livre. Dentro destes estudos vale a pena ressaltar a necessidade de aquisição de dados relacionados à sanidade desta espécie, pois durante os 17 anos

do projeto poucas pesquisas foram direcionadas ao monitoramento sanitário. Dentre elas podemos citar os relatos associados à infestação por larvas de *Philornis* sp. (GUEDES et al., 2000), pesquisa de endoparasitos (ARAÚJO et al., 2000; ALLGAYER et al., 2004a), detecção de *Salmonella* Bredney em vísceras (VILELA et al., 2001), epidemiologia da *Chlamydophila psittaci* (RASO et al., 2006) e pesquisa de hemoparasitos (ALLGAYER et al., 2004b).

Dados microbiológicos de populações naturais ainda são escassos na literatura científica, mas podem vir a contribuir para a conservação *in situ* e *ex situ* das espécies ameaçadas de extinção uma vez que permitirá o monitoramento da saúde dos animais e ajustes no manejo em cativeiro ou em ambiente natural alterado. Os neonatos de aves, teoricamente, deverão ser estéreis no momento da eclosão, sendo colonizados a partir das bactérias presentes na alimentação e no seu ambiente (CLUBB, 1997; RUPLEY, 1999). Dessa forma, as culturas bacterianas e fúngicas são de extrema importância, pois propiciam o monitoramento do filhote e do ambiente. A determinação e avaliação da microbiota gastrintestinal e do trato respiratório superior dos filhotes saudáveis e a detecção de infecções podem ser realizadas através de colorações de Gram e culturas de cloaca e orofaringe (FLAMMER & CLUBB, 1994; OGLESBEE & BISHOP, 1998).

Dentro desse contexto ecológico de saúde, este trabalho realizou o monitoramento sanitário dos filhotes de vida livre da arara-azul-grande do Pantanal (*Anodorhynchus hyacinthinus*), através da determinação da microbiota associada à orofaringe e cloaca, visando à conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 14 filhotes de arara-azul-grande do Pantanal (*Anodorhynchus hyacinthinus*), nascidos durante a estação reprodutiva 2006 no Pantanal de Miranda - Mato Grosso do Sul. As coletas foram realizadas no momento em que os filhotes foram retirados do ninho, para os procedimentos de biometria e identificação, realizados rotineiramente pelo Projeto Arara Azul. Foram coletados 1 "swab" de cloaca e 1 "swab" de orofaringe de cada ninho, estas amostras foram mantidas em meios de transporte *Stuart*^{MR}, sob refrigeração e enviados ao Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da ULBRA-RS.

Os "swabs" foram semeados em placas de Ágar sangue e Ágar Mac Conkey, incubadas em aerobiose por 24hs a 37°C e em placas com meio Dermasel incubadas a 25°C em aerobiose por 4 dias segundo a técnica citada por Hirsch & Zee (2003) e Barrow & Felthan (1993). Placas do material inoculado em Ágar sangue foram incubadas em anaerobiose por 48hs a 37°C, visando à identificação de bactérias anaeróbias (OLIVEIRA, 2000).

As colônias bacterianas foram classificadas pelo crescimento nos meios sólidos, ocorrência de hemólise, coloração por Gram, testes bioquímicos de Indol, vermelho metila (VM), Voges Proskauer (VP), utilização de citrato, utilização de uréia, formação de H₂S, utilização de glicose, prova de catalase e prova de oxidase (OLIVEIRA, 2000). Algumas bactérias isoladas foram enviadas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para certificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através das culturas das 14 amostras coletadas da cloaca e orofaringe dos filhotes estão apresentados na Tabela 1. Pode-se verificar que, em geral, os microrganismos foram mais freqüentes em orofaringe que em cloaca, sendo os mais comuns, *E. coli* (86% na orofaringe e 43% na cloaca), *Enterobacter* sp. (64% em orofaringe, 21% em cloaca) e levedura (93% em cloaca e 86 % em orofaringe).

A microbiota aeróbica cloacal nos filhotes saudáveis de psitacídeos mantidos em cativeiro está constituída quase que exclusivamente por bactérias Gram positivas dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* não-hemolítico, *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. (CLUBB, 1997; FLAMMER & CLUBB, 1994; RUPLEY, 1999), *Streptomyces* spp. (OGLESBEE &

BISHOP, 1998), *Corynebacterium* spp. e *Gaffkya* spp. (FLAMMER & DREWES, 1988; HOEFER, 1997). Nesta pesquisa foram isoladas um maior percentual de bactérias Gram negativas em filhotes de vida livre da arara-azul-grande do Pantanal clinicamente sadias. Este resultado está de acordo com Clubb (1997) e Oglesbee & Bishop (1998) que relataram que as bactérias *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. podem estar presentes na microbiota de filhotes clinicamente sadios, e seu isolamento não requer necessariamente tratamento. No entanto vale ressaltar que as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., e leveduras em brotamento são consideradas patógenos primários ou potencialmente oportunistas (CLUBB, 1997; FLAMMER & CLUBB, 1994; OGLESBEE & BISHOP, 1998). As leveduras e fungos fazem parte da microbiota natural das aves, sendo consideradas comensais no trato gastrintestinal e na pele (GODOY, 2006).

Tabela 1 - Bactérias isoladas da cloaca e orofaringe de 14 filhotes de vida livre de arara-azul-grande do Pantanal-MS na estação reprodutiva de 2006.

Bactérias isoladas	Cloaca		Orofaringe	
	Nº filhotes	%	Nº filhotes	%
<i>Staphylococcus</i> sp.	01	07	04	29
<i>Salmonella braenderup</i>	01	07	-	-
<i>Escherichia coli</i>	06	43	12	86
<i>Enterococcus</i> sp.	06	43	03	21
<i>Klebsiella</i> sp. ¹	07	50	03	21
<i>Enterobacter</i> sp. ²	03	21	09	64
<i>Pseudomonas</i> sp.	01	07	04	29
<i>Proteus</i> sp.	-	-	03	21
Leveduras	13	93	12	86

¹ *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*; ² *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*

Na avaliação da microbiota cloacal normal de 19 filhotes de vida livre de papagaios-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) Serafini et al. (2005) isolaram *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Proteus vulgaris*, *Enterobacter* spp., *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia* spp., *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Staphylococcus* spp., *Streptomyces* spp. e *Candida* spp. Os resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, evidenciando a presença de bactérias Gram negativas além das Gram positivas.

As bactérias detectadas na orofaringe dos filhotes não diferiram das bactérias isoladas da cloaca com exceção da presença de *Proteus* sp. e ausência de *Salmonella* sp. Esta constatação se deve ao fato do ambiente do ninho estar contaminado com fezes e dessa forma promover a ocorrência de contaminação da orofaringe por estas enterobactérias.

Pesquisas realizadas em vida livre têm demonstrado que a presença de bactérias Gram negativas parece ser normal na microbiota de aves saudáveis. Estes achados discordam dos autores Flammer & Drewes (1988) e Hoefler (1997) que consideraram a colonização do trato gastrointestinal com bactérias Gram negativas como um sinal de doença e recomendam a terapia com drogas antimicrobianas. No entanto, Clubb (1997) ressalta que a decisão da necessidade de instituir uma terapia deve ser realizada através de uma análise criteriosa entre avaliação clínica, outros testes diagnósticos, parâmetros ambientais e experiência clínica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os filhotes avaliados neste estudo tiveram seus parâmetros de desenvolvimento dentro do

normal e abandonaram o ninho na idade esperada (100-110 dias) não ocorrendo morbidade e mortalidade de nenhuma arara até esta data. Estes resultados evidenciam que a presença de bactérias Gram negativas é normal na microbiota de filhotes de vida livre de arara-azul-grande do Pantanal.

O estudo da ecologia desta espécie associada às pesquisas direcionadas ao monitoramento sanitário é vital para sua conservação, pois possibilita um conhecimento do estado sanitário da população de vida livre da arara-azul-grande do Pantanal. Permitindo verificar quais microrganismos estão naturalmente presentes na sua microbiota e estabelecer seu potencial patogênico que possa vir a afetar a saúde de indivíduos e populações mediante alterações ambientais.

REFERÊNCIAS

ALLGAYER, M.C. et al. Parasitológico de fezes em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 28., 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2004.

ALLGAYER, M.C. et al. Pesquisa de hemoparasitos em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 28., 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2004.

ARAÚJO, C.P. et al. Pesquisa de parasitos

em fezes de filhotes de arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). In: ENCONTRO DE BIÓLOGOS DO CRB-1 (SP, MT, MS), 11., 2000, São Pedro-SP. **Anais...** São Paulo: CRB-1 (SP, MT, MS), 2000.

BALLOU, J.D. Infectious disease risk assessment in captive propagation, reintroduction and wildlife conservation. **Proceedings of the 7th World Conference on Breeding Endangered Species**, p.63-76, 1999.

BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. **Manual for the identification of Medical Bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p.90-137.

CATÃO-DIAS, J.L. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p. 32-34, 2003.

CLUBB, S.L. Psittacine pediatric husbandry and medicine. In: ALTMAN, R.B. et al. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997.

FLAMMER, K.; CLUBB, S.L. Neonatology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian medicine: principles and application**. Florida: Wingers Publishing, Inc, 1994.

FLAMMER, K.; DREWES, L.A. Species-related differences in the incidence of Gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. **Avian Diseases**, v.32, p.79-83, 1988.

GUEDES, N.M.R. et al. Filhotes de arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) com infestação por larvas de *Philornis* no Pantanal Sul, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNI-

TOLOGIA, 9., 2001, Curitiba. **Ornitologia Brasileira do Século XX**. Curitiba: Museu de História Natural, p.331-332, 2001.

GODOY, S.N. Doenças bacterianas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

HIRSCH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003.

HOEFER, H.L. Disease of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R.B. et al. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997.

OGLESBEE, B.L.; BISHOP, C.L. Doenças infecciosas aviárias. In: BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998.

OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária – Guia Bacteriológico prático**. 2.ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2000.

OTTO, A.A. Psittacosis outbreak in Costa Rica associated with pet birds imported from the United States. **Proceedings of the Joint Meeting of the American Association of Zoo Veterinarians and American Association of Wildlife Veterinarians**, 1998. p.258-260.

RASO, T.F. et al. *Chlamydophila psittaci* in free-living blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p.235-241, 2006.

RUPLEY, A.E. **Manual de Clínica Aviária**. São Paulo: Roca, 1999.

SERAFINI, P.P. et al. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL19., 2005, Camboriú. **Anais...** Camboriú: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2005.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

VILELA, V.O. et al. Salmonella Bredney em Arara-Azul *Anodorhynchus hyacinthinus*, In: ORNITOLOGIA sem Fronteiras. Curitiba: Ed. Straub, 2001.