

ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ANFÍBIOS E RÉPTEIS

Gilberti MORENO⁽¹⁾, Carlos A. M. LOPES⁽¹⁾, Hélio E. BELLUOMINI⁽³⁾,
Gil V. A. PESSÓA⁽⁴⁾, Persio de BIASI⁽³⁾ e José C. R. ANDRADE⁽²⁾

RESUMO

Foram estudadas 618 espécies de animais de sangue frio, compreendendo: 90 *Bothrops jararaca*; 79 *Bothrops moojenii*; 55 *Bothrops neuwiedi*; 19 *Bothrops jararacussu*; 119 *Crotalus durissus terrificus*; 50 *Crotalus durissus collilineatus*; 44 *Bothrops alternatus*; 24 *Bothrops cotiara*; 57 *Bothrops pradoi*; 25 *Ameiva ameiva* e 56 *Bufo paracnemis*. Os resultados indicaram o predomínio de *Citrobacter* (35,3%), seguida de *Proteus vulgaris* (16,4%), *Proteus morgani* (14,4%) e *Proteus rettgeri* (13,0%). O grupo *Salmonella*, com um total de 127 isolamentos (20,55%), fez-se representar por 14 espécies diferentes e alguns tipos sorológicos não identificados em nosso meio. Foram ainda isolados cinco amostras de *Arizona* (0,65%) a partir de serpentes. Os Autores concluem que os animais de sangue frio, particularmente as serpentes e os lagartos, comportam-se como um dos maiores reservatórios de *Salmonella* encontrados em a natureza.

INTRODUÇÃO

Embora o animal de sangue frio ofereça um vastíssimo campo de trabalho científico, pouco são os pesquisadores que se dedicam ao conhecimento de sua biologia. Com reações fisiológicas e "habitat" completamente diferentes daqueles hospedeiros normalmente utilizados em experimentação microbiológica, encontramos nesses animais condições ímpares para um estudo comparativo de suas manifestações biológicas, relativamente àqueles animais ditos homeotérmicos.

Particularmente em relação ao encontro de enterobactérias em animais de sangue frio, queremos referir os achados de HINSHAW & MCNEIL² que ao estudarem 12 espécimes de *Sceloporus occidentalis* isolam *Salmonella rubislaw* em três deles. ZWART⁷ refere o encontro de lagartos portadores de *Salmonella* em 37,5% dos animais examinados. LE NOC & BRYCOO⁴ examinando 127 camaleões, encontram 48 animais portadores com 58 dife-

rentes tipos de *Salmonella*. KOURANY & col.³ estudando anfíbios e répteis do Panamá acusam *Salmonella* em 27,8% e 6,5%, respectivamente para lagartos e sapos.

Entre nós LINS⁵ investigando mamíferos e répteis capturados no Estado do Pará, indica o isolamento de 11,81% de *Salmonella* em répteis. Na baixa região Amazônica LINS⁶ verifica ainda o encontro de *Salmonella* em cobras e lagartos.

Considerando esses fatos objetivamos no presente trabalho analisar a flora Gram negativa de anfíbios e répteis, particularmente no que se refere a família *Enterobacteriaceae*.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Amostragem

Foram estudados 618 espécimes de animais de sangue frio, compreendendo: 90 *Bothrops*

(1) Do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu Rua Rubião Júnior. Caixa Postal 102, São Paulo, Brasil
(2) Estagiário do mesmo Departamento
(3) Do Instituto Butantan
(4) Do Instituto Adolfo Lutz

jararaca; 79 *Bothrops moojeni*; 55 *Bothrops neuwiedi*; 19 *Bothrops jararacussu*; 119 *Crotalus durissus terrificus*; 50 *Crotalus durissus collilineatus*; 44 *Bothrops alternatus*; 24 *Bothrops cotiara*; 57 *Bothrops pradoi*; 25 *Ameiva ameiva* e 56 *Bufo paracnemis*.

O material de serpentes foi obtido no Instituto Butantan. A colheita de fezes coincide com a extração de veneno para fins de imunização. Os sapos e lagartos foram capturados no Município de Botucatu.

2) Colheita de Material

Para esta finalidade foram estabelecidos dois critérios:

2.1) *Colheita de fezes em serpentes* — Após ligeiro entorpecimento pelo gás carbônico, procedeu-se uma massagem ao longo do corpo dos ofídios, recolhendo-se o material fecal em tubos contendo salina glicerinada.

2.2) *Colheita de fezes em sapos e lagartos* — Os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico. Após a necropsia todo o material fecal foi removido do tubo intestinal e transportado para frascos contendo salina glicerinada.

3) Isolamento e identificação de enterobactérias

Imediatamente para sapos e lagartos e após seis horas para as serpentes o material fecal foi semeado em MacConkey Agar n.º 3 Oxoid e em Tetrathionate Broth Base-Oxoid e incubado a 37°C. Decorridas 24 horas foram selecionados em Triple Sugar Agar-Oxoid colônias lactose negativas e positivas, provenientes das placas contendo MacConkey Agar n.º 3 Oxoid. Técnica semelhante foi empregada quando da utilização dos meios Brilliant Green Agar Oxoid e S.S. Agar-Oxoid, previamente semeados com o crescimento bacteriano contido em Tetrathionate Broth Base-Oxoid. Em seguida à caracterização em diferentes tribos da família *Enterobacteriaceae* procurou-se identificar as culturas através das técnicas preconizadas por EDWARDS & EWING¹. A identificação sorológica de salmonela foi realizada na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Empregou-se para tanto soros polivalentes somáticos e flagelares, soros grupo-específicos e flagelares tipo-específicos.

RESULTADOS

No Quadro I estão contidas as diferentes enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. Nota-se que o gênero *Citrobacter* fez-se representar pelo maior número de isolamentos (35,3%), seguido de *Proteus vulgaris* (16,4%), *Proteus morganii* (14,4%) e *Proteus rettgeri* (13,0%). Observa-se ainda que com exceção do material obtido de anfíbios (*Bufo paracnemis*), o sucesso no isolamento de *Escherichia coli* foi bastante reduzido, aparecendo esta espécie bacteriana com um total de apenas 6,3% de casos positivos. O gênero *Arizona* foi detectado cinco vezes em serpentes (0,65%), representando o primeiro isolamento do microrganismo em nosso meio, no que diz respeito à animais.

Verifica-se no Quadro II que o gênero *Salmonella* pôde ser revelado em 127 coproculturas, alcançando porcentagem de 20,55% num total de 14 espécies diferentes. O grupo sorológico C predominou com 51,1% destacando-se a *Salmonella takoradi* com isolamento equivalente a 37,0%. Seguiu-se por ordem de prevalência de isolamento do grupo sorológico B com 32,3%, tendo como principais representantes a *Salmonella kaapstad* (18,0%) e *Salmonella typhimurium* (12,0%). Os grupos sorológicos D e E fizeram-se representar por porcentagens correspondentes a 7,9% e 8,7% respectivamente.

A *Salmonella takoradi*, *Salmonella oranienburg*, *Salmonella birkenhead*, *Salmonella litchfield*, *Salmonella kaapstad*, *Salmonella agama* e *Salmonella nchanga*, enquadram-se como sorotipos descritos pela primeira vez em nosso meio, pelo menos no que se refere à animais.

No Quadro III estão relacionados os diferentes espécimes estudados e o número de coproculturas positivas para *Salmonella*. Verifica-se que os lagartos (*Ameiva ameiva*) contribuíram com o maior número de casos positivos, atingindo o valor de 100,0%. Seguiu-se a eles a *Bothrops jararacussu* e a *Bothrops pradoi*, com 47,3% e 36,0% de resultados positivos, respectivamente. De todos os animais estudados os anfíbios (*Bufo paracnemis*) foram os que ofereceram menos sucessos no isolamento de *Salmonella*.

QUADRO I

Número de enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. São Paulo, 1972

Espécies hospedeiras	N.º examinado											
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus morgani</i>	<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Providencia</i>	<i>Arizona</i>
		N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º
<i>Bothrops jararaca</i>	90	5	14	1	39	18	4	22	18	—	—	—
<i>Bothrops moojeni</i>	79	4	4	4	49	16	10	8	6	—	—	1
<i>Bothrops neuwiedi</i>	55	1	—	—	25	9	4	12	8	—	—	1
<i>Bothrops jararacussu</i>	19	—	2	2	7	6	2	7	—	—	—	—
<i>Bothrops alternatus</i>	44	—	—	—	5	3	—	—	1	—	—	—
<i>Bothrops cotiara</i>	24	1	1	1	15	6	—	5	8	—	3	—
<i>Bothrops pradoi</i>	57	5	—	—	26	11	—	5	22	—	—	—
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	119	4	6	8	44	32	—	16	7	—	—	2
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	50	1	5	1	25	8	—	11	5	—	—	1
<i>Ameiva ameiva</i>	25	4	—	11	4	2	—	2	—	—	—	—
<i>Bufo paracnemis</i>	56	21	1	9	15	7	2	16	19	8	—	—
Total	618	46	33	37	254	118	22	104	94	8	3	5

QUADRO II

Número de *Salmonella* isoladas a partir de anfíbios e répteis. São Paulo 1972

	<i>Bothrops jararaca</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Bothrops neuwiedi</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>Bothrops cotiara</i>	<i>Bothrops pradoi</i>	<i>Crotalus d. Collilineatus</i>	<i>Crotalus d. terrificus</i>	<i>Ameiva ameiva</i>	<i>Bufo paracnemis</i>	Grupo sorológico	Total de amostras	%
<i>Salmonella takoradi</i>	4	10	2	7	2	5	5	6	5	—	1	C ₂	47	37,0
<i>Salmonella decatur</i>	1	2	3	—	—	—	—	—	1	3	1	C ₁	11	8,7
<i>Salmonella oranienburg</i>	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	C ₁	2	1,5
<i>Salmonella birkenhead</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	C ₁	2	1,5
<i>Salmonella montevideo</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	C ₁	1	0,8
<i>Salmonella newport</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C ₂	1	0,8
<i>Salmonella litchfield</i>	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C ₂	1	0,8
<i>Salmonella kaapstad</i>	1	5	—	—	1	—	5	—	—	11	—	B	23	18,0
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	—	—	1	—	—	—	5	8	—	—	B	15	12,0
<i>Salmonella agama</i>	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	B	1	0,8
<i>Salmonella derby</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	B	2	1,5
<i>Salmonella sendai</i>	—	2	—	1	—	—	1	1	1	—	—	D	6	4,8
<i>Salmonella panama</i>	—	—	—	—	1	—	3	—	—	—	—	D	4	3,1
<i>Salmonella nchanga</i>	—	3	—	—	—	1	5	—	1	1	—	E ₁	11	8,7
Total	8	23	7	9	4	7	20	7	14	25	3		127	100,0

QUADRO III

Frequência de isolamento de *Salmonella* a partir de anfíbios e répteis. São Paulo, 1972

Espécies hospedeiras	N.º examinado	Positivo (N.º) (%)
<i>Bothrops jararaca</i>	90	8 9,0
<i>Bothrops moojeni</i>	79	23 29,0
<i>Bothrops neuwiedi</i>	55	7 12,8
<i>Bothrops jararacussu</i>	19	9 47,3
<i>Bothrops alternatus</i>	44	4 9,0
<i>Bothrops cotiara</i>	24	7 29,1
<i>Bothrops pradoi</i>	57	20 36,0
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	119	14 11,8
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	50	7 14,0
<i>Ameiva ameiva</i>	25	25 100,0
<i>Bufo paracnemis</i>	56	3 5,3
Total	618	127 20,55

DISCUSSÃO

A análise dos resultados indica que não há variação qualitativa na flora intestinal de anfíbios e répteis, pelo menos no que se refere a família *Enterobacteriaceae*. Autoriza-nos também indicar os animais de sangue frio, particularmente as serpentes e os lagartos, como um dos maiores reservatórios de *Salmonella* encontrados em a natureza.

Verifica-se que a flora predominante fez-se representar por *Citrobacter* (35,3%), seguida de *Proteus vulgaris* (16,4%), *Proteus morgani* (14,4%) e *Proteus rettgeri* (13,0%). Fato curioso foi o pequeno sucesso que obtivemos no isolamento de *Escherichia coli* (6,3%), germe mais comumente encontrado no trato intestinal do homem e de animais. O gênero *Salmonella* apresentou-se com alguns tipos sorológicos ainda não identificados em nosso meio. O encontro da *Salmonella* pôde ser detectado com facilidade através de coprocultura, sendo elevada a porcentagem de isolamento em animais de sangue frio. Acreditamos que este fato tenha levado LINS⁶ a sugerir que os répteis seriam hospedeiros primitivos e naturais de muitos tipos de *Salmonella*, que viveriam em comensalismo ou simbiose com os animais de sangue frio. Embora respeitando a validade de tais informações, torna-se difícil, ao nosso ver, caracterizar em biologia um estado de

comensalismo ou de simbiose, particularmente tratando-se de hospedeiros cujas características fisiológicas são quase que completamente desconhecidas e de um microrganismo com extrema "habilidade" ao parasitismo. Observa-se no presente trabalho, e nos da Autora acima citada, que embora seja alta a porcentagem de isolamento de *Salmonella*, nem todos os espécimes estudados apresentaram-se como portadores, indicando com isto não tratar-se de flora constante. O aspecto paradoxal de se encontrar *Salmonella* em animais de sangue frio, sem que estes apresentem manifestações clínicas aparentes, poderia ser justificado pela incapacidade do microrganismo em encontrar nesses hospedeiros condições metabólicas ideais para instalar o processo infeccioso. Este fenômeno decorreria da alta resistência desses hospedeiros ao agente infeccioso e da baixa temperatura corpórea apresentada pelos animais de sangue frio, fatos que incapacitariam a implantação do microrganismo no organismo do hospedeiro (dados não publicados). Fato inusitado em nosso meio, relativamente à animais foi o encontro de cinco amostras de *Arizona* (0,65%). Como sabemos este grupo e o grupo *Salmonella* representam agentes potencialmente infecciosos para o homem, enquadrando-se, portanto, os animais de sangue frio como importantes reservatórios desses microrganismos para a espécie humana.

SUMMARY

Enteric bacteria isolated from reptiles and amphibians

The Authors studied 618 specimens of cold-blooded animals, comprising: 90 *Bothrops jararaca*; 79 *Bothrops moojenii*; 55 *Bothrops neuwiedi*; 19 *Bothrops jararacussu*; 119 *Crotalus durissus terrificus*; 50 *Crotalus durissus collilineatus*; 44 *Bothrops alternatus*; 24 *Bothrops cotiara*; 57 *Bothrops pradoi*; 25 *Ameiva ameiva* and 56 *Bufo paracnemis*. The results obtained are able to show the predominance of *Citrobacter* (35.3%), followed by *Proteus vulgaris* (16.4%), *Proteus morgani* (14.4%) and *Proteus rettgeri* (13.0%). The *Salmonella* group with a total of 127 strains recovered from these animals, was represented by 14 different species and also

by some other serotypes that appear not yet to have been described in Brazil. Finally, it was possible the isolation of 5 strains of *Arizona* (0.65%), exclusively from snakes. Considerations are made about the behaviour of the cold blooded animals, particularly the snakes and wild lizards, as the greatest reservoirs of *Salmonella* encountered in nature.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EDWARDS, P. R. & EWING, H. W. — *Identification of Enterobacteriaceae*. Atlanta, Georgia, Burgess Publishing Company, 1967.
2. HINSHAW, W. R. & E. McNEIL — Lizards carriers of *Salmonella* and *Paracolon* bacteria. *J. Bact.* 53:715-718, 1947.
3. KOURANY, M.; MYRES, C. W. & SCHNEIDER, C. R. — Panamanian amphibians and reptiles and carriers of *Salmonella*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 19:632-638, 1970.
4. LE NOC, P. & E. R. BRYGOO — Les Salmonelles des camaleons de Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur (Paris)* 30:93-104, 1962.
5. LINS, Z. C. — Ocorrência do gênero *Salmonella* em animais silvestres capturados na floresta amazônica. *An. Microbiol.* 12:19-29, 1964.
6. LINS, Z. C. — Studies on enteric bacterias in the lower Amazon region: II *Salmonella* types isolated from wild reptiles in Pará State, Brazil. *Rev. Microbiol.* 2:165-169, 1971.
7. ZWART, D. — Notes on *Salmonella* infections in animals in Ghana. *Res. Vet. Sci. (London)* 3:460-469, 1962.

Recebido para publicação em 3/10/1972.