

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**DOENÇAS BACTERIANAS EM SERPENTES DE CATIVEIRO (*Bothrops alternatus*,
Bothrops jararaca E *Bothrops pubescens*) NO RIO GRANDE DO SUL,
DIAGNOSTICADAS PELO SETOR DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (SPV-UFRGS)**

Camila de Ávila Pietzsch

Porto Alegre

2015/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

Doenças bacterianas em serpentes de cativeiro (*Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops pubescens*) no Rio Grande do Sul, diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS)

Autor: Camila de Ávila Pietzsch

Orientador: Prof. Dra. Luciana Sonne

Coorientador (a): Méd. Vet. Gabriela Fredo

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial de para a obtenção da Graduação em Medicina Veterinária

Porto Alegre

2015/2

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Werner e Cláudia e ao meu irmão Diego por estarem sempre presentes durante esses anos, me apoiando e incentivando para a realização dessa conquista. Vocês são a minha base e a minha motivação para contornar todos os obstáculos. Amo muito vocês.

A minha orientadora, Luciana Sonne, por ter aceitado me orientar, pela ajuda com a realização deste trabalho e pelas oportunidades e aprendizagem oferecidas durante meu tempo de estágio no SPV-UFRGS.

A minha coorientadora e amiga, Gabriela Fredo, pelo apoio, paciência, ensinamentos e risadas. Obrigada por me incentivar nos estudos dos animais silvestres e por sempre querer o meu melhor.

A Acácia e a Fundação Zoobotânica por terem cedido o material para realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Mário Alberto por todo amor, carinho, ajuda e mimos. Obrigada por estar ao meu lado nas madrugadas de estudos, nos momentos difíceis e por escutar todas as minhas histórias da faculdade.

Aos meus avós Alírio, Solange, Arthur (*in memorial*) e Olga (*in memorial*) pelo amor que sempre recebi.

As minhas queridas tias, de sangue e de coração, por todas as palavras de incentivo e por todo o carinho.

Aos meus tios e as minhas primas pelo carinho.

As minhas amigas que fiz durante a faculdade, principalmente a Monalisa e a Michelle, que desde o início estão ao meu lado, me apoiando, incentivando e aconselhando. Aos antigos amigos por todas as palavras amigas, incentivo e compreensão nos momentos ausentes.

A Laura Goltz, pelas oportunidades e ensinamentos. Pela ajuda em um dos momentos mais difíceis e por nunca desistir.

Aos professores, residentes, mestrando, doutorandos, técnicos, estagiários e funcionários do SPV-UFRGS pelo convívio diário e por todos os ensinamentos.

Aos veterinários, médicos, biólogos, farmacêuticos, funcionários e colegas (citianos) do CIT-RS pelos ensinamentos, e em especial à Maria da Graça Boucinha, por todo o carinho, aprendizado e por ter despertado meu interesse pelas serpentes.

A Pita, Sofi e Pith (*in memorial*), por todo amor e por me darem a certeza que estou no caminho certo.

Minhas lágrimas ao final do texto evidenciam todo o carinho e reconhecimento que tenho por vocês.

RESUMO

O gênero *Bothrops* é representado por serpentes peçonhentas que são endêmicas na América Central e América do Sul. Por serem animais peçonhentos e possuírem um aparato especializado para inocular a peçonha, esses animais são de grande importância para a saúde pública. Por esse motivo existem diversos serpentários no Brasil para extração de veneno para posterior produção de soro antiofídico. Doenças bacterianas são comuns e importantes em serpentes de cativeiro. Devido ao estresse dos animais em cativeiro muitas vezes ocorre imunossupressão e subsequente predisposição a infecções. Dessa forma, com intuito de gerar dados epidemiológicos, clínicos e patológicos fidedignos da região foi realizado um levantamento no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul de dados entre dezembro de 2014 a dezembro de 2015 em busca de diagnósticos de doenças bacterianas em serpentes. Os casos foram selecionados pelo diagnóstico em conjunto com o isolamento bacteriano e avaliados quanto à espécie, sexo, comprimento dos espécimes, alterações macroscópicas e microscópicas. A espécie mais afetada foi a *Bothrops pubescens* (5/10). Fêmeas foram mais afetadas do que machos, e em relação a biometria, essas apresentaram maior comprimento. Os diagnósticos anatomo-patológicos foram estomatite, enterite e hepatite granulomatosa com três casos cada, seguido por osteomielite e septicemia com dois casos cada e colite ulcerativa e pericardite com um caso cada. A bactéria mais isolada de lesões foi a *Salmonella* sp., seguida por *Morganella morganii*, duas espécies do gênero *Providencia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Proteus vulgaris*.

Palavras-chave: Doenças bacterianas de serpentes. *Bothrops*. Histopatologia. Réptil.

ABSTRACT

Bothrops is represented by poisonous snakes that are endemic in Central and South America. For being poisonous animals and possess a specialized apparatus to inoculate the venom, these animals are of great importance to public health. For this reason there are many serpent sanctuaries in Brazil for poison extraction for subsequent production of antivenom. Bacterial diseases are common and important in captive snakes. Due to the stress of animals in captivity often occurs subsequent immunosuppression and predisposition to infections. Thus, aiming to generate epidemiological data, reliable clinical and pathological region a survey was conducted in the Pathology Sector Veterinary of the Federal University of Rio Grande do Sul data from December 2014 to December 2015 in search of bacterial diseases diagnostics serpents. The cases were selected by the diagnosis in conjunction with bacterial isolation and evaluated as the species, sex, length of specimens, macroscopic and microscopic changes. The most affected species was the *Bothrops pubescens*. Females were more affected than males, and in relation to biometrics, showed greater length. The anatomical and pathological diagnoses were stomatitis, enteritis and granulomatous hepatitis with three cases each, followed by septicemia and osteomyelitis with two cases each and ulcerative colitis and pericarditis with one case each. The more bacteria isolated lesions was *Salmonella* sp., Followed by *Morganella morganii*, two species of the genus *Providencia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Proteus vulgaris*.

Keywords: Bacterial diseases of snakes. *Bothrops*. Histopathology. Reptile.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de espécie, sexo, idade e comprimento das serpentes diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).	11
Tabela 2. Frequência das características clínicas e patológicas de doenças bacterianas em serpentes de cativeiro diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).....	12
Tabela 3. Frequência dos isolamentos bacterianos em serpentes de cativeiro diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).	14

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 Amostras.....	9
2.2 Necropsias e Análises Histopatológicas	9
2.3 Exames Bacteriológicos.....	9
2.4 Colorações especiais de Técnicas de histoquímica	10
2.5 Imuno-histoquímica	10
3 RESULTADOS.....	11
4 DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

Serpentes são animais vertebrados pertencentes à Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Ophidia (BELUCCI *et al.*, 2008), que conta com aproximadamente 2.900 espécies (JACOBSON, 2007).

No Brasil a fauna de serpentes é composta por uma média de 380 espécies, referentes a 9 famílias (AGUIAR, 2014). Aproximadamente 15% são peçonhentas e pertencem à família Viperidae, com 28 espécies descritas, estas responsáveis pela maior quantidade de acidentes ofídicos no Brasil (*Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*), e à família Elapidae (CAMPAGNER, 2011).

As famílias de maior interesse em cativeiro no Brasil são: Boidae (cobra-papagaio, sucuri, jiboia, salamanta), Colubridae (falsas corais cobra d'água e serpentes exóticas), Viperidae (cascavel, surucucu e jararacas), Elapidae (corais verdadeiras) e a família exótica Pitonidae (pítons) (ZUG, 2001; KOLESNIKOVAS, 2014).

A família *Viperidae*, também chamada de víboras, com cerca de 170 espécies distribuídas pelo mundo, apresentam a cabeça triangular, fossetas loreais, cauda sem maiores modificações, escamas subcaudas em pares e aparelho inoculador do tipo solenóglifo. Correspondem as serpentes peçonhentas, pois possuem glândulas que produzem uma substância tóxica e são capazes de inocular através de um aparato especializado (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014).

Dentre uma das causas de mortalidade destas espécies de serpentes cativas estão as doenças infecciosas bacterianas (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014). Apesar da extensa experiência que os centros e os institutos possuem na manutenção dessas serpentes em cativeiro, a mortalidade ainda é considerada elevada, estando provavelmente relacionada ao estresse causado pelas dificuldades de se adaptarem ao ambiente cativo (COSTA, 2005; MELGAREJO-GIMENEZ, 2006).

Além disso, condições inadequadas de cativeiro, nutrição deficiente e más condições sanitárias podem direta ou indiretamente, por meio da imunossupressão promovida pelo estresse, levar a instalação de bactérias (CAMPAGNER, 2011).

As doenças bacterianas normalmente envolvem os bacilos gram-negativo destacando-se as infecções causadas por *Salmonella* sp. (SOUZA *et al.* 2014; JACOBSON, 2007), *Aeromonas hydrophila* (ESTERABADI, *et al.*, 1973), *Pseudomonas* sp.(CALIXTO, 1986; SERAPICOS *et al.*, 2005; JACOBSON, 2007). Esses agentes normalmente são oportunistas e

constituintes da flora intestinal ou oral normal (OLIVEIRA, 2003). Todavia, organismos comensais têm o potencial de se reproduzirem sem controle em animais com um sistema imunológico comprometido, e assim ocasionando doença (CHINNADURAI; DEVOE, 2009). Os bastonetes gram-negativos estão envolvidos em processos infecciosos cutâneos, pulmonares, orais, gastroentéricos e generalizados, além de vislumbrar a ocorrência de abscessos (CAMPAGNER, 2011). Eventualmente agentes gram-positivas são isolados, principalmente *Streptococcus* sp. (SERAPICOS *et al.*, 2005) e *Staphylococcus* sp. (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo o estudo de frequência, achados macroscópicos e microscópicos das infecções bacterianas em serpentes dos gêneros *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops pubescens* diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) associados ao isolamento microbiano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Os espécimes foram provenientes de serpentários localizados no estado do Rio Grande do Sul, dois destes situados na cidade capital (Porto Alegre) e um na região Norte do estado (Passo Fundo). Todos os animais morreram naturalmente. Dados gerais, como espécie, procedência (coordenadas do resgate na fauna), sexo e históricos clínicos foram registrados e posteriormente analisados.

2.2 Necropsias e Análises Histopatológicas

Foram realizadas necropsias das serpentes no período de dezembro de 2014 a dezembro de 2015 no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Durante as necropsias foram coletados fragmentos de diversos órgãos, sendo esses posteriormente fixados em formalina tamponada 10%, processados, emblocados em parafina, cortados em 3µm de espessura em micrótomo e corados rotineiramente por hematoxilina e eosina (H&E).

2.3 Exames Bacteriológicos

O material para análise microbiológica foi coletado durante o exame de necropsia e posteriormente enviado para cultivo bacteriológico, sendo essas amostras selecionadas a partir de alterações macroscópicas visualizadas na necropsia. Os fragmentos foram submetidos a cultivo bacteriano aeróbio em meio ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro e ágar MacConkey. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 24-72 horas. Realizou-se também pesquisa de *Salmonella* sp. Nas amostras utilizou-se para o enriquecimento seletivo o caldo Rappaport-Vassiliadis, incubado a 42°C por 24 horas. Após as amostras foram plaqueadas em meio ágar Hektoen e incubadas a 37°C durante 48 horas. A identificação dos isolados foi realizada pela caracterização do perfil bioquímico de acordo com Markey, *et al.* Para a confirmação final foi realizada a prova de soroaglutinação com antissoro polivalente somático.

2.5 Colorações especiais de histoquímica

Através de segmentos teciduais selecionados, foi realizada a técnica histoquímica de coloração de Gram (Brown-Hopps), para evidenciar e diferenciar bactérias gram-negativas e gram-positivas. A técnica foi realizada de acordo com Arrington (1992).

2.6 Imuno-histoquímica

Amostra de um caso específico foi submetida à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) anti-*Salmonella* pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos em uma solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 volumes) em metanol durante 10 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se Protease XIV (Sigma) por 15 minutos em temperatura ambiente. Incubou-se com anticorpo primário anti-*Salmonella* policlonal (Biogenesis) diluído 1:1000 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em uma câmara úmida por 14-16 horas (*overnight*) a 4°C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation) por 20 minutos em cada etapa. O cromógeno utilizado para a revelação foi 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, K3469) e hematoxilina de Mayer na contracoloração. Como controle positivo foi utilizado intestino de suíno positivo para *Salmonella*.

3 RESULTADOS

Durante o período de dezembro de 2014 a dezembro de 2015, o SPV-UFRGS recebeu 22 serpentes para realização do exame de necropsia. Em 10 estabeleceu-se o diagnóstico de doenças bacterianas através dos achados macroscópicos, microscópicos, isolamento microbiológico, técnicas auxiliares de histoquímica e imuno-histoquímica. Todos os animais eram adultos e 45% (10/22) desses foram susceptíveis as infecções bacterianas.

Dentre as 10 espécies de serpentes nos quais foi realizada a necropsia, a espécie *Bothrops pubescens* representou o maior número com cinco espécimes (50%), seguido por *Bothrops jararaca* com três (30%) e dois espécimes de *Bothrops alternatus* (20%). As fêmeas foram mais frequentes quando comparada aos espécimes machos. Além disso, na biometria as fêmeas apresentaram um maior comprimento, sendo que a média das fêmeas foi de 97 cm e os machos 84 cm. Em relação à espécie, *Bothrops jararaca* apresentou um maior comprimento, sendo que a média foi de 101 cm, seguido por *Bothrops alternatus* com média de 92 cm e *Bothrops pubescens* com média de 86 cm. Os dados sobre a biometria, sexo, idade e procedência do animal estão na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de espécie, sexo, idade e comprimento das serpentes diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

N	Espécie	Sexo	Idade	Comprimento (cm)
1	<i>Bothrops pubescens</i>	M	Adulto	84
2	<i>Bothrops pubescens</i>	F	Adulto	83
3	<i>Bothrops pubescens</i>	F	Adulto	109
4	<i>Bothrops pubescens</i>	M	Adulto	72
5	<i>Bothrops pubescens</i>	M	Adulto	86
6	<i>Bothrops jararaca</i>	F	Adulto	91
7	<i>Bothrops jararaca</i>	F	Adulto	123
8	<i>Bothrops jararaca</i>	F	Adulto	89
9	<i>Bothrops alternatus</i>	M	Adulto	95
10	<i>Bothrops alternatus</i>	F	Adulto	89

N: número do caso. M: macho, F: fêmeas.

O principal sinal clínico foi regurgitação após o oferecimento das presas em 3 casos (3/10). Em relação ao estado corporal, 50% dos animais apresentaram estado corporal ruim. Na Tabela 2 estão evidenciadas as doenças associadas aos sinais clínicos e estado corpóreo de cada espécime.

Tabela 2. Frequência das características clínicas e patológicas de doenças bacterianas em serpentes de cativeiro diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

N	DIAGNÓSTICO	SINAIS CLÍNICOS	ESTADO CORPÓREO
1	Estomatite necrótica	-	Regular
2	Septicemia – Osteomielite	-	Bom
3	Estomatite	-	Bom
4	Enterite – Hepatite granulomatosa	-	Ruim
5	Enterite necrótica / Hepatite	Regurgitação	Ruim
6	Septicemia	NI	Regular
7	Hepatite	Regurgitação	Ruim
8	Pericardite / Enterite	Regurgitação	Regular
9	Osteomielite	NI	Ruim
10	Estomatite / Colite ulcerativa	-	Ruim

N: número do caso. NI: não informado. – nenhum sinal clínico

Os achados patológicos mais frequentes foram estomatite, enterite e hepatite com três casos cada, seguido por osteomielite e septicemia diagnosticados em dois casos cada. Em menor número, colite ulcerativa e pericardite foram diagnosticados em apenas um caso cada. Os achados patológicos foram maiores do que os números de serpentes devido que alguns espécimes apresentaram mais que uma infecção.

Na macroscopia os achados observados na cavidade oral foram mucosas pálidas (6/10), hiperêmicas (3/10) e edemaciadas (2/10). No fígado foram encontradas áreas

nodulares, friáveis de coloração que variou do branco ao amarelado (4/10). Destes 50% (2/4) tiveram diagnóstico de hepatite (serpentes 5 e 7) e 25% (1/4) de septicemia (serpente 6). Nos dois casos de osteomielite (serpentes 2 e 9) foram evidenciados múltiplos nódulos branco-amarelados medindo de 1 a 4 cm de diâmetro dispostos ao longo da coluna vertebral.

No intestino grosso da serpente 10 foi observado a avermelhamento da serosa e conteúdo firme (fezes ressecadas-fecaloma). Além destes achados, na serpente 8, havia intensa deposição de fibrina recobrimdo o saco pericárdico, estendendo-se até o epicárdio.

Os achados histológicos encontrados nos casos de estomatite (serpentes 1, 3 e 10) foram hemorragia, intenso infiltrado de heterófilos, macrófagos e linfócitos. Ainda foi observado na serpente 1, necrose de fibras musculares, e na serpente 3 foi observado bactérias bacilares na superfície da mucosa oral.

Nos casos de enterite (serpentes 4, 5 e 8) evidenciaram-se formações de granulomas contendo no seu interior estruturas cocóides basofílicas (serpente 4). Estruturas estas que no espécime 5 estavam recobrimdo a mucosa, que apresentava ainda acentuada necrose de epitélio superficial e infiltrado de linfócitos e plasmócitos. No intestino da serpente 8 havia miríades bacterianas cocobacilares na luz do intestino e necrose na mucosa intestinal e infiltrado de macrófagos.

Na serpente 10, no qual teve como diagnóstico colite foi evidenciado no intestino delgado necrose no epitélio intestinal estruturas cocóides basofílicas em mucosa com infiltrado de linfócitos heterófilos em submucosa. O intestino grosso apresentava congestão da mucosa e submucosa com extensas áreas de ulceração, infiltrado de heterófilos e linfócitos além de miríades bacterianas cocobacilares.

Hepatite foi diagnosticada em três serpentes (4, 5 e 7). Nos três casos se observava estruturas cocóides basofílicas distribuídas de forma aleatória, e 2 destes continham também áreas centrais de mineralização circundados por macrófagos e por tecido conjuntivo fibroso (granulomas) e infiltrado de heterófilos. Dois casos (4 e 5) foram observadas bactérias gram-negativas através da coloração de Gram.

Nos dois casos de osteomielites (serpentes 2 e 9) foram observadas miríades bacterianas cocobacilares e infiltrado de heterófilos, linfócitos e macrófagos. No caso 9 foi evidenciado osteoclastos próximo a trabéculas ósseas com severas áreas multifocais de lise óssea, diminuição da mineralização e proliferação de tecido conjuntivo.

Dois casos foram de septicemia (serpentes 2 e 6). Ao analisar as vértebras da serpente 2 foram observadas miríades bacterianas cocobacilares no interior de macrófagos. O fígado apresentava granulomas eosinofílicos. A serpente 6 apresentava no fígado necrose, infiltrado de heterófilos e miríades bacterinas, estas também observadas em trombos dentro de vasos e no coração.

No diagnóstico de pericardite (serpente 8) foram evidenciadas miríades bacterianas cocobacilares com deposição de fibrina no pericárdio. Além disso, observou infiltrado constituído de heterófilos e macrófagos.

A partir do cultivo bacteriano isolou-se *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, duas espécies do gênero *Providencia*, *Yersinia enterocolitica*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus* sp., *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp. O principal agente envolvido nas mortes das serpentes relatadas foi a *Salmonella* spp., representando 40% dos casos (4/10), sendo um caso de osteomielite, um de septicemia, um de hepatite e um espécime com pericardite. A frequência do isolamento bacteriano de acordo com o diagnóstico patológico e o material enviado para cultivo encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência dos isolamentos bacterianos em serpentes de cativeiro diagnosticadas pelo Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS			
N	Doenças Bacterianas	Material encaminhado	Isolamento Microbiológico
1	Estomatite necrótica	Mucosa oral	<i>Pseudomonas</i> Coluna: <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>Morganella morganii</i> / <i>Staphylococcus</i> Fígado: <i>Yersinia enterocolitica</i>
2	Septicemia /Osteomielite	Coluna / Fígado	<i>Morganella morganii</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.
3	Estomatite	Fígado	<i>Morganella morganii</i>
4	Enterite / Hepatite granulomatosa	Fígado	<i>Morganella morganii</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.
5	Enterite necrótica / Hepatite	Fígado- bile	<i>Proteus vulgaris</i>
6	Septicemia	Fígado	<i>Salmonella</i> sp.
7	Hepatite	Fígado	<i>Salmonella</i> sp.

8	Pericardite / Enterite	Coração / Saco pericárdico Fígado Pulmão	Pericárdio e fígado: <i>Salmonella</i> sp.
9	Osteomielite	Coluna	<i>Salmonella</i> serovar. <i>Typhimurium</i>
10	Estomatite / Colite ulcerativa	Intestino / cavidade oral	Intestino e cavidade oral: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Proteus</i> sp.

N: número do caso.

4 DISCUSSÃO

Todas as serpentes deste estudo eram provenientes de ambientes cativos, onde eram mantidos em caixas de polipropileno ou de fibra de vidro e acondicionados em estantes. A temperatura interna da caixa é permanentemente constante, a ventilação é inadequada e as serpentes ficam em contato com suas próprias fezes e de suas presas. A manutenção dessas caixas é realizada frequentemente para proporcionar um ambiente adequado para o animal. Todavia, esse regime apresenta inúmeros agentes estressantes que podem proporcionar supressão imunológica, o que gera infecções oportunistas (CAMPAGNER, 2011). Todos os isolados bacterianos presentes neste estudo são constituintes da flora bacteriana normal de serpentes. Todavia nesses animais os mesmos foram observados concomitantes e associados a lesões. Segundo Cowan (1968), são diversos os fatores predisponentes relacionados as infecções bacterianas em serpentes cativas, entre eles estão, o manejo de extração frequente de veneno para a produção de soros antiofídicos, o habitat não natural, a convivência com outras serpentes no mesmo recinto. Grego (2001) complementa que a imunossupressão muitas vezes está associada com o estresse do cativo e acomodações inadequadas. Neste trabalho, algumas serpentes conviviam com outras no mesmo recinto, e raramente era realizada a extração da peçonha, porém todas eram manejadas frequentemente.

Em relação à espécie, *Bothrops pubescens* foi a mais frequente com 50% dos espécimes necropsiados, todavia Grazziotin (2004) em seu estudo afirma que dentro do gênero *Bothrops* a espécie *Bothrops jararaca* é frequentemente a mais abundante nas áreas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste.

A média do comprimento das fêmeas em relação a média do comprimento dos machos variou em 13 cm. Segundo Borges-Martins (2007), fêmeas alcançam maior comprimento que machos. Embora machos e fêmeas nasçam com o mesmo tamanho, podem apresentar taxas de crescimento e a idade da maturação sexual diferentes, demonstrando dimorfismo sexual em estágios posteriores da vida (SHINE, 1990). Estudos sobre dimorfismo sexual realizados com indivíduos de Colubridae e Dipsadidae revelaram maior comprimento rostro-cloacal em fêmeas (SHINE, 1994; JORDÃO; BIZERRA, 1996) e maior comprimento de cauda em machos (KLAUBER, 1943; CLARK, 1966; KING, 1989; SANTOS JR; RIBEIRO, 2005). Geralmente as fêmeas apresentam maior comprimento total que os machos, o que pode estar relacionado com seu sucesso reprodutivo (SEMLITSCH; GIBBONS, 1982; SHINE, 1994; ZUG, 2001). Em relação às espécies, as fêmeas de *Bothrops pubescens* podem atingir cerca

de 130 cm de comprimento, enquanto os machos atingem aproximadamente 95 cm (HARTMANN *et al.* 2005), estando de acordo com os resultados encontrados. *Bothrops alternatus* nesse estudo variou de 89 a 85 cm. De acordo com Campbell e Lamar (2004), essas serpentes são de grande porte e atingem até 170 cm. Segundo Grazziotin (2004), *Bothrops jararaca* possui em média 120 cm de comprimento, podendo chegar a 160 cm, diferente em nosso estudo em que a média foi 101 cm.

Segundo Frye (1991), em répteis as doenças mais comuns causadas por bactérias são os abscessos, piogranulomas, pneumonia, dermatites e estomatites, diferente dos achados neste estudo que foram, além da estomatite, a enterite e a hepatite com a frequência de 20% cada.

De acordo com Rosenthal e Mader (2006), antigamente pensava-se que a *Salmonella* encontrada em répteis não era patogênica aos hospedeiros, todavia atualmente está frequentemente associada aos casos severos de osteomielite vertebral, patologia também encontrada em neste estudo. Além de osteomielite, *Salmonella* já é descrita sendo um importante agente causador de lesões diftéricas em répteis de cativeiro (GEUE, 2012), como a gastrite necrosante (*Lichanura trivirgata*) (MITCHELL, 2006), traqueite necrosante em uma *Lampropeltis hondurensis* (OROS, 1996), septicemia em três *Boa constrictors* (BOEVER, 1976). E em algumas serpentes tem se observado hepatite granulomatosa, ooforites, orquite, e enterite fibrinonecrótica (RAMSAY, 2006). Souza *et al.*, 2014, relatam um caso de osteomielite causada por *Salmonella entérica* serovar *derby* em uma *Boa constrictor*, na qual apresentava as mesmas lesões na coluna vertebral encontradas neste estudo, todavia neste estudo o isolado bacteriano foi *Salmonella* subsp *entérica* ser *Thyphimurium*.

Concordando com Ramsay (2006) e Campagner (2011), observamos um caso de hepatite, em uma *Bothrops jararaca*, onde isolou-se *Salmonella* sp. Schillinger (2003) em seu estudo associou a *Salmonella enterica arizonae* causando doença sistêmica granulomatosa associada à pericardite fibrinonecrótica em uma *Acrantophis dumerili*. Neste estudo, houve um diagnóstico de pericardite por *Salmonella* sp. em uma *Bothrops jararaca*. *Salmonella* é mais comumente transferida entre répteis por contato com fezes contaminadas de outros répteis. Ingestão de presas e água contaminadas também pode ser um fato (BASTOS, 2012). Onderka e Finlayson (1985) descrevem *Salmonella* causando quadro septicêmico em serpentes gerando hepatite associada à granulomas, o mesmo observado neste estudo.

Nos casos de estomatite (3/10), houve isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* na cavidade oral e um deste associado a *E. coli*. De acordo com Rosenthal e Mader (2006), a

Pseudomonas aeruginosa e *E. coli* comumente fazem parte da flora normal do trato intestinal e da cavidade oral dos répteis. Entretanto, situações de superpopulação, má nutrição, traumatismo e temperatura inadequada, podem predispor estomatite infecciosa causada por esses agentes (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014). Nos casos mais graves pode ocorrer perda de dentes (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS 2014), o que foi observado em um caso onde a espécime estava sem as presas. Segundo Ellie *et al.* (1981), *Aeromonas hydrophila*, está frequentemente associada a lesões de estomatites ulcerativas em serpentes. Todavia, neste estudo não se obteve o isolamento desta bactéria. No estudo realizado por Campagner (2011), os micro-organismos mais isolados na cavidade oral de serpentes foram as bactérias *Morganella morganii* e a *Pseudomonas aeruginosa*. Além do isolamento bacteriano as serpentes apresentavam macroscopicamente edema e hiperemia na mucosa, também descritas por Funk (2006).

Neste trabalho, um dos casos de estomatite também estava associado a bactérias do gênero *Providencia*. Segundo Rosenthal e Mader (2006), esses micro-organismos também são considerados como flora normal da cavidade oral de serpentes, entretanto podem ser causa de inúmeras infecções, incluindo estomatites de maneira oportunista (ELLIE *et al.*, 1981). De acordo com Campagner (2011), as espécies do gênero *Proteus* também são consideradas como microbiota normal da cavidade oral, peçonha e cavidade cloacal, mas normalmente são associadas, infecções respiratórias, lesões de escamas e estomatites. *Proteus* sp., neste estudo, também foi relacionado a um quadro de estomatite. Entretanto, diferente do que está na literatura, foi diagnosticado neste estudo um quadro de hepatite em que foi isolado *Proteus vulgaris* como único agente patológico.

A enterobactéria *Morganella morganii* é amplamente encontrada no ambiente, no trato intestinal do homem e outros mamíferos. Em répteis, apesar de considerada como microbiota normal (VALSAN; RAO; SATHIAVATHY, 2008), há relatos de isolamentos de *Morganella morganii* em serpentes e crocodilianos com pneumonia e estomatites ulcerativas (CAMPAGNER, 2011.). Neste trabalho, *Morganella morganii* foi associado a um quadro de hepatite granulomatosa. Em um dos casos, *Morganella morganii* foi isolado no fígado de uma serpente, todavia foi observado apenas degeneração hepática. *Morganella morganii* é uma bactéria móvel, presente na flora normal do intestino (HOLT; *et al.*, 1994). Devido ao tempo da morte da serpente até o resfriamento da mesma, a bactéria pode ter se movimentado através do colédoco para o fígado.

A contaminação por *Yersinia enterocolitica*, normalmente ocorre devido de água e alimentos contaminados (FALCÃO; FALCÃO, 2006). Dados epidemiológicos mostraram que a infecção ocorre em roedores, na maioria das vezes, na forma subclínica (MOLLARET, 1995). Todos os animais deste trabalho eram alimentados por roedores. Neste estudo, *Yersinia enterocolitica* foi isolada de um quadro de osteomielite e septicemia. Segundo Rosenthal e Mader (2006), o fluxo sanguíneo presente na região dos discos intervertebrais tem sido sugerido a promover dispersão de bactérias ocasionando uma septicemia. O mesmo pode ter ocorrido com uma infecção primária nos discos vertebrais por *Yersinia enterocolitica* havendo a disseminação para o sangue e outros tecidos.

Staphylococcus sp., também é considerado constituindo normal de escamas e cavidade oral de répteis. Todavia, de acordo com Rosenthal e Mader (2006), *Staphylococcus* sp. pode estar associado a quadros patológicos de estomatites e necroses de escamas em quelônios, quando acompanhados de outras bactérias, principalmente gram-negativas. Neste estudo, se isolou *Staphylococcus* sp. juntamente com bactérias gram-negativas em um quadro patológico de osteomielite e outro de hepatite granulomatosa.

5 CONCLUSÃO

- As espécies *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops pubescens* foram afetadas por infecções bacterianas.
- Os espécimes fêmeas foram mais frequentes e apresentaram maior comprimento médio.
- Estomatite, enterite e hepatite granulomatosa foram as doenças mais diagnosticadas. Essas patologias foram associadas às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Proteus* sp. e *Salmonella* sp.
- *Salmonella* sp. foi a bactéria mais isolada das lesões, nesses casos associada com os diagnósticos patológicos de osteomielite, septicemia, hepatite e pericardite.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.S. **Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde, 2014. 79 f.
- ARRINGTON, J. B. Bacteria, fungi and other microorganisms. In: PROPHET, E. B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. 1 ed. Washington: D. C.; 1992, cap. 21, p. 221-222.
- BASTOS, H. M. *et al.* Prevalence of enterobacteria in *Bothrops jararaca* in São Paulo State: microbiological survey and antimicrobial resistance standards. **Acta scientiarum biological sciences**. Maringá, v. 30, n. 3, p. 321-326, 2008.
- BELUCCI, M. P. *et al.* Acidentes ofídicos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano 6, n.10, jan. 2008.
- BOEVER, W. J.; WILLIAMS, J. Arizona septicemia in three boa constrictors. **Veterinary medicine small animal clinic**, 1975; v. 70, n 11, p. 1357-1359.
- BORGES-MARTINS, M.*et al.* Répteis. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.) Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília. p. 292-315, 2007.
- CAMPAGNER, M. V. **Manejo de serpentes em cativeiro: manejo clínico-sanitário e avaliação da microbiota**. Tese (doutorado) em Doenças Tropicais - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 196 f. 2011.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. Lanceheads, Genus *Bothrops* Wagler, 1824. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**, New York, Cornell University Press. p. 334-409; 2004.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. Cornell University Press, Ithaca. 6. ed., p. 425; 1989.
- CHINNADURAI, S. K.; DEVOE, R. S. Selected Infectious Diseases of Reptiles. **Veterinary clinics of North America: exotic animal practice**, v.12, n. 3, p. 583-596, 2009.
- COSTA, A.C.O.R. *et al.* Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I. A longevidade dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. **Avulsas do Instituto Pau Brasil**, n. 8-9, p. 63-68, dez. 2015.
- COWAN, D.F. Adaptation, maladaptation and disease. In: MURPHY, J.B. **Reproductive biology and diseases of captive reptiles**. Lawrence, Society for the Study of Amphibi Lawrence, Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1980, p. 191-196.
- COWAN, D.F. Diseases of captive reptiles. **Journal american veterinary in medical association**, v. 153, n.7, p. 848-859, 1968.

- ELLIE J. C. *et al.* Aerobic Bacterial Oral Flora of Garter Snakes: Development of Normal Flora and Pathogenic Potential for Snakes and Humans. **Journal of clinical microbiology**. May 1981, v. 13, n. 5, p. 954-956.
- FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 27, n.1, p. 9-19, 2006.
- FRYE, F. L. **Reptile Care, an atlas of diseases and treatments**. T.F.H. Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, 1991, v. 1-2.
- GEUE, L.; LOSCHNER, U. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. **Veterinary Microbiology**. v.84, p. 79–91, 2012.
- GRAZZIOTIN, F. G. **Estudo filogeográfico de *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) baseado no DNA mitocondrial (Squamata: Serpentes: Viperidae)**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004. 56 f.
- GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. R.; KOLESNIKOVAS, C. K. M. Squamata (Serpentes). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: editora Roca, 2014, cap. 15, p. 186-218.
- GREGO, K.F. Ophidia – Restraint, Anesthesia, Medicine. In: FOWLER, D. M. V; MURRAY, E. **Biology, medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State University Press, 2001, p. 43- 50.
- HARTMANN, M. T. *et al.* Feeding Habits and Habitat Use in *Bothrops pubescens* (Viperidae, Crotalinae) from Southern Brazil. **Journal of herpetology**, v. 39, n. 4, p. 664–667, 2005.
- HOLT, J. G., *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, cap. 5, p. 183.
- JACOBSON, E.R. Bacterial diseases of reptiles. In: JACOBSON, E.R. **Infectious diseases and pathology of reptiles. Color atlas and text**. 1 ed. Florida: CRC Press; 2007, cap. 10, p. 461-526.
- MARKEY, B. *et al.* **Clinical veterinary microbiology**. Elsevier Health Sciences; 2013.
- MATIAS, N. R. *et al.* Variação morfométrica em *Bothropoides jararaca* (Serpentes, Viperidae) no Rio Grande do Sul. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, 2011, v.101, n.4, p. 275-282.
- MITCHELL, M.A. *Salmonella: diagnostic methods for reptiles*. In: MADER, D.R. Reptile medicine and surgery. 2. ed. St. Louis (MO): Saunders Elsevier; 2006, cap. 68, p. 900-905.

MELGAREJO-GIMENEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.R.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório - criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2006, p.175-200.

MOLLARET, H. H. Fifteen centuries of Yersiniosis. **Contributions to microbiology and immunology**,1995; v. 13, p 1-4.

OLIVEIRA, P. M. A. **Animais silvestres e exóticos na clínica particular: peixes – anfíbios – répteis**. 1 ed. São Paulo: editora Roca, 2003, cap 4, p 314-324.

ONDERKA, D. K.; FINLAYSON, M. C. Salmonellae and salmonellosis in captive reptiles. **The canadian journal of comparative medicine**, v. 49, n. 3, p. 268-270, 1985.

OROS, J. *et al.* Respiratory and digestive lesions caused by *Salmonella arizonae* in two snakes. **Journal of comparative pathology**, 1996; v. 115, p. 85–89.

RAMSAY, E. C. *et al.* Osteomyelitis associated with *Salmonella enterica* SS *arizonae* in a colony of ridgenose rattlesnakes (*Crotalus willardi*). **Journal of zoo and wildlife medicine**. 2002; v. 33, p 301–310.

ROSENTHAL, L. M.; MADER, D.R. Microbiology. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Co. p.217-238, 2006.

SCHILLINGER, L. *et al.* Granulomatous myocarditis and coelomic effusion due to *Salmonella enterica arizonae* in a Madagascar Dumerili's boa (*Acrantophis dumerili*, Jan. 1860). **Journal of veterinary cardiology**, may 2003, v. 5, n. 1, p. 43–45.

SOUZA, D.H.F. *et al.* The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease Alternagin inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. **Archives of biochemistry and biophysics**, London, v. 384, n. 2, p. 341-350, 2000.

VALSAN, C.; RAO, T.; SATHIAVATHY, A. A case of snakebite complicated by *Morganella morganii* subspecies *morganii* Biogroup I infection. **International journal of infectious diseases**. 2008; v. 6, n. 2, p. 2-5.