

## ISOLAMENTO E SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE RÉPTEIS MANTIDOS EM CATIVEIRO EM PETROLINA-PE

GERMINO, G.F.S.<sup>1</sup>; FRANCO, I.<sup>2</sup>; PEIXOTO, R.M.<sup>3</sup>; SEABRA, A. G. L.<sup>3</sup>; GAMOSA, E.A.<sup>4</sup>; DUTRA, V.<sup>5</sup>; KREWER, C.C.<sup>6</sup>; COSTA, M.M.<sup>6</sup>

### Resumo

A família *Enterobacteriaceae*, compreende várias espécies bacterianas com formato de bastonetes gram-negativos, não formadoras de esporos, móveis, capazes de fermentar e oxidar a glicose. O objetivo desse trabalho foi identificar microrganismos presentes na cavidade bucal e cloaca de répteis, bem como avaliar sensibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos. Foram utilizados 12 animais criados em cativeiro, dos quais, sete eram serpentes (duas da espécie *Boa constrictor*, duas *Corallus hortulanus*, duas *Pseudoboa clelia* e uma *Philodryas olfersii*), um jacaré (*Caiman latirostris*) e quatro jabutis (*Geochelone carbonaria*). As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Foram isoladas 17 cepas bacterianas das quais sete foram identificadas como *Klebsiella* spp. (41,18%), seis *Salmonella* spp. (35,29%), duas *Serratia* spp. (11,76%), uma *Escherichia coli* (5,88%), uma *Providencia* spp. (5,88%). Os resultados para pesquisa de *Salmonella* spp. foram confirmados pela PCR. Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina e amicacina. Por outro lado, observou-se elevada resistência a lincomicina, penicilina, rifamicina e a ampicilina. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem a participação dos répteis na cadeia epidemiológica, como reservatórios de alguns patógenos importantes, a exemplo da *Salmonella* spp., tornando importante a adoção de medidas preventivas em cativeiros e domicílios.

**Palavras-chave:** bactérias, répteis, antimicrobianos, cativeiro.

---

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), CEP 56300-990, Petrolina-PE, Brasil  
e-mail: gerald.germينو@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Mestranda em Ciência Animal nos Trópicos na Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador-BA, Brasil

<sup>3</sup>Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), CEP 56300-990, Petrolina-PE, Brasil

<sup>4</sup>Bolsista FACEPE – Embrapa Semi-Árido

<sup>5</sup>Professor Adjunto - UFMT – Campo Grande, Brasil

<sup>6</sup>Professores - UNIVASF – Rodovia BR 407, Km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº, C1. CEP 56300-990, Petrolina – PE, Brasil.

## ISOLATION AND SENSITIVITY OF CAPTIVITY REPTILES ISOLATED TO ANTIMICROBIAL DRUGS IN PETROLINA – PE

GERMINO, G.F.S.<sup>1</sup>; FRANCO, I.<sup>2</sup>; PEIXOTO, R.M.<sup>3</sup>; SEABRA, A. G. L.<sup>3</sup>; GAMOSA, E.A.<sup>4</sup>; DUTRA, V.<sup>5</sup>; KREWER, C.C.<sup>6</sup>; COSTA, M.M.<sup>6</sup>

### Abstract

The *Enterobacteriaceae* family comprises several bacterial gram-negative bacilli shaped species, mobile, able to glycolysis utilization. The objective is to identify living microorganisms in reptile oral cavity and sewer, and evaluate the isolated sensitivity to antimicrobial drugs. Seven of the twelve animals utilized were snakes (two *Boa constrictor*, two *Corallus hortulanus*, two *Pseudoboa clelia* and one *Philodryas olfersii*) one alligator (*Caiman latirostris*) and four tortoises (*Geochelone carbonaria*). The samples were processed in the Lab of Microbiologia e Imunologia Animal of Universidade Federal do Vale do São Francisco. Seven of the seventeen bacterial strains isolated were identified as *Klebsiella* spp. (41,18%), six *Salmonella* spp. (35,29%), two *Serratia* spp. (11,76%), one *Escherichia coli* (5,88%), and one *Providencia* spp. (5,88%). All isolates were sensitive to ciprofloxacin and ampicillin, but was observed elevated resistance to lincosamin, penicillin, rifampicin and ampicillin. The results to *Salmonella* spp. were confirmed with PCR and suggest that reptiles are included in the epidemiological chain as reservoirs of some important pathogens, for example *Salmonella* spp., showing that it is important to adopt preventive measures.

**Keywords:** bacterial, reptiles, antimicrobial drugs, captivity.

### INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae*, compreende várias bactérias com formato de bastonetes gram-negativos, não formadoras de esporos, móveis, que fermentam e oxidam a glicose. São microrganismos capazes de converter nitrato em nitrito e produzir catalase, mas não oxidase. Possuem crescimento ótimo em pH entre 6,6 e 8,2 e temperatura próxima dos 37°C, com mínima de aproximadamente 5,5 °C e máxima de 45°C (KRIEG e HOLT, 1984). As bactérias pertencentes a este grupo possuem uma grande heterogeneidade em relação a sua ecologia, seus hospedeiros e seu potencial patogênico. São amplamente distribuídas mundialmente, podendo ser encontradas no trato intestinal de animais e humanos, contaminando a vegetação, o solo e a água (QUINN et al., 1994).

Diversos microrganismos têm sido encontrados, causando enfermidades em répteis. A microbiota de serpentes tem sido estudada por diversos autores para detectar as causas dos processos infecciosos que acometem esses animais quando mantidos em cativeiro (GARCIA e LAURE, 1986). Muitos estudos têm demonstrado que os répteis representam um dos principais reservatórios naturais da *Salmonella* spp., sendo este um dos agentes infecciosos relacionado a doenças em animais mantidos em cativeiro (JOHNSON-DELANEY, 1996; VAN DER WALT, 1997). Embora a ocorrência da salmonelose humana esteja, em sua maioria, associada a casos de ingestão de alimentos contaminados (carnes, ovos e leite), a transmissão pelo contato direto ou indireto com répteis também é evidenciada (JAY, 2000; KONEMAN et al., 2001).

Em virtude do potencial zoonótico de alguns microrganismos da microbiota dos répteis, bem como devido aos poucos estudos conduzidos nessa área, o presente trabalho teve por objetivo identificar bactérias presentes na cavidade bucal e cloaca desses animais, bem como avaliar a sensibilidade dos isolados frente os antimicrobianos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local e animais experimentais

Este trabalho foi desenvolvido nos meses de fevereiro a julho de 2008, com répteis doados do IMAC (Instituto Imaculada Conceição) em Juazeiro-BA para o Campus da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), localizada em Petrolina-PE. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da referida Universidade. Foram utilizados 12 animais criados em cativeiro, dos quais, sete eram serpentes (duas da espécie *Boa constrictor*, duas *Corallus hortulanus*, duas *Pseudoboa clelia* e uma *Philodryas dfersii*), um jacaré (*Caiman latirostris*) e quatro jabutis (*Geochelone carbonaria*).

### Coleta das amostras

Para obtenção das amostras foram utilizados *swabs* estéreis de tamanho padrão, que foram introduzidos individualmente no interior da cloaca e cavidade bucal das serpentes e do jacaré, e cavidade bucal dos jabutis. Após este procedimento, todos os *swabs* foram acondicionados em tubos com meio de transporte Stuart modificado, os quais foram colocados em condições isotérmicas à aproximadamente 4°C até o processamento laboratorial.

### Isolamento e identificação

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, onde foram semeadas para enriquecimento em Água Peptonada Alcalina, Caldo Tetratoato e Rappaport-Vassiliades, os quais foram incubados a 37°C por 24 horas. Para isolamento, as amostras foram então semeadas em placas de Ágar Xylose-Lysine Deoxycholate (XLD), Hektoen Entérico (HE), Salmonella-Shigella (SS) e Ágar MacConkey. Após 24 horas de incubação a 37°C as colônias de coloração enegrecida e características morfo-tintórias de *Salmonella* spp. foram selecionadas para identificação presuntiva, realizada por meio de coloração de Gram e provas bioquímicas que incluíram a inoculação em tubos contendo “Triple Sugar Iron” (TSI), “Lysine Iron Agar” (LIA), Motility e Indole (SIM), Glicose Oxidativa, Fermentativa (GOF), Ágar Citrato de Simmons e prova de oxidase segundo descrições de Quinn et al. (1994). Os isolados com identificação presuntiva de *Salmonella* spp. foram confirmados mediante a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção do gene *sidA* foi realizada de acordo com descrições de Oikonomou (2008) com algumas modificações. Num volume total de 25µl foram colocados MgCl<sub>2</sub> 2mM, 0,4mmol de dNTPs, tampão de enzima 1X (KCl 50mM; tris-HCl/pH 8,4; 10 mM; Triton X-100 0,1% - BioRad BioAgency), 0,4µmol de cada iniciador **SidA1** 5'-AAT ATC GCT TCG TAC CAC e **SidA2** 5'-GTA GGT AAA CGA GGA GCA G (Oikonomou et al., 2008) 0,5 unidades de *Taq* polimerase (BioRad Bioagency) e

uma alíquota de 5µl (não quantificado) de cada amostra de DNA extraído a partir das culturas bacterianas. Os ciclos de PCR foram conduzidos da seguinte forma: um primeiro passo de desnaturação a 94 °C por 1 min seguido por 30 ciclos de 94 °C por 20s, 57 °C por 1 min, 72 °C por 1min e 30s. A extensão final foi realizada a 72 °C por 6 min. Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose 0,7% submetido à eletroforese e examinado sob luz ultravioleta.

### **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

O perfil de sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos foi determinado por meio do método de difusão em disco Kirby-Bauer Modificado (BAUER et al., 1966). Os isolados foram inoculados em Caldo Müller Hinton e incubados a 37°C até obtenção de turvação conforme a escala 0,5 de Mac Farland. Com auxílio de um swab estéril, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo Ágar Müller Hinton, onde foram aplicados os discos de antimicrobianos. As drogas testadas foram tetraciclina (30 mcg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), norfloxacin (10 µg), oxacilina (1 µg), ceftriaxona (30 µg), lincomicina (2 µg), nitrofurantoina (300 µg), sulfametoxazol (25 µg), neomicina (30 µg) e penicilina G (10 U.I). As placas foram incubadas em estufa durante 24 horas a 37°C. O perfil de sensibilidade dos isolados foi determinado pela leitura dos halos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir do crescimento bacteriano, na coloração de gram observaram-se bacilos gram negativos, sendo a identificação realizada por meio das provas bioquímicas segundo Quinn et al., (1994). Foram isoladas 17 cepas bacterianas das quais sete foram identificadas como *Klebsiella* spp. (41,18%), seis *Salmonella* spp. (35,29%), duas *Serratia* spp. (11,76%), uma *Escherichia coli* (5,88%), uma *Providencia* spp. (5,88%) (Tabela 1).

Neste trabalho observou-se isolamento de *Salmonella* spp. em 50% (2/4) das serpentes avaliadas. Esses resultados foram confirmados pela PCR, na qual se observou amplificação de um fragmento de DNA de 274 kb. Resultados semelhantes foram encontrados por Sá e Solari (2001) que detectaram a presença de salmonelas em 39,1% das amostras de fezes ou swabs cloacais de répteis de estimação, sendo observada distribuição de 62,5% em lagartos; 53,3% em cobras e 25,8% em quelônios. Em outro trabalho foi encontrada maior proporção de serpentes (83,9%) apresentando esse microrganismo (LOPES, 2008). Dutra et al. (1998) detectaram *Salmonella* spp. em 12 das 18 amostras de fezes de jabutis-piranga (*Geochelone carolina*) provenientes de animais sadios do zoológico de Sorocaba, SP. Lopes (2008) observou significativa frequência de isolamento de *Salmonella* spp. Ainda de acordo com este autor, são poucos os trabalhos comparando a frequência de isolamento deste agente dentro das Ordens da Classe Reptilia.

A presença de *Salmonella* spp. em répteis é descrita por diversos autores e muitos deles afirmam que esses animais representam reservatórios importantes deste patógeno na natureza (JOHNSON-DELANEY, 1996; VAN DER WALT, 1997). A facilidade na aquisição de tartarugas, iguanas, teiús e até mesmo

serpentes em “pet shops”, ressalta a importância de esclarecimentos aos proprietários desses animais sobre os riscos de contaminação por patógenos zoonóticos como a *Salmonella* spp. (LOPES, 2008).

No presente estudo, a *Klebsiella* spp. foi isolada nas espécies *Boa constrictor* e *Caiman latirostris*. Este microrganismo já foi isolado em amostras de fezes de *Crotallus durissus terrificus* mantidas em cativeiro (Norberg et al. 2006). As infecções bacterianas podem ser favorecidas nestas condições devido à mudança do habitat e conseqüentemente do comportamento dos animais, causando estresse e comprometimento imunológico (SÁ e SOLARI, 2001).

Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina e amicacina. Por outro lado, observou-se elevada resistência a lincomicina, penicilina, rifamicina e a ampicilina. De modo especial as amostras de *Salmonella* spp. apresentaram alta resistência para eritromicina concordando com Ebani et al. 2005, e para combinação de sulfametoxazol e trimetoprim que está de acordo com os achados de Lopes (2008).

**Tabela 1.** Isolados de répteis mantidos em condições de cativeiro, Petrolina-PE

	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Providencia</i> spp.
<i>Boa constrictor</i>	2	3	0	0	0
<i>Coralus hortulanus</i>	0	2	0	1	0
<i>Pseudoboa clelia</i>	0	0	0	0	0
<i>Philodryas olfersii</i>	0	1	0	0	1
<i>Caiman latirostris</i>	1	0	2	0	0
<i>Geochelone carbonaria</i>	4	0	0	0	0

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem a participação dos répteis na cadeia epidemiológica, como reservatórios de alguns patógenos importantes, tais como a *Salmonella* spp. tornando importante a adoção de medidas preventivas em cativeiros e domicílios. Salienta-se a elevada resistência dos isolados à lincomicina, penicilina, rifamicina e ampicilina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

DUTRA, G.H.P.; FERNANDES, A.; CORES, C.A.M; TEIXEIRA, R.H.F. Pesquisa de *Salmonella* spp. em fezes de jabutis-piranga (*Geochelone carbavaria*) sadios. In: **II Congresso em VII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens. Anais...** Foz do Iguaçu, PR. Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, p.23, 1998.

GARCIA, L.E.; LAURE, C. J. A study of bacterial contamination of rattlesnake venom. **Rev.Soc.Bra.Med.Trop.**, v.20, p.19-21, 1986.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Maryland: Aspen Publishers, p.635, 2000

JOHNSON-DELANEY, C. A. Reptile zoonoses and threats to public health. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 20-33, 1996.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p.1465, 2001.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, p.964, 1984.

LOPES, L.F.L. **Salmonella sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as consequências para o manejo em cativeiro e reintrodução**. 2008. 123p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2008.

NORBERG, A.N.; TORRES, A.C.; MAURE, E.A.P.; RIBEIRO, P.C.; HELENA, A.A.S.; QUEIROZ, M.M.C. Salmonelose em *Crotalus durissus terrificus* mantidos em cativeiro. In: **58ª Reunião Anual da SBPC. Anais...** Florianópolis (SC), 2006.

OIKONOMOU, I.; HALATSI, K. & KYRIACOU, A. (2008). Selective PCR: a novel internal amplification control strategy for enhanced sensitivity in *Salmonella* diagnosis. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.465-461, 2008.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. **Clinical veterinary Medicine**, London: Mosby-Year ed., p.648, 1994.

SÁ, I.V.A.; SOLARI, C.A. *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.293-297, 2001.

VAN DER WALT, M. L.; HUCHZERMEYER, F. W.; STEYN, H. C. *Salmonella* isolated from crocodiles and other reptiles during the period 1985-1994 in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.64, p.277-283, 1997.