

Sensibilidade "in vitro" a antimicrobianos de bactérias isoladas a partir de afecções em serpentes doadoras de venenos

Marcio Hipolito
Sofia C. Mavridis
Aurélia A.P. Moulin
Lucia Baldassi

Instituto Biológico, C.P. 7119, CEP 01064-970, São Paulo.

Resumo

Dezesseis cepas bacterianas, provenientes de achados clínicos de serpentes foram submetidas a teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em ágar. Utilizaramo-se discos dos antibióticos amicacina, canamicina, carbenicilina, cloranfenicol, cloxacilina, colistina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, lincomicina, nitrofurantoina, novobiocina, penicilina, polimixina B, sulfazotrim (sulfametoxazol + trimetoprim), sulfonamidas e tetraciclina. Cloranfenicol, canamicina, tetraciclina, sulfazotrim e sulfonamidas, foram os antibióticos que ofereceram maior eficiência "in vitro" quando testados frente a diferentes espécies bacterianas.

Unitermos: Serpentes, antibiograma, sensibilidade

Summary

Sixteen bacterial strains, isolated from clinical specimens of snakes, were submitted to antibiotic susceptibility test by the agar diffusion method.

M. Hipólito et al.

Discs of amikacin, carbenicillin, chloramphenicol, cloxacillin, colistin, erythromycin, kanamycin, lincomycin, nitrofurantoin, novobiocin, penicillin, polymyxinB, streptomycin, sulfamethoxazole + trimethoprim, sulfonamides and tetracycline were employed. Chloramphenicol, kanamycin, sulfamethoxazole + trimethoprim, sulfonamides and tetracycline were the drugs that offered the best "in vitro" efficacy when tested against those different bacterial species.

Key words: Snakes, antibiogram, sensibility

Introdução

A busca de antibióticos mais eficazes no combate a agentes bacterianos, causadores de processos patológicos em serpentes cativas tem por objetivo conseguir, principalmente, o rápido restabelecimento dos animais (Hilf et al., 1990).

No caso de processos septicêmicos graves com avançado comprometimento de órgãos ou sistemas, o uso de antibióticos não é recomendado devido a baixa eficácia dos mesmos nesses processos, evidenciada por sua difícil regressão (Stull and Anderson, 1976), além do elevado custo com o tratamento (Cooper and Leakey, 1976; Firmin, 1976). Porém, nas estomatites e demais processos infecciosos ainda na sua fase inicial, o tratamento pode, e deve, ser tentado (Cooper, 1973; Veinert et al., 1983/84; Hilf et al., 1990). Após o diagnóstico clínico o início do tratamento terá que ser instituído o mais rapidamente possível através da antibioticoterapia associada a uma variada medicação de suporte (Wallach, 1969; Cooper, 1973; Firmin, 1976; Hilf et al., 1990).

A escolha do antibiótico mais adequado deve se restringir a informação obtida nas provas de sensibilidade após o isolamento e caracterização do agente ou agentes envolvidos (Hilf et al., 1990; Theakston et al., 1990), no intuito de se adotar o medicamento adequado e chegar a um resultado favorável em curto espaço de tempo.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a sensibilidade "in vitro" a agentes antimicrobianos de bactérias isolados de casos clínicos de serpentes doadoras de veneno.

Material e métodos

As 16 cepas em estudo, foram obtidas de casos clínicos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, doadoras de veneno (Mavridis et al., 1993a) e identificadas por provas bioquímicas (Glorioso et al., 1974) como sendo *Staphylococcus* coagulase negativa (2); *Corynebacterium* sp (1); Enterobactérias (3); *Pseudomonas aeruginosa* (8) e *Pseudomonas* sp (2). As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar sangue, em estufa bacteriológica a 37°C. O inóculo padronizado para o teste de sensibilidade (Bauer et al., 1966) foi uma cultura em caldo simples com crescimento bacteriano correspondente a metade da turvação do tubo nº 1 da Escala de Mcfarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

O meio de cultura utilizado foi o ágar Mueller-Hinton, e o ensaio foi realizado com a amicacina, carbenicilina, cloranfenicol, cloxacilina, colistina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, canamicina, lincomicina, nitrofurantoina, novobiocina, penicilina, polimixina B, sulfazotrim (sulfametoxazol + trimetoprim), sulfonamidas e tetraciclina.

Resultados

Os resultados obtidos com os testes de sensibilidade são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sensibilidade "in vitro" a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de afecções em serpentes, São Paulo, 1988.

Antibióticos e Quimioterápicos	Bactérias ^a				
	Scn (2) ^b	C (1)	E (3)	Pa (8)	P (2)
Amicacina	NT ^c	NT	NT	gd	0
Canamicina	NT	NT	0	0	2
Carbenicilina	NT	NT	NT	8	0
Cloranfenicol	2	1	3	0	2
Cloxacilina	2	0	NT	NT	NT
Colistina	NT	NT	NT	0	0

Eritromicina	NT	NT	NT	0	0
Estreptomicina	NT	NT	NT	0	0
Gentamicina	NT	NT	NT	0	0
Lincomicina	0	1	NT	0	0
Nitrofurantoina	NT	NT	NT	0	0
Novobiocina	0	NT	NT	NT	NT
Penicilina	NT	NT	NT	0	0
Polimixina B	0	0	0	8	0
Sulfazotrim	NT	NT	3	0	2
Sulfonamidas	NT	NT	3	0	2
Tetraciclina	2	1	0	0	2

* Scn: *Staphylococcus coagulase negativa*; C: *Corynebacterium sp.*

E: Enterobactérias; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; P: *Pseudomonas sp.*

° Número de amostras testadas

° Não testado

° Número de amostra sensíveis

Discussão

O conhecimento dos agentes bacterianos da microbiota (Mavridis et al., 1993b) e da cavidade bucal de ofídios, envolvidos em processos patológicos (Mavridis et al., 1986; Hipólito et al., 1987; Mavridis et al., 1993a) torna-se necessário e deve ser sempre pesquisado. Associado a esse fato, é importante conhecer o espectro de sensibilidade das bactérias presentes nas infecções (Ledbetter and Kutscher, 1969; Bruke et al., 1979; Veinert et al., 1983/84; Yashodara et al., 1988), pois o tratamento torna-se difícil, uma vez que os microorganismos, podem apresentar resistência às drogas que geralmente são usadas na antibioticoterapia (Cooper and Leakey, 1976); Burke et al., 1978; Carter, 1988; Brar et al., 1990).

Parte dos resultados encontrados neste estudo coincidem com o que é descrito na literatura. Os resultados encontrados para os *Staphylococcus coagulase negativa*, relativos à novobiocina, ao cloranfenicol e a tetraciclina, corroboram outros achados (Ledbetter e Kutscher, 1969; Theakston et al.,

Bactérias isoladas a partir de afecções em serpentes doadoras de venenos

1990). O mesmo ocorre com relação a sensibilidade demonstrada pelas *Pseudomonas* sp frente ao cloranfenicol, sulfonamidas e tetraciclina e observadas por vários autores (Wallach, 1969; Cooper, 1973; Selbitz and Elze, 1982; Jorge et al., 1990; Theakston et al., 1990), e pela *Pseudomonas aeruginosa* frente a carbenicilina (Cooper and Leakey, 1976; Ambu and Ng, 1984).

As enterobactérias mostraram-se sensíveis ao cloranfenicol, sulfazotrim e as sulfonamidas, o que também foi verificado por outros autores (Ladbetter and Kutscher, 1969; Wallach, 1969; Jorge et al., 1990; Theakston et al., 1990).

A penicilina, um dos antibióticos mais comumente empregados em tratamento, mostrou pouca eficiência frente aos diversos agentes aqui testados, não justificando, assim o seu uso, fato que corrobora outras notificações (Ladbetter and Kutscher, 1969; Brar et al., 1990).

São parcialmente conflitantes os resultados referentes à gentamicina, que neste estudo mostrou-se ineficaz, uma vez que as bactérias testadas foram resistentes, porém recomendado por diversos autores (Firmin, 1976; Montali et al., 1979; Millichamp et al., 1983; Ambu and Ng, 1984; Carter, 1988; Brar et al., 1990; Hilf et al., 1991a; Hilf et al., 1991b; Jorge et al., 1990; Theakston et al., 1990).

A sensibilidade aqui verificada para a maioria dos grupos bacterianos frente ao cloranfenicol é fato igualmente verificado na literatura consultada (Ladbetter and Kutscher, 1969; Wallach, 1969; Cooper, 1973; Selbitz and Elze, 1982; Brar et al., 1990; Jorge et al., 1990; Theakston et al., 1990).

Observou-se que nenhum dos antibióticos testados foi efetivo contra todos os gêneros bacterianos, o que reafirma a importância dos testes de sensibilidade na escolha de uma ou mais drogas para o sucesso na antibioticoterapia. O tratamento emergencial baseado em resultados de testes de sensibilidade dos mesmos agentes bacterianos isolados de outros processos mórbidos, é sempre conveniente enquanto se aguarda o resultado definitivo do exame laboratorial (Hilf et al., 1990).

Os dados aqui relatados coincidem com aqueles relacionados e já estudados em anfíbios (Hipolito et al., 1988), sugerindo não haver variações dos padrões de sensibilidade segundo o hospedeiro, pelo menos no que se refere aos animais de sangue frio. Entretanto, quando se considera a literatura pertinente, os resultados apresentados neste trabalho mostram-se

por vezes conflitantes, fato que pode ser decorrente de fatores habitualmente indicados como responsáveis por diferenças da microbiota, tais como a espécie, a origem da serpente, sua higidez, seu estado nutricional e até mesmo possível resistência varietal bacteriana, além da metodologia laboratorial empregada, bem como do número de cepas isoladas por animal estudado (Ledbetter and Kutscher, 1969; Hilf et al., 1990; Treakston et al., 1990).

O número pequeno de amostras bacterianas testadas deve-se especificamente, à espécie animal em estudo, situação que sempre repete quando se consulta a literatura.

Inúmeros fatores devem ser ponderados quando se aplica "in vitro" resultados obtidos "in vitro". Um deles, de extrema importância é o fato de que os padrões de sensibilidade são baseados em dados obtidos a partir de cepas isoladas de animais de sangue quente. Portanto, a interpretação da concentração mínima inibitória é bastante complicada visto que os níveis séricos de agentes antimicrobianos nos animais de sangue frio são substancialmente diferentes dos níveis sérios de animais de sangue quente, que são utilizados na padronização dessas técnicas. Outro fator, de ordem prática, é o espaço de tempo entre o estabelecimento da doença e a administração do antibiótico, que também deve ser considerado.

Ainda, um ponto relevante é o argumento contra o uso indiscriminado de antibióticos em serpentes (Cooper and Leakey, 1976), pela indicação do aumento da resistência nas bactérias presentes em lesões provocadas por acidente ofídico. Porém, um uso racional baseado em testes de sensibilidade com certeza irá diminuir este risco.

Referências bibliográficas

- Ambu, S. and NG, C. S. (1984) Outbreak of bacterial infections in captive snakes. *The Snake*, **16**: 123-124.
- Bauer, A. W; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Path.*, **45** (4): 493-496.
- Brar, R. S.; Gupta, P. P. and Misri, j. (1990) Observation on the post-mortem lesions in two pythons. *Indian Vest. J.*, **67** (6): 573.

Bactérias isoladas a partir de afecções em serpentes doadoras de venenos

- Burke, T. J.; Rosenberg, D. and Smith, A. R. (1979) Infectious stomatitis - a perspective study of normal flora and report of an unusual case. In: *Annual American Association of Zoo Veterinarians, Knoxville, 1978*. Proceedings. Knoxville, pp. 190-196.
- Carter, G. R. (1988) Drogas Antimicrobianas. In: *Fundamentos da Bacteriologia e Micologia Veterinária*. Livraria ROCA Ltda, São Paulo, pp. 81-92.
- Cooper, J. E. (1973) Treatment of necrotic stomatitis at the Nairobi Snake Park. *International Zoo Yearbook*, **13**: 268-269.
- Cooper, J. E. and Leakey, J. H. E. (1976) A septicaemic disease of East African snakes associated with enterobacteriaceae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **70** (1): 80-84.
- Firmin, Y. (1976) Quelques aspects de la pathologie des serpents. *Rec. Med. Vet.*, **152** (11): 721-727.
- Glorioso, J. C.; Amborski, R. L.; Larkin, J. M.; Amborski, G. F and Culley, D. C. (1974) Laboratory identification of bacterial pathogens of aquatic animals. *Am. J. Vet. Res.*, **35** (3): 447-450.
- Hilf, M.; Wagner, R. A. and Yu, V. L. (1990) A prospective study of upper airway flora in healthy boid snakes and snakes with pneumonia. *J. Zoo. Wildlife Med.*, **24** (3): 318-325.
- Hilf, M.; Swanson, D. and Wagner, R. (1991a) A new dosing schedule for gentamicin in blood pythons (*Python curtus*): a pharmacokinetic study. *Res. Vet. Sci.*, **50**: 127-130.
- Hilf, M.; Swanson, D.; Wagner, R. and Yu, V. L. (1991b) Pharmacokinetics of piperacillin in blood pythons (*Python curtus*) and in vitro evaluation of efficacy against aerobic Gram-negative bacteria. *J. Zoo. Wildlife Med.*, **22** (2): 199-203.
- Hipolito, M.; Mavridis, S. C.; Baldassi, L.; Moulin, A. A. P e Barbosa, M. L. (1987) *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de caso de estomatite em *Bothrops alternatus* (Serpente, Viperidae) *Rev. Microbiol.*, São Paulo, **18** (3): 224-228.
- Hipolito, M.; Baldassi, L.; Pires, D. C.; Souza, C. W. O. e Souza Jr., F. L. (1988) Sensibilidade bacteriana de agentes oportunistas isolados de anfíbios. In: *Encontro Nacional de Ranicultura*, 6., Rio de Janeiro. *Anais*. Rio de Janeiro, pp. 341-346.

- Jorge, M. T.; Mendonça, J. S.; Ribeiro, L. A.; Silva, M. L. R.; Kusano, E. J. U. e Cordeiro, C. L. S. (1990) Flora bacteriana da cavidade, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 32 (1): 6-10.
- Ledbetter, E. O. and Kutscher, A. E. (1969) The aerobic and anaerobic flora of rattlesnake fangs and venom. *Arch. Environ Health*, 19: 770-778.
- Mavridis, S. C.; Baldassi, L.; Moulin, A. A. P. e Hipolito, M. (1986) *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abscesso em serpente (*Bothrops neuwiedi*). *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 17 (1): 28-30.
- Mavridis, S. C.; Hipolito, M.; Baldassi, L.; Calil, E. M. B.; Moulin, A. A. P. e Barbosa, M. L. (1993a) Inquérito bacteriológico de serpentes doentes e mortas mantidas em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan*, 55 (supl.)1: 55-62.
- Mavridis, S. C.; Hipolito, M.; Baldassi, L.; Moulin, A. A. P.; Calil, E. M. B. e Barbosa, M. L. (1993b). Estudo da microbiota aeróbica de serpentes *Bothrops* sp (Serpente, Viperidae), recém capturadas. *Mem. Inst. Butantan*, 55 (2): 59-64.
- Millichamp, N. J.; Elliott, R. J. and Wolf, E. D. (1983) Diseases of the eye and ocular adnexae in reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 183 (11): 1205-1212.
- Montali, R. J.; Bush, M. and Smeller, J. M. (1979) The pathology of nephrotoxicity of gentamicin in snakes. A model for reptilian gout. *Vet. Pathol.*, 16: 108-115.
- Selbitz, H. J. and Elze, K. (1982) *Aeromonas* und *Pseudomonas* infektionen dei reptilien. *Monatsh. Veterinarmed.*, 37 (8): 293-295.
- Stull, P. A. and Anderson, M. P. (1976) Stomatitis in *Boa constrictor*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 169 (9): 939-940.
- Theakston, R. D. G.; Phillips, R. E.; Looareesuwan, S.; Echeverria, P.; Makin, T. and Warrell, D. A. (1990) Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84: 875-879.
- Veinert, T.; Belluomini, H. E.; Ilzuka, H. e Fedullo, J. D. L. (1983/84) Necrose de ponta de cauda em *Eunectes notaeus*, COPE, 1892 (Serpente, Boidae, Boinae). *Mem. Inst. Butantan*, 47/48: 189-190.

Bactérias isoladas a partir de afecções em serpentes doadoras de venenos

Wallach, J. D. (1969) Medical care of reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **155** (7): 1017-1034.

Yashodara, A.; Diniz, L. S. M.; Ramos, M. C.; Faria Jr., S. P.; Costa, E. O.; Coutinho, S. D. A. e Carvalho, V. M. (1988) Surto de estomatite e abscesso orais de etiologia bacteriana em serpentes. In: Reunião Anual da SBPC, 40., São Paulo. *Resumo*. p. 730.