

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

HELOISA CASTRO PEREIRA

MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL E DA PEÇONHA DE *Bothrops atrox*
LINNAEUS, 1758 (OPHIDIA: VIPERIDAE)

UBERLÂNDIA
2015

HELOISA CASTRO PEREIRA

MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL E DA PEÇONHA DE *Bothrops atrox*
LINNAEUS, 1758 (OPHIDIA: VIPERIDAE)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro
Correia Lima

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P436m Pereira, Heloisa Castro, 1987-
2015 Microbiota da cavidade oral e da peçonha de *Bothrops atrox*
Linnaeus, 1758 (Ophidia: Viperidae) / Heloisa Castro Pereira. - 2015.
50 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 3.
Estomatite - Teses. 4. Bactérias - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

A concretização de mais esta etapa profissional é dedicada, sem dúvida alguma, aos animais, que são a razão da minha existência, e que por eles, me sinto incentivada a trabalhar e estudar, cada vez mais, a fim de me tornar mais preparada para continuar exercendo a mais bela das profissões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela força e pelas pessoas que sempre colocou em meu caminho para que essa conquista fosse possível.

Aos meus pais Nelson e Maria, por todo apoio e incentivo.

Aos familiares e amigos, por se fazerem presentes em minha vida e me auxiliarem durante esta trajetória, sobretudo, para conclusão desta pesquisa, foram fundamentais o apoio de Dayane Olímpia Gomes e Líria Queiroz Luz Hirano, para as quais deixo o meu eterno agradecimento.

Aos colegas do LADOC, com os quais tive o privilégio de conhecer e conviver.

Aos colegas do LAPAS, que também, sempre estiveram presentes em minha vida acadêmica e profissional, sobretudo ao professor André Luiz Quagliatto Santos, fundamental em todos os meus passos profissionais.

A Pentapharm do Brasil, por me liberar para que eu conseguisse cumprir toda a pesquisa e créditos, e que disponibilizou os animais para colheita de material, em especial Adelheid Sandoz, José Marcos Dini e Didier Pierrat.

Por fim, agradeço a professora Anna Monteiro Correia Lima, pela oportunidade desta realização, sempre me incentivando, aceitando minhas ideias e se fazendo presente em todas as etapas deste projeto. Fica a minha gratidão e admiração por esta excelente profissional.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	09
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 2 - Microbiologia em jararaca com estomatite. Bactérias aeróbias da cavidade oral em jararaca-do-norte <i>Bothrops atrox</i> com estomatite	16
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 3 – Bactérias em cavidade oral e peçonha de jararaca-do-norte <i>Bothrops atrox</i> saudáveis.....	28
RESUMO.....	28
1.Introdução.....	28
2.Material e Métodos.....	30
3.Resultados.....	33
4.Discussão.....	34
5.Conclusão.....	38
Referências.....	38
CAPÍTULO 4 - Microbiota da cavidade oral de jararaca-do-norte <i>Bothrops atrox</i> saudáveis e com estomatite.....	42
RESUMO.....	42
1.Introdução.....	42
2.Material e Métodos	44
3.Resultados e Discussão.....	45
5.Conclusão.....	48
Referências.....	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Frequência de bactérias encontradas na cavidade oral de <i>Bothrops atrox</i> com estomatite. Uberlândia, MG, 2014	21
---	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Bactérias encontradas na cavidade oral das serpentes <i>Bothrops atrox</i> e de sua respectiva peçonha desidratada. Uberlândia, MG, 2014	34
---	----

CAPÍTULO 4

TABELA 1 - Frequência de bactérias encontradas na cavidade oral de <i>Bothrops atrox</i> saudáveis ou que apresentaram estomatite. Uberlândia, MG, 2014.....	46
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Fig. 1: Fotografia de exemplar jovem de <i>Bothrops atrox</i> de cativeiro	09
--	----

CAPÍTULO 2

Fig.1: Colheita de material com <i>swab</i> esterilizado na região da bainha da presa. A: Cavidade oral saudável de <i>Bothrops atrox</i> ; B: Serpente com estomatite na região da bainha da presa direita.....	19
--	----

CAPÍTULO 3

Fig. 1: Fotografia da metodologia utilizada. A: Colheita de material com <i>swab</i> esterilizado; B: Tubos contendo o caldo Tioglicolato e Ágares utilizados; C: Coloração de Gram; D: Avaliação da lâmina através de microscópio óptico	32
---	----

Fig. 2: Fotografia da metodologia utilizada. A: Colônia bacteriana sendo semeada em ágar; B: Colônias bacterianas crescidas em ágar XLD; C e D: Meio de Rugai com Lisina	33
---	----

RESUMO

O interesse por pesquisas com serpentes do gênero *Bothrops* está em crescimento, já que a peçonha destes animais é utilizada para fins terapêuticos. Objetivou-se avaliar as bactérias presentes na cavidade oral e na peçonha em serpentes da espécie *Bothrops atrox* de um criatório comercial. Utilizaram-se 12 amostras colhidas com auxílio de *swab* esterilizado na região da bainha da presa, em animais que apresentavam estomatite, 30 amostras de secreção da cavidade oral em serpentes saudáveis e as respectivas peçonhas desidratadas, totalizando seis amostras de peçonha. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas em meio de transporte Stuart. As amostras foram semeadas em Ágar-sangue e Ágar XLD, posteriormente realizou-se Coloração de Gram e provas de Catalase e Manitol para identificação de bactérias Gram positivas, já para identificação das bactérias Gram negativas empregou-se triagem bioquímica com o Meio de Rugai com Lisina, Kit comercial para identificação de Enterobactérias. Nos 30 animais saudáveis e seis amostras de peçonha foram isoladas as seguintes bactérias Gram negativas: *Proteus* spp (34,15%), *Escherichia coli* (26,84%), *Citrobacter* spp (14,63%), *Serratia* spp (9,75%) e *Enterobacter* spp (7,31%) e Gram positivas: *Staphylococcus* spp (4,88%) e *Bacillus cereus* (2,44%). Nas 12 serpentes com estomatite isolou-se *Escherichia coli* (26,31%), *Citrobacter* spp (21,05%), *Proteus* spp (15,78%), *Salmonella* spp (10,52%) e o *Staphylococcus* spp (26,31%). Através do Teste exato de Fisher encontrou-se diferença significativa de *Staphylococcus* spp entre amostras de serpentes saudáveis e serpentes com estomatite, o que sugere que este microrganismo está relacionado com os casos de estomatite em *Bothrops atrox*.

Palavras-chave: bactérias, estomatite, serpentes, répteis.

ABSTRACT

Interest in research about *Bothrops* snake is growing, since the venom of these animals are used for therapeutic purposes. This study aimed to determine the bacteria in the oral cavity and venom in snakes of the species *Bothrops atrox* of a commercial breeding. We used 12 samples taken with the aid of sterile swab in the sheath region of prey, in animals with stomatitis, 30 samples of secretion in the mouth of healthy snakes and their dehydrated venom. The Samples were plated on agar- agar XLD blood and subsequently held If Gram staining and catalase tests and mannitol for Gram positive bacteria identification. For the identification of Gram negative bacteria was employed biochemical screening with Rugai medium Lysine. In the 30 healthy animals and six samples of venom the following Gram negative bacteria were isolated: *Proteus* spp (34.15%), *Escherichia coli* (26.84%), *Citrobacter* spp (14.63%), *Serratia* spp (9.75 %) and *Enterobacter* spp (7.31%) and Gram positive: *Staphylococcus* spp (4.88%) and *Bacillus cereus* (2.44%). In the 12 snakes with stomatitis *Escherichia coli* was isolated (26.31%), *Citrobacter* spp (21.05%), *Proteus* spp (15.78%), *Salmonella* (10.52%), and *Staphylococcus* spp (26.31%). Fisher's exact test showed a significant difference between samples of *Staphylococcus* spp from healthy snakes and serpents with stomatitis, suggesting that this microrganism is related to the cases of stomatitis in *Bothrops atrox*.

Keywords: Bacteria, reptile, snake, stomatitis.

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

A jararaca-do-norte pertence à classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Ophidia, família Viperidae, sub-família Crotalinae, gênero *Bothrops* e espécie *Bothrops atrox* Linnaeus, 1758 (Figura 1). É um réptil de porte médio podendo alcançar quase um metro e centímetros de comprimento, que habita tanto florestas como regiões de vegetação secundária, capoeiras e locais inundados. Encontrada na região norte do Brasil, esta espécie é considerada responsável pelo maior número de acidentes ofídicos na região (SBH, 2012).



Figura 1: Fotografia de exemplar jovem de *Bothrops atrox* de cativeiro.

Bothrops atrox é uma das espécies mais abundantes nos estudos realizados sobre comunidades de serpentes na Amazônia (MARTINS; OLIVEIRA, 1998; OLIVEIRA; MARTINS, 2001; FROTA, 2004; FROTA et al., 2005). Apresenta atividade predominantemente noturna, de forma que o adulto caça preferencialmente no chão, enquanto os juvenis são mais encontrados sobre a vegetação (MARTINS; OLIVEIRA, 1998; OLIVEIRA; MARTINS, 2001).

O hábito generalista da maioria das espécies de *Bothrops* sp. é um dos fatores responsáveis pela alta abundância dessas espécies na maioria dos habitats (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002). Alimenta-se de centopéias, peixes, anuros, lagartos, outras serpentes, aves e pequenos mamíferos (OLIVEIRA; MARTINS, 2003; MACEDO-BERNARDE; BERNARDE, 2005; NASCIMENTO; BERNARDE; BUZZETTI, 2008).

Acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública em países tropicais devido à frequência que ocorrem e à mortalidade e morbidade associadas a eles (CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, 1991). No Brasil, casos envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* constituem os acidentes ofídicos mais importantes no país (BRASIL, 2009).

Segundo Sá Neto e Dos Santos (1995) em estudo epidemiológico retrospectivo realizado com pacientes atendidos no Instituto de Medicina Tropical do Amazonas, no período de 1986 a 1992, foi observado que a principal espécie de serpente causadora de acidentes nesta região foi a *Bothrops atrox* (76%). Borges et al. (1999) também atribuíram a esta espécie o maior número de acidentes na região norte do Brasil.

A peçonha botrópica possui três atividades principais: 1) proteolítica ou necrosante, que determina um edema inflamatório na região da mordedura; 2) coagulante, a qual atua através de uma ou mais ações como trombina símila (semelhante à ação da trombina), ativadora de protrombina e do fator X, que promove um consumo dos fatores de coagulação com consequente alteração da coagulação sanguínea; 3) hemorrágica, que age no endotélio vascular na região da picada e também à distância (JORGE; RIBEIRO, 1990; SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1993).

Reações após o acidente ofídico de *Bothrops atrox* podem ser local e sistêmica (BORGES et al., 1999), e apresentam sintomatologias com presença de edema, dor, hemorragia local e sistêmica, necrose tecidual e insuficiência renal aguda (SÁ NETO; DOS SANTOS, 1995), além de eritema, cianose e celulite (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

A insuficiência renal aguda é uma complicação grave e potencialmente recuperável nos acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Podem decorrer de alterações do tipo glomerulonefrite aguda (MACCLURE, 1935), necrose tubular aguda (DA SILVA; LÓPEZ; GODOY, 1979) e necrose cortical (AMARAL et al., 1985).

O tratamento recomendado para acidentes ofídicos envolve a administração de soro antiofídico. Tais compostos são agentes imunológicos produzidos por imunização animal utilizando a toxina das serpentes peçonhentas de maior ocorrência (MORAIS et al., 1994; PICOLO et al., 2002).

Em algumas regiões do Brasil, o metronidazol e a heparina estão sendo utilizados, com base em trabalhos inconclusivos, como substitutos do soro antiofídico no tratamento dos pacientes acidentados por ofídios (LEONARD et al., 1990; HOWARD, et al., 1993; TAMBOURGI et al., 1994). Butcher et al. (1991) demonstraram que a heparina, além de não neutralizar a atividade coagulante da peçonha de *Bothrops atrox*, potencializou a sua ação

hemorrágica. Em relação ao metronidazol a eficácia deste medicamento é obtida quando utilizado em doses tóxicas (LEONARD et al., 1990).

A Instrução Normativa IBAMA N° 169 de 2008 institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro, visando atender às finalidades socioculturais, de pesquisa científica, de conservação, de exposição, de manutenção, de criação, de reprodução, de comercialização, de abate e de beneficiamento de produtos e subprodutos (IBAMA, 2008).

Segundo esta legislação, o criadouro comercial é todo empreendimento autorizado pelo órgão ambiental competente, de pessoa física ou jurídica, com finalidade de: criar, recriar, terminar, reproduzir e manter espécimes da fauna silvestre em cativeiro para fins de alienação de espécimes, partes, produtos e subprodutos. Define-se como parte ou produto da fauna silvestre: pedaço ou fração de um elemento de origem animal, que não tenha sido beneficiado a ponto de alterar sua característica, forma ou propriedade primária, como por exemplo, a peçonha de serpentes (IBAMA, 2008).

Melgarejo-Giménez (2002) afirma que a manutenção de serpentes peçonhentas envolve uma estrutura e funcionamento complexos e diferenciados, profissionais altamente qualificados e programas permanentes de vigilância, revisão e aperfeiçoamento. Um dos primeiros serpentários do Brasil foi o Instituto Butantan, no estado de São Paulo, criado pela necessidade da extração de peçonha para a produção dos primeiros soros antipeçonhentos das Américas

Jararacas são criadas em sistema intensivo de cativeiro, pois a peçonha destes répteis pode ser utilizada na produção de fármacos. O estresse que esses animais normalmente sofrem nos processos de extração de peçonha e adaptação a um ambiente artificial tem impacto direto na saúde destes répteis. Esta dinâmica interfere na microbiota oral, o que pode, por sua vez, alterar a quantidade e potência da peçonha (SOVERI; SEUNA, 1986).

A microbiota gastrintestinal de répteis é geralmente composta por bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbias e anaeróbias, leveduras e protozoários. Os bacilos Gram negativos são os principais agentes etiológicos de enfermidades em serpentes e representam importante papel como fontes secundárias às infecções de etiologia viral ou parasitária. A predominância dessas bactérias nos processos infecciosos está diretamente relacionada ao caráter oportunista assumido pela microbiota normal das serpentes (KOLESNIKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006).

Estomatites são comuns em répteis e caracterizam-se por inflamação da mucosa, que pode incluir gengivite, glossite, palatite e queilite. Infecções bacterianas, fúngicas e virais

são conhecidas e podem causar esses quadros (FRYE, 1991; HEATLEY et al., 2001; MADER, 2006).

Jorge et al., 1990 relatam que a microbiota oral das serpentes das diversas regiões do mundo é variada. Dentre os fatores sugeridos para explicar tais diferenças estão as particularidades dos exemplares avaliados. Temos como fatores importantes a espécie da serpente, sua origem, se é de vida livre ou cativeiro, seu estado de saúde, o fato de ter se alimentado recentemente ou não, e a condição dos animais utilizados para sua alimentação.

A cavidade oral de serpentes peçonhentas e não peçonhentas é colonizada por uma grande variedade de microrganismos anaeróbios e aeróbios, os quais se destacam as infecções causadas por *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Salmonella* spp, *Citrobacter* spp, *Escherichia coli*, *Providencia* spp, *Xanthomonas maltophilia*, entre outras (BLAYLOCK, 2001). Agentes Gram positivos também são eventualmente isolados, destacando-se *Streptococcus* spp e *Staphylococcus* spp (KOLENISKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2006).

Diferentes autores relatam que os microorganismos normalmente encontrados como componentes da microbiota do sistema digestivo podem atuar como agentes etiológicos de doenças gastrointestinais em répteis, porém estudos para identificação de microbiota, sobretudo na peçonha, são escassos (DIAZ-FIGUEROA; MITCHELL, 2006).

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacuçu* snake bite. **Toxicon**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 877-885, 1985.
- BLAYLOCK, R. S. M. Normal oral bacterial flora from some southern African snakes. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, Pretoria, v. 68, n. 3, p. 175-182, 2001.
- BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 6, p. 637-646, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em Saúde**. Zoonoses. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 224 p.
- BUTCHER, E. C. Leukocyte endothelial c and ll recognition: three steps to specificity and diversity. **Cell**, Cambridge, v. 67, n. 6, p. 1033-1036, 1991.

- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- DA SILVA, O. A.; LÓPEZ, M.; GODOY, P. Bilateral cortical necrosis and calcification of the kidneys following snakebite. A Case Report. **Clinical nephrology**, Munchen, v. 11, n. 3, p. 136-139, 1979.
- DIAZ-FIGUEROA, O.; MITCHELL, M. A. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**, 2.ed., St. Louis: W.B. Saunders, cap. 12, p. 145-162, 2006.
- FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; HADDAD JUNIOR, V.; FRANÇA, F. S. I. **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sávier e FAPESP, cap. 5, p. 310-323, 2009.
- FROTA, J. G. As serpentes da região de Itaituba, médio rio Tapajós, Pará, Brasil (Squamata). **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**. Série Zoologia, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 9-19, 2004.
- FROTA, J. G.; SANTOS Jr., A.P.; CHALKIDIS, H.M.; GUEDES, A. G. As serpentes da região do baixo rio Amazonas, oeste do Estado do Pará, Brasil (Squamata). **Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 211-220, 2005.
- FRYE, F. L. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. 2.ed. Melbourne: Krieger, 1991. 637p.
- HEATLEY, J. J.; MITCHELL, M. A.; WILLIAMS, J.; SMITH, J. A.; TULLY, T. N. Fungal periodontal osteomyelitis in a chameleon *Furcifer pardalis*. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, Lawrence, v. 11, n. 4, p. 7-12, 2001.
- HOWARD, M.; MUCHAME, L. T.; ANDRADE, S.; MENON, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 177, n. 4, p. 1205-1208, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. IBAMA. Instrução Normativa Ibama 169, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2008.
- JORGE, M. T.; MENDONÇA, J. S.; RIBEIRO, L. A.; SILVA, M. L. R.; KUSANO, E. J. U.; CORDEIRO, C. L. S. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 6-10, 1990.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 66-77, 1990.
- KOLENISKOVAS, C. K. M.; GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. C. R. Ordem Squamata. Subordem Ophidia (Serpente). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, cap. 8, p. 68-85, 2006.

LEONARD, E. J.; SKE, E. L. A.; YOSHIMURA, T.; NOER, K.; KUTVIRT, S.; VAN, D. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 1323-1330, 1990.

MACCLURE, E. Glomerulonefrite aguda difusa consequente a envenenamento por cobra (*Bothrops jararacussu*). **Bol.Sec.Geral Saúde Assist.**, 3:35-49, 1935.

MACEDO-BERNARDE, L. C.; BERNARDE, P. S. *Bothrops atrox* (Common Lancehead). **Diet. Herpetological Review**, Salt Lake City, v. 36, p. 4, p. 456, 2005.

MADER, D. R. *Reptile medicine and surgery*. 2.ed. St. Louis: W.B. Saunders, 2006. 1242p.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, Norwalk, v. 6, n. 2, p. 78-150, 1998.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (Genus *Bothrops*). In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds.). **Biology of the vipers**. Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing, cap. 20, p. 307-328. 2002.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. IN: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório**: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

MORAIS, J. F.; DE FREITAS, M. C. W.; YAMAGUCHI, I. K.; DOS-SANTOS, M. C.; DA SILVA, W. D. Snake antivenom from hyperimmunized horses: biological properties of their whole IgG and F(ab) 2 fragments. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 725-734, 1994.

NASCIMENTO, P. F.; BERNARDE, P. S.; BUZZETTI, D. R. C. *Bothrops atrox* (Amazonian Lancehead). **Diet. Herpetological Review**, Salt Lake City, v. 39, n. 3, p. 353, 2008.

OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, Norwalk, v. 8, n. 2, p. 101-110, 2001.

OLIVEIRA, M.E.; MARTINS, M. *Bothrops atrox* (Common Lancehead). **Prey. Herpetological Review**, Salt Lake City, v. 34, n. 1, p. 61-62, 2003.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 1221-1228, 2002.

SÁ-NETO, R. P.; DOS SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM), 1986-92: estudo retrospectivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 28, n. 1, p. 171, 1995.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Acidentes por serpentes peçonhentas: clínica e tratamento. In: _____. **Manual de vigilância epidemiológica**. Acidentes por animais peçonhentos: identificação, diagnóstico e tratamento. São Paulo: CPCCAAp, cap. 3, p. 19-28. 1993.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista de répteis do Brasil**. SBH 2012. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso 20 set. 2014.

SOVERI, T.; SEUNA, E. R. Aerobic oral bacteria in healthy captive snakes. **Acta veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p. 172-181, 1986.

STIVAL, S. A. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno bruto da *Bothrops moojeni* em células mononucleares do sangue periférico humano**. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2011.

TAMBOURGI, D. V.; SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F. D.; FREITAS, M. C. W.; DIAS DA SILVA, W.; KIPNIS, T. L. Pro-inflammatory activities in *Elapidae* snake venoms. **British journal of pharmacology**, London, v. 112, n. 3, p. 723-771, 1994.

CAPÍTULO 2 - Microbiologia em jararaca com estomatite

Bactérias aeróbias da cavidade oral em jararaca-do-norte *Bothrops atrox* com estomatite criadas em cativeiro

A estomatite é uma das doenças mais frequentes em criatórios comerciais de serpentes, sendo os bacilos Gram negativos os principais agentes etiológicos com importante papel como fontes secundárias a infecções virais ou parasitárias. A predominância de bactérias nos processos infecciosos está diretamente relacionada ao caráter oportunista assumido pela microbiota normal, quando as serpentes sofrem desequilíbrio e estresse durante o processo de extração de peçonha. Objetivou-se analisar as bactérias aeróbias presentes na cavidade oral em serpentes da espécie *Bothrops atrox*. Amostras foram colhidas de 12 animais auxílio de *swab* esterilizado na região da bainha da presa, em serpentes que apresentaram estomatite em um criatório comercial. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório em meio de transporte *Stuart*, e posteriormente foram transferidas para tubos contendo caldo Tioglicolato e armazenadas em estufa 37 °C por 24 horas. As amostras foram semeadas em Ágar-sangue e Ágar XLD. Realizou-se Coloração de Gram e testes bioquímicos como: Catalase, Manitol e Mini Kit comercial contendo o Meio de Rugai com Lisina. As bactérias Gram negativas isoladas foram *Escherichia coli* (26,31%), *Citrobacter* spp (21,05%), *Proteus* spp (15,78%) e *Salmonella* spp (10,52%) e, *Staphylococcus* spp (26,31%) como Gram positiva.

Palavras-chave: Gram negativa- bacteriológico - Reptilia - Ophidia

INTRODUÇÃO

A jararaca-do-norte pertence à classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Ophidia, família Viperidae, sub-família Crotalinae, gênero *Bothrops* e espécie *Bothrops atrox* Linnaeus, 1758. É um réptil que pode alcançar quase um metro e cinquenta centímetros de comprimento, que habita tanto florestas como regiões de vegetação secundária, capoeiras e locais inundados. Encontrada na região norte do Brasil, esta espécie é considerada responsável pelo maior número de acidentes ofídicos nas localidades de sua ocorrência (SBH 2012).

O gênero *Bothrops* compreende serpentes peçonhentas com dentição solenóglifa, ou seja, possuem presas inoculadoras móveis na região rostral da cavidade oral, sendo as que oferecem real risco quanto à inoculação da peçonha na ocorrência do acidente ofídico (Borges 2001).

Bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbias e anaeróbias, leveduras e protozoários estão geralmente presentes na microbiota gastrintestinal de répteis, sendo os bacilos Gram negativos os principais agentes etiológicos de doenças em serpentes e representam importante papel como fontes secundárias às infecções de etiologia viral ou parasitária. A predominância dessas bactérias nos processos infecciosos está diretamente relacionada ao caráter oportunista assumido pela microbiota normal das serpentes (Koleniskovas et al. 2006).

A microbiota oral das serpentes das diversas regiões do mundo é variada. Há vários fatores sugeridos para explicar tais diferenças, como a espécie da serpente, sua origem, se é de vida livre ou cativeiro, seu estado de saúde, o fato de ter se alimentado recentemente ou não, e a condição dos animais utilizados para a alimentação (Jorge et al. 1990).

O estresse que esses répteis normalmente sofrem nos processos de extração de peçonha e adaptação em ambiente artificial tem impacto direto na saúde das serpentes, esta dinâmica

interfere na microbiota oral, o que pode alterar a quantidade, qualidade e potência da peçonha (Soveri & Seuna 1986).

As doenças bacterianas em ofídios são caracterizadas por diferentes manifestações clínicas, sendo observadas estomatites, abscessos subcutâneos e oftálmicos, glossites, gastroenterites, pneumonias, ooforites e septicemia (Ferreira et al. 2012). Barreto et al. (2011) em levantamento das principais afecções clínicas em serpentes da família Boidae criadas em cativeiro, avaliaram que a estomatite foi relatada por 83% dos criadores de serpentes que entrevistaram.

Diferentes relatos afirmam que os microrganismos normalmente encontrados como componentes da microbiota do sistema digestório podem atuar como agentes etiológicos de doenças gastrointestinais em répteis, mas são poucos os pesquisadores que definiram essas bactérias para as espécies brasileiras de répteis. Adicionalmente, os relatórios são escassos e muitos deles estão desatualizados (Diaz-Figueroa & Mitchell 2006).

Jararacas vêm sendo criadas em sistema intensivo de cativeiro, já que a peçonha desses répteis pode ser utilizada na produção de fármacos, o que pode predispor a serpente para estomatite. Objetivou-se conhecer quais são as bactérias aeróbias encontradas na cavidade oral de *Bothrops atrox* de cativeiro que apresentavam estomatite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras para exames microbiológicos de 12 serpentes da espécie *Bothrops atrox*, sendo quatro machos e oito fêmeas, com média de cinco anos de idade, e que apresentavam estomatite. As amostras foram colhidas de animais do criatório comercial para extração de peçonha Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação LTDA, Uberlândia, Minas Gerais, com número de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 11904.

Esta pesquisa foi realizada mediante a aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 41060-1 e parecer favorável do Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 142/13. Para não agregar fonte de estresse às serpentes, as colheitas das amostras foram realizadas juntamente a procedimentos de rotina do criatório, que segue normas internacionais de bem-estar animal e biossegurança. As amostras foram colhidas antes que fosse realizado qualquer tratamento.

As serpentes com estomatite apresentaram infecção, com presença de cáseos na região da bainha de umas das presas, local de maior ocorrência de estomatite em *Bothrops atrox*. Foram contidas fisicamente colocando-se o gancho próximo ao terço final da cabeça, posicionando-se então, a mão na região das duas articulações temporomandibulares do animal, dessa forma, pressionam-se os ossos quadrados e a boca da serpente já permanece aberta (Passos 2009). Procedeu-se a colheita com auxílio de um *swab* com algodão alginatado esterilizado, da secreção da cavidade oral de cada serpente, na região da bainha da presa inoculadora de peçonha que apresentasse estomatite, como representado pela Figura 1 (Jorge et al. 1990).

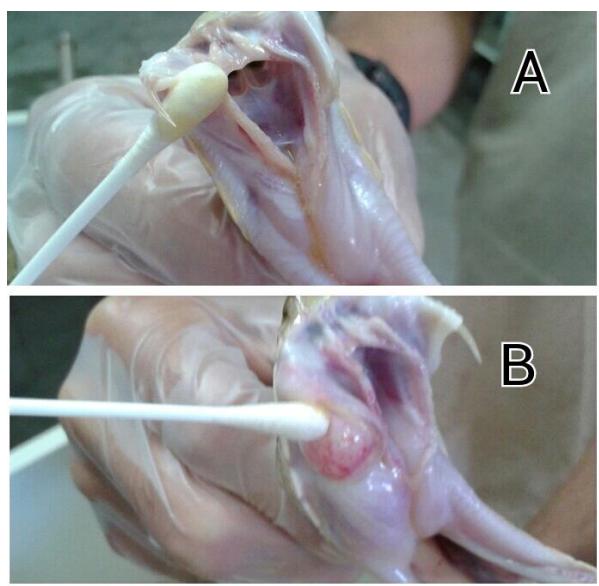


Fig.1: Colheita de material com *swab* esterilizado na região da bainha da presa. **A:** Cavidade oral saudável de *Bothrops atrox*; **B:** Serpente com estomatite na região da bainha da presa direita.

As amostras colhidas foram armazenadas em tubos plásticos contendo o meio de transporte semi-sólido *Stuart* e encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia. Foram então transferidas para tubos contendo caldo Tioglicolato, meio altamente nutritivo que dá suporte para o crescimento de vários microrganismos, a partir disso foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas (Oplustil 2004).

Para isolar as colônias bacterianas, as amostras foram semeadas com auxílio de uma alça de platina em placas de Petri uma contendo o Ágar-sangue e outra contendo o Ágar XLD (Xylose-Lysine Deoxycholate), utilizando-se a Técnica de Esgotamento em Ágar. As placas semeadas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, sendo incubadas (Quinn et al. 2004).

A partir de colônias do Ágar-sangue foi feita a Coloração de Gram para identificação de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Para a identificação das bactérias Gram positivas foram utilizadas as provas de Catalase e Manitol (Oplustil 2004).

As colônias crescidas no Ágar XLD foram identificadas através de Mini Kits comerciais, contendo Meio de Rugai com Lisina, que tem como finalidade a triagem bioquímica de colônias que crescem nos meios seletivos para bactérias Gram negativas, pertencentes a família Enterobacteriaceae. Utilizou-se um Meio para cada colônia diferente do Ágar XLD, para identificação de cada gênero ou espécie bacteriana, conforme recomendações do fabricante (Oplustil 2004).

RESULTADOS

Houve crescimento bacteriano nas doze amostras analisadas da cavidade oral de *Bothrops atrox* com estomatite, em algumas ocorreu presença de mais de um microrganismo. Foram

isoladas as seguintes bactérias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp, *Proteus* spp e *Salmonella* spp. A única bactéria Gram positiva isolada foi o *Staphylococcus* spp. As frequências de cada microrganismo estão descritas na Tabela 1.

TABELA1- Frequência de bactérias encontradas na cavidade oral de *Bothrops atrox* com estomatite. Uberlândia, MG, 2014.

Microrganismos	Número de amostras positivas	Frequência (%)
<i>Escherichia coli</i>	5	26,32
<i>Staphylococcus</i> spp	5	26,32
<i>Citrobacter</i> spp	4	21,05
<i>Proteus</i> spp	3	15,78
<i>Salmonella</i> spp	2	10,53
TOTAL	19	100

DISCUSSÃO

Os microrganismos encontrados nesta pesquisa alertam para o fato de que a cavidade oral de *Bothrops atrox* com estomatite apresentou uma ou mais bactérias, sendo que estas podem ou não fazer parte da microbiota normal desta espécie de serpente.

Ferreira Junior et al. (2009) avaliaram a microbiota aeróbica da cavidade oral, cloaca e peçonha de exemplares da espécie *Crotalus durissus terrificus* recém-capturadas da natureza e mantidas em quarentena, serpentes mantidas em cativeiro coletivo e serpentes criadas em cativeiro individual. As bactérias mais frequentes foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Morganella morganii*, destas isolamos em *Bothrops atrox* apenas *Proteus* spp.

A cavidade oral de serpentes peçonhentas e não peçonhentas é colonizada por uma grande variedade de microrganismos anaeróbios e aeróbios, destacam-se as infecções causadas por

Aeromonas hydrophila, *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Salmonellas* pp, *Citrobacter* spp, *Escherichia coli*, *Providencia* spp, *Xanthomonas maltophilia*, entre outras. (Blaylock 2001).

Agentes Gram positivos também são eventualmente isolados, destacando-se *Streptococcus* spp e *Staphylococcus* spp. (Koleniskovas et al. 2006). Nesta pesquisa isolou-se *Staphylococcus* spp em *Bothrops atrox* em 26% das amostras.

Algumas bactérias com o potencial zoonótico já foram isoladas como parte da microbiota normal dos ofídios, sendo os bacilos Gram negativos, os principais agentes etiológicos, tais como a bactéria *Morganella morganii*, que tem distribuição mundial e é encontrada na microbiota normal dos ofídios tanto da cavidade oral quanto cloacal. Este microrganismo é um dos agentes bacterianos envolvidos nas complicações locais por necrose secundária no humano após o acidente ofídico (Mader 1998). Em análise de abscesso subcutâneo em jibóia, *Boa constrictor*, Ferreira et al. (2012) constataram que *Morganella morganii* era o agente etiológico.

Estudos com *Salmonella* spp em serpentes sugerem que a entrada de organismos infecciosos em uma coleção não está relacionada somente à adição de novos répteis, mas também pode ser relacionado ao alimento que o réptil recebe em cativeiro, tais como roedores (Williams 2008). O criatório de *Bothrops atrox* em que colhemos as amostras tem biotério próprio de camundongos *Mus musculus*, com controle rigoroso quanto a entrada de roedores silvestres.

Bastos et al. (2008) avaliaram a prevalência de enterobactérias em *Bothrops jararaca* no Estado de São Paulo, através de levantamento microbiológico com amostras colhidas diretamente do cólon de serpentes adultas e saudáveis. Foram obtidos vários gêneros da família Enterobacteriaceae (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* e *Salmonella*) e um gênero de bactéria Gram negativa morfologicamente semelhante (*Aeromonas*). *Salmonella*, *Citrobacter* e *Escherichia* foram os isolados mais frequentes. Nesta pesquisa também foram identificadas *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* e

Citrobacter. Confirmando que estas bactérias parecem fazer parte da microbiota normal de boca de serpentes da espécie *Bothrops atrox*.

Em estudo da microbiota presente nas presas, bainha das presas e peçonha de *Bothrops jararaca* os autores descreveram que as espécies bacterianas mais frequentemente encontradas foram: Esteptococos do grupo D, *Providencia rettgeri*, *Providencia* sp, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e *Clostridium* sp., porém com menor frequência *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Citrobacter* sp. (Jorge et al. 1990). Destas, cinco também foram encontradas nesta pesquisa, *E. coli*, *Staphylococcus* spp, *Citrobacter* spp, *Proteus* spp e *Salmonella* spp.

Fonseca et al. (2009) fizeram um estudo microbiológico da cavidade oral de dez diferentes espécies de serpentes, pertencentes às famílias Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae e identificaram as bactérias *Actinomyce* spp, *Bulkolderia* sp., *Moraxella* sp., *Proteus* sp., *Sarcina* sp., *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Yersinia enterocolitica*. Confirmando a presença de *Proteus* spp e *Staphylococcus* spp em *Bothrops atrox*.

Serapicos et al. (2005) avaliaram alterações macroscópicas e microscópicas observadas em serpentes *Micrurus corallinus* mantidas em cativeiro, e verificaram o aparecimento de vesículas nos animais e, ao exame microbiológico, isolou-se *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nos mesmos exemplares realizou-se também hemocultura através da punção asséptica de sangue intra-cardíaco, isolando também o *Staphylococcus aureus*, indicando assim um quadro de septicemia por este agente. O *Staphylococcus* spp foi isolado em 26% das amostras de *Bothrops atrox* analisadas.

CONCLUSÃO

As bactérias Gram-negativas encontradas em *Bothrops atrox* com estomatite foram *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp, *Proteus* spp, *Salmonella* spp e *Staphylococcus* spp, como a única bactéria Gram positiva encontrada.

Em todas as amostras analisadas houve crescimento de pelo menos um microrganismo, o que ressalta a importância de conhecer os microrganismos presentes na cavidade oral de *Bothrops atrox*, como auxílio em tratamento em humanos após acidente ofídico, e ressaltando também, a importância dos profissionais em utilizarem luvas de procedimento quando manipularem serpentes.

As *Bothrops atrox* estão sendo criadas em sistema intensivo de cativeiro, já que a peçonha desses répteis pode ser utilizada na produção de fármacos para uso humano, o que enfatiza a importância de se estudar a microbiota presente na cavidade oral.

REFERÊNCIAS

Bastos HM, Lopes LFLM.A, Matushima ER 2008. Prevalence of enterobacteria in *Bothrops jararaca* in São Paulo State: microbiological survey and antimicrobial resistance. *Acta Sci Biol Sci* 30:321-326.

Barreto UHA, Ribeiro ASS, Monteiro FOB, Ruivo LVP, Guimaraes CDO, Everton EB 2011. Levantamento das afecções clínicas em serpentes da família Boidae criadas em cativeiro. Anais do 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011 Nov 1-4, SOMEVE SC, Florianópolis, SC, p. 1-3.

Blaylock RSM 2001. Normal oral bacterial flora from some southern African snakes. *Onderstepoort J Vet Res* 68: 175-182.

Borges RC 2001. *Serpentes peçonhentas brasileiras*, Atheneu , Belo Horizonte, 148 pp.

Diaz-Figueroa O, Mitchell MA 2006. Gastrointestinal anatomy and physiology. In DR MADER, (ed.), *Reptile medicine and surgery*, 2^a ed., Saunders Elsevier, St. Louis, p. 145-162.

Ferreira B, Oliveira AVD, Laborda SS, Freire Jr LJS, Queiroz LDT, Anunciação AVM 2012. Infecção por *Morganella morganii* como causa de abscesso subcutâneo em *Boa constrictor* em conservação *ex situ*. *J Bras Ci Anim* 5:320-334.

Ferreira Junior RS, Siqueira AK, Campagner TS, Soares TCS, Lucheis SB, Paes AC, Barraviera B 2009. Comparação da microbiota de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) de vida-livre e cativeiro. *Pesq Vet Bras* 29:999-1003.

Fonseca MG, Moreira WMQ, Cunha KC, Ribeiro ACMG, Almeida MTG 2009. Oral microbiota of Brazilian captive snakes. *J Venom Anim Toxin Sincl Trop Dis* 15:54-60.

Jorge MT, Mendonça JS, Ribeiro LA, Silva MLR, Kusano EJU, Cordeiro CLS 1990. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 32: 6-10.

Koleniskovas CKM, Grego KF, Albuquerque LCR 2006. Ordem Squamata. Subordem Ophidia (Serpente). In: Z CUBAS, JCR SILVA, JL CATÃO-DIAS. *Tratado de animais selvagens*. Roca, São Paulo, p. 68-85, 2006.

Mader DR 1998. Common bacterial disease and antibiotic therapy in reptiles. *Comp Cont Educ Pract* 20: 23-33.

Oplustil CP 2004. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*, 2^a ed., Sarvier, São Paulo, 340 pp.

Passos RRFCF 2009. *Contenção física de serpentes: técnicas e precauções*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 32 pp.

Quinn LM, Dickins RA, Coombe M, Hime GR, Bowtell DD, Richardson H 2004. *Drosophila Hfp* negatively regulates *dmyc* and *stg* to inhibit cell proliferation. *Development* 131:1411-1423.

Serapicos EO, Casagrande RA, Matushima ER, Merusse JLB 2005. Alterações macro e microscópicas observadas em serpentes *Micrurus corallinus* mantidas em biotério. *Ver Port ciênc vet* 100:71-74.

Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista de répteis do Brasil. São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso em: 20 jul. 2013.

Soveri T, Seuna ER 1986. Aerobic oral bacteria in healthy captive snakes. *Acta Vet Scand* 27:172-181.

Williams DL 2008. Healthy herpetology: the role of the veterinarian in reptile prophylaxis. *Vet J* 175:16-17.

1 **CAPÍTULO 3 - Bactérias em cavidade oral e peçonha de jararaca-do-norte**2 ***Bothrops atrox* saudáveis de cativeiro**

3

4

5 **RESUMO**

6 Objetivou-se determinar as bactérias presentes na cavidade oral e peçonha desidratada de
7 *Bothrops atrox*. Utilizaram-se 30 amostras colhidas com *swab* na região da bainha da presa, em
8 30 serpentes que se apresentavam saudáveis e amostras de suas respectivas peçonhas. As
9 amostras de cavidade oral e peçonha foram semeadas em Ágar-sangue e Ágar XLD, e realizou-
10 se Coloração de Gram e provas de Catalase e Manitol para identificação de bactérias Gram
11 positivas. Para a identificação das Gram negativas, empregou-se triagem bioquímica, utilizando
12 o Meio de Rugai com Lisina. Foram isoladas as seguintes bactérias Gram negativas: *Proteus*
13 spp (34,15%), *Escherichia coli* (26,84%), *Citrobacter* spp (14,63%), *Serratia* spp (9,75%) e
14 *Enterobacter* spp (7,31%). As bactérias Gram positivas isoladas foram o *Staphylococcus* spp
15 (4,88%), presente em duas das amostras analisadas e o *Bacillus cereus* (2,44%), presente em
16 apenas uma amostra. Houve presença de pelo menos um microrganismo em todas as amostras
17 de cavidade oral e na peçonha.

18 Palavras-chave: Bacteriológico, Ophidia, Reptilia, Serpente.

19

20 **1. Introdução**

21 A jararaca-do-norte pertence à classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Ophidia,
22 família Viperidae, sub-família Crotalinae, gênero *Bothrops* e espécie *Bothrops atrox* Linnaeus,
23 1758 (SBH, 2012).

24 Os acidentes ofídicos possuem uma taxa de letalidade mundial de 2,3%, no Brasil chega
25 a 6%. Os acidentes botrópicos podem gerar insuficiência renal aguda, causada principalmente

26 por necrose tubular aguda. As principais frações tóxicas na peçonha botrópica são as
27 metaloproteinases e a botropsina. Pode ocorrer a formação de trombos, levando à isquemia
28 renal pela diminuição da perfusão sanguínea (Castro, 2006).

29 O paciente que teve acidente ofídico por *Bothrops* sp., normalmente mostra sinais de
30 perda tecidual tais como edema, abscesso e necrose, promovidos pela ação de enzimas
31 proteolíticas. A necrose local pode complicar-se pela ação das bactérias, provenientes da boca
32 da serpente, e formação de abscesso (Jorge et al., 1994).

33 As espécies de bactérias encontradas na cavidade oral de serpentes em diferentes regiões
34 do mundo são variadas. Tal diversificação decorre da espécie da serpente, sua origem, se é de
35 vida livre ou cativeiro, seu estado de saúde (Jorge et al., 1990).

36 Os bacilos Gram negativos são os principais microrganismos encontrados na microbiota
37 de serpentes. A predominância dessas bactérias nos processos infecciosos está diretamente
38 relacionada ao caráter oportunista assumido pela microbiota normal desses répteis
39 (Koleniskovas, 2006).

40 Mosca (2008) estudou a ação da peçonha de várias espécies de serpentes das famílias
41 Viperidae e Elapidae contra a bactéria *Streptococcus mutans*, que está presente na cárie humana
42 e avaliou que apenas as peçonhas das serpentes *B. moojeni* e *B. jararacussu* apresentaram halo
43 de inibição de crescimento de *S. mutans*, constatando que a peçonha dessas duas espécies de
44 serpentes inibiram o crescimento de *Streptococcus mutanse*. O componente responsável pela
45 inibição parece ser o peróxido de hidrogênio. Apesar de ainda não totalmente conclusivos, os
46 ensaios já realizados permitem afirmar que peçonha de serpentes são ferramentas importantes
47 na inibição do crescimento de patógenos, especificamente daqueles envolvidos nas doenças
48 cariogênicas.

49 Stival (2011) avaliou a peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni*, constatando que em
50 concentrações de 0,5 e 0,05 µg/mL, quando colocado em células mononucleares de sangue

51 periférico humano não há reação de toxicidade, o que torna possível a utilização desta peçonha
52 para fins terapêuticos.

53 O Captopril é um fármaco atualmente comercializado para tratamento de hipertensão,
54 possui o princípio ativo produzido a partir da piroglutamil, retirado da peçonha da serpente
55 *Bothrops jararaca* (Hayashi; Camargo, 2005).

56 As serpentes do gênero *Bothrops* vêm sendo criadas em sistema intensivo de cativeiro, já
57 que a peçonha destes répteis pode ser utilizada na produção de fármacos. Entretanto, pouco se
58 sabe da microbiota da cavidade oral e principalmente da peçonha destas serpentes.

59 Objetivou-se conhecer quais são as bactérias encontradas na cavidade oral e peçonha de
60 *Bothrops atrox* de cativeiro.

61

62 **2. Material e Métodos**

63 Foram colhidas amostras para exames microbiológicos de 30 serpentes da espécie
64 *Bothrops atrox*, sendo 15 machos e 15 fêmeas, com média de cinco anos de idade, que estavam
65 aparentemente saudáveis, com bom escore corporal, bom estado de hidratação e sem alterações
66 de ecdise. Avaliaram-se amostras de peçonha desidratada das mesmas serpentes em que foram
67 colhidas amostras da cavidade oral, a cada cinco serpentes. As *Bothrops atrox* utilizadas são do
68 criatório comercial para extração de peçonha Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação
69 LTDA, Uberlândia, Minas Gerais, com número de registro no Instituto Brasileiro do Meio
70 Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 11904.

71 Esta pesquisa foi realizada mediante a aprovação do Sistema de Autorização e Informação
72 em Biodiversidade (SISBIO), número 41060-1 e parecer favorável do Comissão de Ética na
73 Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 142/13. Para não
74 agregar fonte de estresse às serpentes, as colheitas das amostras foram realizadas juntamente a

75 procedimentos de rotina do criatório, que segue normas internacionais de bem-estar animal e
76 biossegurança.

77 As serpentes foram contidas fisicamente colocando-se o gancho próximo ao terço final
78 da cabeça, posicionando-se então, a mão na região das articulações temporomandibulares do
79 animal, dessa forma a boca da serpente já permanece aberta (Passos, 2009). Procedeu-se a
80 colheita de uma amostra de cada serpente, na região da bainha da presa inoculadora de peçonha
81 do antímero direito, com auxílio de um *swab* com algodão alginatado esterilizado. Foi realizada
82 extração de peçonha nas mesmas serpentes em que foram colhidas as amostras da secreção da
83 cavidade oral, devido à pouca quantidade de peçonha por serpente, optou-se por analisar a
84 peçonha a cada cinco serpentes, distribuídos em seis grupos.

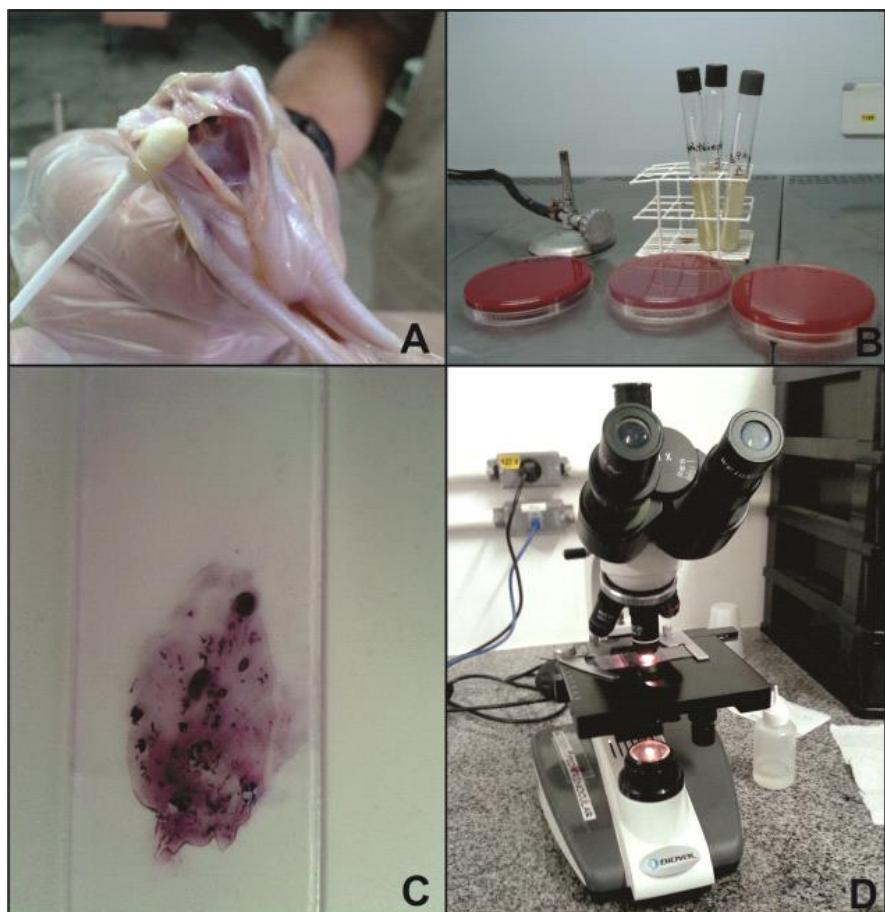
85 As amostras colhidas foram armazenadas em tubos plásticos contendo o meio de
86 transporte semi-sólido *Stuart* e encaminhadas para o Laboratório de Doenças
87 Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia. Foram então transferidas para tubos
88 contendo caldo Tioglicolato, meio altamente nutritivo que dá suporte para o crescimento de
89 vários microrganismos, a partir disso foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24
90 horas (Oplustil, 2004).

91 As amostras de peçonha passaram por um processo de desidratação em bomba de
92 secagem a vácuo. Após este processo, foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças
93 Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia e transferidas para tubos contendo
94 caldo Tioglicolato.

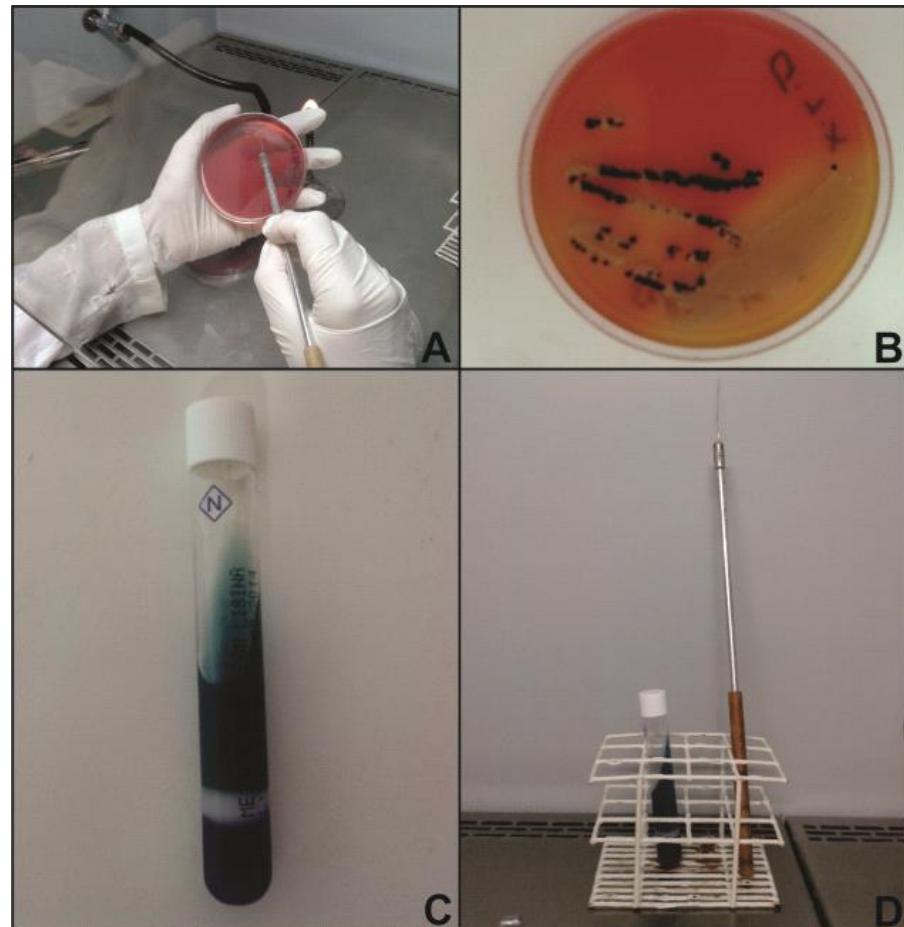
95 Para isolar as colônias bacterianas, as amostras foram semeadas com auxílio de uma alça
96 de platina em placas de Petri uma contendo o Ágar-sangue e outra contendo o Ágar XLD
97 (Xylose-Lysine Deoxycholate), utilizando-se a Técnica de Esgotamento em Ágar. As placas
98 semeadas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, sendo incubadas
99 (Quinn et al. 2004).

100 A partir de colônias do Ágar-sangue foi feita a Coloração de Gram para identificação de
101 bactérias Gram positivas e Gram negativas. Para a identificação das bactérias Gram positivas
102 foram utilizadas as provas de Catalase e Manitol (Oplustil 2004).

103 As colônias crescidas no Ágar XLD foram identificadas através de Mini Kits comerciais,
104 contendo Meio de Rugai com Lisina, que tem como finalidade a triagem bioquímica de colônias
105 que crescem nos meios seletivos para bactérias Gram negativas, pertencentes a família
106 Enterobacteriaceae. Utilizou-se um Meio para cada colônia diferente do Ágar XLD, para
107 identificação de cada gênero ou espécie bacteriana, conforme recomendações do fabricante
108 (Oplustil 2004). Metodologia representada pelas Figuras 1 e 2.



109
110 **Fig. 1:** Fotografia da metodologia utilizada. **A:** Colheita de material
111 com *swab* esterilizado; **B:** Tubos contendo o caldo Tioglicolato e
112 Ágares utilizados; **C:** Coloração de Gram; **D:** Avaliação da lâmina
113 através de microscópio óptico.



114

115 **Fig. 2:** Fotografia da metodologia utilizada. **A:** Colônia bacteriana
 116 sendo semeada em ágar; **B:** Colônias bacterianas crescidas em ágar
 117 XLD; **C e D:** Meio de Rugai com Lisina.

118

119 **3. Resultados**

120 Houve crescimento bacteriano nas 30 amostras analisadas da cavidade oral de *Bothrops*
 121 *atrox* que estavam saudáveis, assim como nas seis amostras de peçonha, em algumas ocorreu
 122 presença de mais de um microrganismo (Tabela 1). Foram isoladas as seguintes bactérias Gram
 123 negativas: *Proteus* spp (34,15%), *Escherichia coli* (26,84%), *Citrobacter* spp (14,63%),
 124 *Serratia* spp (9,75%) e *Enterobacter* spp (7,31%). As bactérias Gram positivas isoladas foram
 125 o *Staphylococcus* spp (4,88%), presente em duas das amostras analisadas e o *Bacillus cereus*
 126 (2,44%), presente em apenas uma amostra.

127 **TABELA 1**

128 Bactérias encontradas na cavidade oral das serpentes *Bothrops atrox* e de sua respectiva
 129 peçonha desidratada. Uberlândia, MG, 2014.

130

GRUPOS (N = 5)	BACTÉRIAS DA CAVIDADE ORAL	BACTÉRIAS DA PEÇONHA DESIDRATADA
1	<i>Escherichia coli</i> (n = 4) <i>Proteus</i> spp (n = 1)	<i>Escherichia coli</i>
2	<i>Proteus</i> spp (n = 4) <i>Escherichia coli</i> (n = 1)	<i>Escherichia coli</i>
3	<i>Citrobacter</i> spp (n = 3) <i>Proteus</i> spp (n = 2)	<i>Proteus</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp
4	<i>Proteus</i> spp (n = 3) <i>Citrobacter</i> spp (n = 2)	<i>Proteus</i> spp
5	<i>Enterobacter</i> spp (n = 3) <i>Proteus</i> spp (n = 2) <i>Serratia</i> spp (n = 2)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Bacillus cereus</i>
6	<i>Escherichia coli</i> (n = 3) <i>Citrobacter</i> spp (n = 1) <i>Serratia</i> spp (n = 1)	<i>Serratia</i> spp

131 N = número de serpentes

132 n = número de amostras

133

134

135

136

137

138 **4 . Discussão**

139 Em todas as amostras colhidas e analisadas houve crescimento bacteriano, e em algumas,
 140 mais de um microrganismo foi identificado. Algumas bactérias com o potencial zoonótico já
 141 foram isoladas como parte da microbiota normal dos ofídios, sendo os principais agentes

142 etiológicos os bacilos Gram negativos, tanto da cavidade oral quanto cloacal. Estes
143 microrganismos são agentes bacterianos envolvidos nas complicações locais por necrose
144 secundária no humano após o acidente ofídico (Mader, 1998).

145 Estudos com *Salmonella* em serpentes sugerem que a entrada de organismos infecciosos
146 em uma criação não está relacionada somente à adição de novos répteis, mas também ao
147 alimento que o réptil recebe em cativeiro. Garantir a saúde de todos os animais que constituem
148 uma coleção é primordial. Higiene também é importante em instalações de processamento de
149 peçonha (Williams, 2008). Nas amostras colhidas em serpentes saudáveis do criatório
150 comercial desta pesquisa, esta bactéria não foi isolada, nem nas amostras da cavidade oral e
151 nem na peçonha.

152 Estudos para identificação de microrganismos presentes, sobretudo na peçonha de
153 serpentes, são escassos. Diferentes autores relatam que os microorganismos normalmente
154 encontrados como componentes da microbiota do sistema digestivo podem atuar como agentes
155 etiológicos de doenças gastrointestinais em répteis, mas são poucos os pesquisadores que
156 definiram essas bactérias para as espécies brasileiras de répteis (Diaz-Figueroa; Mitchell, 2006).

157 Bastos et al. (2008) avaliaram a prevalência de enterobactérias em *Bothrops jararaca*. As
158 amostras foram colhidas diretamente do cólon de serpentes adultas e saudáveis. Isolaram-se
159 vários gêneros da família Enterobacteriaceae, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*,
160 *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* e *Salmonella* e um gênero de bactéria
161 Gram negativa morfologicamente semelhante (*Aeromonas*). *Salmonella*, *Citrobacter* e
162 *Escherichia* foram os isolados mais frequentes. Na cavidade oral de *Bothrops atrox* analisada,
163 destas bactérias também foram identificados os gêneros *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter* e
164 *Citrobacter*, e nas amostras de peçonha analisadas foram isoladas *Escherichia coli* e *Proteus*
165 spp.

166 Jorge et al. (1990) estudaram a microbiota presente nas presas, bainha das presas e
167 peçonha de *Bothrops jararaca*, porém avaliaram a peçonha líquida e não já desidratada. Os
168 autores descreveram que as espécies bacterianas mais frequentemente encontradas foram:
169 Estreptococos do grupo D, *Providencia rettgeri*, *Providencia* sp., *Escherichia coli*, *Morganella*
170 *morganii* e *Clostridium* sp., e com menor frequência *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*,
171 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Citrobacter* sp. Estes autores utilizaram
172 serpentes saudáveis, de vida livre, e não utilizadas para fins comerciais.

173 Neste estudo, as bactérias encontradas na cavidade oral corresponderam às espécies
174 encontradas na peçonha desidratada, exceto *Citrobacter* spp e *Enterobacter* spp, que foram
175 isolados somente em amostras de cavidade oral, e *Staphylococcus* spp e *Bacillus cereus*, que
176 foram isolados somente na peçonha.

177 Fonseca et al. (2009) fizeram um estudo microbiológico da cavidade oral de serpentes
178 saudáveis pertencentes às famílias Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae e identificaram as
179 bactérias *Actinomyces* sp., *Bulkolderia* sp., *Moraxella* sp., *Proteus* sp., *Sarcina* sp., *Bacillus*
180 *subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Yersinia enterocolitica*,
181 destas o *Proteus* spp e *Staphylococcus* spp, também isoladas em *Bothrops atrox*.

182 A presença de *B. cereus* em alimentos, sobretudo no leite é bastante descrita. No leite, a
183 sua presença ocorre tanto devido à resistência do microrganismo ao tratamento térmico, quanto
184 à contaminação do alimento após o tratamento. *B. cereus* é um agente formador de biofilmes,
185 fato que pode explicar o aumento da taxa de contaminação do leite. Assim, salienta-se que tanto
186 a contaminação anterior ao processamento térmico quanto a que ocorre após o tratamento do
187 leite podem ocasionar a presença desse microrganismo nos diferentes tipos de leite disponíveis
188 ao consumidor (Rezende-Lago et al., 2007). Houve crescimento de *Bacillus cereus* em uma
189 amostra de peçonha, isto pode ter ocorrido por contaminação do material utilizado para a
190 colheita da amostra de peçonha, apesar deste material ter sido esterilizado em autoclave.

191 Mesmo sabendo que a microbiota da cavidade oral das serpentes é bastante variada e é
192 composta por bactérias que possuem potencial zoonótico, a peçonha destes répteis, em baixas
193 concentrações, pode ser utilizada como inibidores de bactérias, principalmente das espécies
194 Gram negativas (Talan et al., 1991; Páramo et al., 1998).

195 Há grande interesse em pesquisas sobre a ação de diferentes componentes da peçonha de
196 serpentes do gênero *Bothrops*, o que torna importante conhecer a microbiota ali presente,
197 mesmo após o processo de desidratação da peçonha. Mosca (2008) estudou a ação da peçonha
198 de várias espécies de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae contra a bactéria
199 *Streptococcus mutans*, que está presente na cárie humana. Apesar de ainda não totalmente
200 conclusivos, os ensaios já realizados permitem afirmar que a peçonha de serpentes consiste em
201 uma ferramenta importante na inibição do crescimento de patógenos, especificamente daqueles
202 envolvidos nas doenças cariogênicas. Foram isolados somente na cavidade oral os
203 microrganismos *Citrobacter* spp e *Enterobacter* spp, sendo que estes não foram isolados nas
204 amostras de peçonha.

205 Segundo Stival (2011), a peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni* não apresenta
206 citotoxicidade nas concentrações 0,5 e 0,05 µg/mL quando colocado em células mononucleares
207 de sangue periférico humano, o que o torna potencialmente útil para verificar possível efeito
208 terapêutico sobre estas células infectadas por microorganismos como, por exemplo, o HIV - 1.

209 Segundo Hayashi e Camargo (2005) o Captopril, um fármaco atualmente comercializado
210 para tratamento de hipertensão, possui o princípio ativo produzido a partir da piroglutamil,
211 retirado da peçonha da serpente brasileira da espécie *Bothrops jararaca*. A piroglutamil é uma
212 prolina rica em oligopeptídeos, que age como potencializador de bradicinina e inibidores
213 naturais da enzima somática de angiotensina.

214

215

216 **5. Conclusão**

217

218 Com as análises de microbiota presentes na cavidade oral e peçonha de *Bothrops atrox*
219 saudáveis foi possível isolar sete microrganismos diferentes. Em todas as amostras analisadas
220 houve crescimento de pelo menos um microrganismo, inclusive nas amostras de peçonha após
221 passarem pelo processo de desidratação, o que ressalta a importância desse tipo de investigação,
222 principalmente quando são criadas comercialmente e a peçonha é utilizada para fins
223 terapêuticos, de uso humano. Há a possibilidade de que a peçonha tenha inibido o crescimento
224 do *Citrobacter* spp e *Enterobacter* spp.

225

226

227 **Referências**

228

229 Bastos, H.M., Lopes, L.F.L., Gattamorta, M.A., Matushima, E.R. 2008. Prevalence of
230 enterobacteria in *Bothrops jararaca* in São Paulo State: microbiological survey and
231 antimicrobial resistance. *Acta scientiarum - Biological sciences* 30, 321-326.

232 Castro, I, 2006. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico,
233 com ênfase a toxicidade renal. *O mundo da saúde* 30,644-653.

234 Diaz-Figueroa, O., Mitchell, M.A, 2006. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Mader,
235 D.R. (Ed.), *Reptile medicine and surgery*. Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 145-162.

236 Fonseca, M.G., Moreira, W.M.Q., Cunha, K.C., Ribeiro, A.C.M.G., Almeida, M.T.G., 2009.
237 Oral microbiota of Brazilian captive snakes. *Journal of venomous animals and toxins*
238 including tropical diseases

15, 54-60.

- 239 Hayashi, M.A.F., Camargo, A.C.M., 2005. The Bradykinin-potentiating peptides from venom
240 gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic
241 angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45, 1163–1170.
- 242 Jorge, M.T., Mendonça, J.S., Ribeiro, L.A., Silva, M.L.R., Kusano, E.J.U., Cordeiro, C.L.S.,
243 1990. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível
244 fonte de infecção no local da picada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São
245 Paulo* 32, 6-10.
- 246 Jorge, M.T., Ribeiro, L.A., Da Silva, M.L., Kusano, E.J., Mendonça, J.S., 1994.
247 Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snake bite in humans: a
248 prospective study. *Toxicon* 32, 743-748.
- 249 Koleniskovas, C.K.M., Grego, K.F., Albuquerque, L.C.R., 2006. Ordem Squamata. Subordem
250 Ophidia (Serpente). In: CUBAS, Z., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de
251 animais selvagens*. Roca, São Paulo, pp. 68-85.
- 252 Mader, D.R., 1998. Common bacterial disease and antibiotic therapy in reptiles. *Compendium
253 on continuing education for the practicing veterinarian* 20, 23-33.
- 254 Mosca, R.C., 2008. Inibição do crescimento da microflora oral por venenos de serpentes. 85 f.
255 Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares,
256 Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 257 Oplustil, C.P., 2004. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. Sarvier, São Paulo, 340
258 pp.
- 259 Páramo, L, Lomonte, B., Pizarro-Cerda, J, Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1998.
260 Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops*
261 *asper* snake venom Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129) - peptide identifies its
262 bactericidal region. *European Journal of Biochemistry* 253, 452-461.

- 263 Passos, R.R.F.C.F., 2009. Contenção física de serpentes: técnicas e precauções. 32 f.
264 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia,
265 Uberlândia.
- 266 Quinn, L.M., Dickins, R.A., Coombe, M., Hime, G.R., Bowtell, D.D., Richardson, H., 2004.
267 *Drosophila* Hfp negatively regulates dmyc and stgto inhibit cell proliferation.
268 Development 131, 1411-1423.
- 269 Rezende-Lago, N.C.M., Rossi Jr., O.D., Vidal –Martins, A.M.C., Amaral, L.A., 2007.
270 Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas
271 isoladas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 59, 1563-1569.
- 272 Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista de répteis do Brasil. São Paulo, 2012. Disponível
273 em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso em: 20 jul. 2013.
- 274 Stival, A. S., 2011. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da *Bothrops moojeni* em
275 células mononucleares do sangue periférico humano. 48 f. Dissertação (Mestrado em
276 Ciências Ambientais e Saúde) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia.
- 277 Talan, D.A., Citron, D.M., Overturf, G.D., Singer, B., Froman, P., Goldstrein, E.J.C., 1991.
278 Antibacterial Activity of Crotalid Venoms against Oral Snake Flora and Other Clinical
279 Bacteria. Clinical Infectious Diseases 164, 195-198.
- 280 Williams, D.L., 2008. Healthy herpetology: the role of the veterinarian in reptile prophylaxis.
281 The veterinary jornal 175, 16-17.
- 282
- 283
- 284

1 **CAPÍTULO 4 - Microbiota da cavidade oral de jararaca-do-norte *Bothrops atrox***
2 **saudáveis e com estomatite de cativeiro**

3

4

5 **RESUMO**

6 Objetivou-se isolar as bactérias da cavidade oral de 30 serpentes *Bothrops atrox* saudáveis e 12
7 com estomatite. A colheita foi realizada com auxílio de *swab* na bainha da presa, as amostras
8 foram transportadas em meio *Stuart* e semeadas em Ágar-sangue e Ágar XLD. Realizaram-se
9 Coloração de Gram e provas de Catalase e Manitol para identificação de bactérias Gram
10 positivas, já na identificação das bactérias Gram negativas empregou-se triagem bioquímica
11 com meio de Rugai com Lisina. Nos animais saudáveis foram isoladas as espécies: *Proteus*
12 spp (37,5%), *Escherichia coli* (25%), *Citrobacter* spp (18,76%), *Serratia* spp (9,37%) e
13 *Enterobacter* spp (9,37%). Nas serpentes com estomatite isolaram-se *Escherichia coli*
14 (26,31%), *Citrobacter* spp (21,05%), *Proteus* spp (15,78%), *Salmonella* spp (10,52%) e o
15 *Staphylococcus* spp (26,31%). Observou-se diferença significativa de *Staphylococcus* spp entre
16 amostras de serpentes saudáveis e com estomatite, o que sugere que este microrganismo está
17 relacionado com os casos de estomatite em *Bothrops atrox*.

18 **Palavras-chave:** Bacteriológico, Ophidia, Reptilia, Serpente.

19

20 **1. Introdução**

21 Serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são os maiores responsáveis por acidentes
22 ofídicos no Brasil. A jararaca-do-norte pertence à família Viperidae, sub-família Crotalinae,
23 gênero *Bothrops* e espécie *Bothrops atrox* Linnaeus, 1758 (SBH, 2012). Esta espécie é a maior
24 responsável por acidentes ofídicos na região Norte do Brasil.

25 Soro antiofídico e medicamentos são pesquisados e produzidos através de algumas
26 frações da peçonha das serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*. As principais frações
27 tóxicas na peçonha botrópica são as metaloproteinases e a botropsina. Pode ocorrer a formação
28 de trombos, levando à isquemia renal pela diminuição da perfusão sanguínea (Castro, 2006).

29 Na maioria dos criatórios de *Bothrops*, a extração manual de peçonha ocorre
30 mensalmente, para evitar lesões na boca da serpente, o que poderia causar estomatite. Giannotti
31 et. al (2013) estudaram alterações morfológicas nas glândulas de peçonha em serpentes que
32 tiveram produção de peçonha deficiente, e encontraram lesões que indicam um excesso de
33 pressão sofrida pelas glândulas durante o procedimento de extração.

34 Em caso de acidente ofídico por *Bothrops* sp., normalmente mostra sinais de perda
35 tecidual tais como edema, abscesso e necrose, promovidos pela ação de enzimas proteolíticas.
36 Além disto, pode haver complicações no local da mordida devido ao grande número de
37 bactérias provenientes da boca do réptil, formando abscessos (Jorge et al., 1994).

38 Os bacilos Gram negativos são os principais microrganismos encontrados na microbiota
39 de serpentes, e podem agir em caráter oportunista, ocasionando doenças nestes animais
40 (Koleniskovas, 2006).

41 Segundo Jorge et al. (1990), as espécies de bactérias encontradas na cavidade oral de
42 serpentes em diversas regiões do mundo são variadas. Desta forma, o objetivo foi conhecer
43 quais são as bactérias encontradas na cavidade oral saudável ou cavidade oral com estomatite
44 de *Bothrops atrox* de cativeiro, que são utilizadas para extração de peçonha, avaliando se as
45 bactérias encontradas em serpentes com estomatite fazem parte da microbiota normal desta
46 espécie de serpente.

47

48

49

50 **2. Material e Métodos**

51

52 Foram colhidas amostras da cavidade oral para exames microbiológicos de 30 serpentes
53 saudáveis da espécie *Bothrops atrox*, sendo 15 machos e 15 fêmeas, e amostras de 12 serpentes
54 *Bothrops atrox* que apresentaram estomatite, sendo oito fêmeas e quatro machos. Procedeu-se
55 colheita de uma amostra por serpente, e estas serpentes apresentavam idade média de cinco
56 anos. As amostras foram colhidas de animais do criatório comercial para extração de peçonha
57 Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação LTDA, Uberlândia, Minas Gerais, com número
58 de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
59 (IBAMA) 11904.

60 Esta pesquisa foi realizada mediante a aprovação do Sistema de Autorização e Informação
61 em Biodiversidade (SISBIO), número 41060-1 e parecer favorável do Comissão de Ética na
62 Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 142/13. Para não
63 agregar fonte de estresse às serpentes, as colheitas das amostras foram realizadas juntamente a
64 procedimentos de rotina do criatório, que segue normas internacionais de bem-estar animal e
65 biossegurança. As amostras foram colhidas antes que fosse realizado qualquer tratamento.

66 As serpentes foram contidas fisicamente colocando-se o gancho próximo ao terço final
67 da cabeça, posicionando-se então, a mão na região das articulações temporomandibulares do
68 animal, dessa forma a boca da serpente já permanece aberta (Passos, 2009). Procedeu-se a
69 colheita com auxílio de um *swab* com algodão alginatado esterilizado, da secreção da cavidade
70 oral de cada serpente, na região da bainha da presa inoculadora de peçonha.

71 As amostras colhidas foram armazenadas em tubos plásticos contendo o meio de
72 transporte semi-sólido *Stuart* e encaminhadas para o Laboratório de Doenças
73 Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia. Foram então transferidas para tubos
74 contendo caldo Tioglicolato, meio altamente nutritivo que dá suporte para o crescimento de

75 vários microrganismos, a partir disso foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24
76 horas (Oplustil, 2004).

77 Para isolar as colônias bacterianas, as amostras foram semeadas com auxílio de uma alça
78 de platina em placas de Petri uma contendo o Ágar-sangue e outra contendo o Ágar XLD
79 (Xylose-Lysine Deoxycholate), utilizando-se a Técnica de Esgotamento em Ágar. As placas
80 semeadas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, sendo incubadas
81 (Quinn et al. 2004).

82 A partir de colônias do Ágar-sangue foi feita a Coloração de Gram para identificação de
83 bactérias Gram positivas e Gram negativas. Para a identificação das bactérias Gram positivas
84 foram utilizadas as provas de Catalase e Manitol (Oplustil 2004).

85 As colônias crescidas no Ágar XLD foram identificadas através de Mini Kits comerciais,
86 contendo Meio de Rugai com Lisina, que tem como finalidade a triagem bioquímica de colônias
87 que crescem nos meios seletivos para bactérias Gram negativas, pertencentes a família
88 Enterobacteriaceae. Utilizou-se um Meio para cada colônia diferente do Ágar XLD, para
89 identificação de cada gênero ou espécie bacteriana, conforme recomendações do fabricante
90 (Oplustil 2004). A análise estatística foi realizada através do Teste exato de Fisher,
91 considerando-se 5% de significância.

92

93 **3. Resultados e Discussão**

94

95 Houve crescimento bacteriano nas trinta amostras analisadas da cavidade oral de
96 *Bothrops atrox* que estavam saudáveis, assim como nas doze amostras analisadas de cavidade
97 oral de *Bothrops atrox* com estomatite, em algumas ocorreu presença de mais de um
98 microrganismo. Nos trinta animais saudáveis foram isoladas as seguintes bactérias: *Proteus* spp
99 (37,5%), *Escherichia coli* (25%), *Citrobacter* spp (18,76%), *Serratia* spp (9,37%) e

100 *Enterobacter* spp (9,37%). Nas doze serpentes com estomatite isolou-se *Escherichia coli*
 101 (26,31%), *Citrobacter* spp (21,05%), *Proteus* spp (15,78%), *Salmonellas* pp (10,52%) e o
 102 *Staphylococcus* spp, presente em 26,31%.

103 Através do Teste exato de Fisher encontrou-se diferença significativa de *Staphylococcus*
 104 spp entre amostras de serpentes saudáveis e serpentes com estomatite, o que sugere que este
 105 microrganismo está relacionado com os casos de estomatite em *Bothrops atrox* (Tabela 1).

106

107 **TABELA 1**

108 Frequência de bactérias encontradas na cavidade oral de *Bothrops atrox* saudáveis ou que
 109 apresentaram estomatite. Uberlândia, MG, 2014.

Microrganismos	Número em serpentes saudáveis (30)	Frequência (%)	Número em serpentes com estomatite (12)	Frequência (%)	“P” valor
<i>Escherichia coli</i>	8	25,00	5	26,32	0,4635
<i>Staphylococcus</i> spp	-	-	5	26,32	0,0009
<i>Citrobacter</i> spp	6	18,76	4	21,05	0,4331
<i>Proteus</i> spp	12	37,50	3	15,78	0,4848
<i>Serratia</i> spp	3	9,37	-	-	0,5453
<i>Enterobacter</i> spp	3	9,37	-	-	0,5453
<i>Salmonella</i> spp	-	-	2	10,53	0,0767
TOTAL	32	100	19	100	

110

111

112 Fonseca et al. (2009) fizeram um estudo microbiológico da cavidade oral de serpentes
 113 saudáveis, pertencentes às famílias Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae e identificaram

114 as bactérias *Actinomyces* sp., *Bulkolderia* sp., *Moraxella* sp., *Proteus* sp., *Sarcina* sp., *Bacillus*
115 *subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Yersinia enterocolitica*.

116 Destas, as espécies *Proteus* spp e *Staphylococcus* spp foram encontradas em *B. atrox*, o que
117 sugere que estas bactérias fazem parte da microbiota normal destes répteis. O *Staphylococcus*
118 spp em *Bothrops atrox* foi isolado somente em serpentes com estomatite.

119 A microbiota oral e cloacal dos répteis é composta sobretudo por bacilos Gram negativos,
120 dentre estas bactérias algumas têm caráter zoonótico, como se evidencia em casos de
121 complicações após acidente ofídico em humanos, no qual o local se apresenta infecionado e
122 algumas vezes com necrose (Mader, 1998). A *Salmonella* que foi isolada em *Bothrops atrox*
123 com estomatite, é um exemplo de bactéria com caráter zoonótico, e é bastante descrita como
124 parte da microbiota normal das serpentes. Logicamente, não é apenas a *Salmonella*, a única
125 bactéria presente em serpentes e que tenha caráter zoonótico, tem-se relatos de outros
126 microrganismos como *Chlamydophila* spp e *Mycobacterium* spp (Williams, 2008).

127 As bactérias encontradas em cavidade oral saudável de *Bothrops atrox* sugerem que estas
128 fazem parte da microbiota normal desta espécie de serpente, e que podem causar doenças,
129 dentre elas a estomatite, em consequência do caráter oportunista, quando o animal se encontra
130 debilitado. Autores relatam que os microorganismos normalmente encontrados como
131 componentes da microbiota do sistema digestivo podem atuar como agentes etiológicos, mas
132 são poucos os pesquisadores que definiram essas bactérias para as espécies brasileiras de répteis
133 (Diaz-Figueroa; Mitchell, 2006).

134 Bastos et al. (2008) em estudo da microbiota de amostras colhidas diretamente do cólon
135 de *Bothrops jararaca* saudáveis, conseguiram isolar vários gêneros da família
136 Enterobacteriaceae, *Salmonella*, *Citrobacter* e *Escherichia* foram os isolados mais frequentes,
137 o que indica que estes gêneros de bactérias são encontrados na microbiota intestinal de *Bothrops*
138 *jararaca*, estes três gêneros também foram isolados em nosso estudo com *Bothrops atrox*.

139 Assim como em *Bothrops atrox*, Jorge et al. (1990), isolaram *Escherichia coli*, *Proteus*
140 spp, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Citrobacter* spp na microbiota presente
141 nas presas, bainha das presas e peçonha de *Bothrops jararaca*. Os autores descreveram ainda
142 outros microrganismos, tais como: Estreptococos do grupo D, *Providencia rettgeri*,
143 *Providencia* spp, *Morganella morganii*, *Clostridium* spp e *Pseudomonas* spp.

144 Deve-se ter cuidado e medidas profiláticas de quarentena ao se introduzir serpentes de
145 vida livre em um plantel estabilizado, uma vez que estes novos animais podem causar sérios
146 desequilíbrios na microbiota existente nos exemplares de cativeiro. O mesmo cuidado deve-se
147 ter com os roedores utilizados na alimentação das serpentes, que podem veicular
148 microrganismos patogênicos e que desequilibrem esta microbiota (Williams, 2008).

149 Há vários estudos quanto à utilidade farmacológica da peçonha de serpentes do gênero
150 *Bothrops*, o que torna importante o conhecimento da microbiota presente na cavidade oral
151 destes animais (Talan et al., 1991, Páramo et al., 1998, Hayashi; Camargo, 2005).

152

153 **4. Conclusão**

154

155 Foram isoladas as bactérias *Staphylococcus* spp e *Salmonella* spp somente em serpentes
156 que apresentavam estomatite, porém houve diferença significativa somente para o
157 *Staphylococcus* spp, o que sugere que o aparecimento deste microrganismo está relacionado a
158 casos de estomatite, já os microrganismos *Proteus* spp, *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp,
159 *Serratia* spp, *Enterobacter* spp e *Salmonella* spp fazem parte da microbiota normal de *Bothrops*
160 *atrox*.

161

162

163

164 **Referências**

- 165 Bastos, H.M., Lopes, L.F.L., Gattamorta, M.A., Matushima, E.R., 2008. Prevalence of
166 enterobacteria in *Bothrops jararaca* in São Paulo State: microbiological survey and
167 antimicrobial resistance. *Acta scientiarum - Biological sciences* 30, 321-326.
- 168 Castro, I, 2006. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico,
169 com ênfase a toxicidade renal. *O mundo da saúde* 30,644-653.
- 170 Diaz-Figueroa, O., Mitchell, M.A, 2006. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Mader,
171 D.R. (Ed.), *Reptile medicine and surgery*. Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 145-162.
- 172 Fonseca, M.G., Moreira, W.M.Q., Cunha, K.C., Ribeiro, A.C.M.G., Almeida, M.T.G., 2009.
173 Oral microbiota of Brazilian captive snakes. *Journal of venomous animals and toxins*
174 including tropical diseases
- 175 Giannotti, K.C., Sesso, A., Grego, K.F., Fernandes, W., Cardoso Junior, R.P., Camargo, G.G.,
176 Carneiro, S.M., 2013. Viperid venom glands with defective venom production.
177 Morphological study. *Toxicon* 70, 32-43.
- 178 Hayashi, M.A.F., Camargo, A.C.M., 2005. The Bradykinin-potentiating peptides from venom
179 gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic
180 angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45, 1163–1170.
- 182 Jorge, M.T., Mendonça, J.S., Ribeiro, L.A., Silva, M.L.R., Kusano, E.J.U., Cordeiro, C.L.S.,
183 1990. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível
184 fonte de infecção no local da picada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São*
185 *Paulo* 32, 6-10.
- 186 Jorge, M.T., Ribeiro, L.A., Da Silva, M.L., Kusano, E.J., Mendonça, J.S., 1994.
187 Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snake bite in humans: a
188 prospective study. *Toxicon* 32, 743-748.

- 189 Koleniskovas, C.K.M., Grego, K.F., Albuquerque, L.C.R., 2006. Ordem Squamata. Subordem
190 Ophidia (Serpente). In: CUBAS, Z., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de
191 animais selvagens. Roca, São Paulo, pp. 68-85.
- 192 Mader, D.R., 1998. Common bacterial disease and antibiotic therapy in reptiles. Compendium
193 on continuing education for the practicing veterinarian 20, 23-33.
- 194 Oplustil, C.P., 2004. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. Sarvier, São Paulo, 340
195 pp.
- 196 Páramo, L, Lomonte, B., Pizarro-Cerda, J, Bengoechea, J.A., Gorvel, J.P., Moreno, E., 1998.
197 Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops*
198 *asper* snake venom Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129) - peptide identifies its
199 bactericidal region. European Journal of Biochemistry 253, 452-461.
- 200 Passos, R.R.F.C.F., 2009. Contenção física de serpentes: técnicas e precauções. 32 f.
201 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia,
202 Uberlândia.
- 203 Quinn, L.M., Dickins, R.A., Coombe, M., Hime, G.R., Bowtell, D.D., Richardson, H., 2004.
204 *Drosophila* Hfp negatively regulates dmyc and stgto inhibit cell proliferation.
205 Development 131, 1411-1423.
- 206 Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista de répteis do Brasil. São Paulo, 2012. Disponível
207 em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso em: 20 jul. 2013.
- 208 Talan, D.A., Citron, D.M., Overturf, G.D., Singer, B., Froman, P., Goldstrein, E.J.C., 1991.
209 Antibacterial Activity of Crotalid Venoms against Oral Snake Flora and Other Clinical
210 Bacteria. Clinical Infectious Diseases 164, 195-198.
- 211 Williams, D.L., 2008. Healthy herpetology: the role of the veterinarian in reptile prophylaxis.
212 The veterinary journal 175, 16-17.
- 213