

MICHELLE VANESSA CAMPAGNER

**Manejo de serpentes em cativeiro:  
manejo clínico-sanitário e avaliação da  
microbiota**

Botucatu

2011

MICHELLE VANESSA CAMPAGNER

## **Manejo de serpentes em cativeiro: manejo clínico-sanitário e avaliação da microbiota**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Professor Doutor Benedito Barraviera

Co-orientador: Professor Doutor Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Campagner, Michelle Vanessa.

Manejo de serpentes em cativeiro: manejo clínico-sanitário e avaliação da microbiota / Michelle Vanessa Campagner. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Benedito Barraviera

Co-orientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Capes: 40100006

1. Cobra. 2. Microbiologia. 3. Animais selvagens em cativeiro.

Palavras-chave: Cativeiro; Manejo; Microbiologia; Serpentes.

A minha mãe Fátima pelo amor e por não medir esforços em investir em minha educação

Aos meus queridos irmãos Netto e Stephanie "Teté" pelo carinho e amizade

A minha amada sobrinha Sarah por trazer tanta alegria a minha vida

Ao homem da minha vida, Yuri Alencar Marques, pelo seu amor, paciência e companheirismo, dedico a você a finalização importante de uma etapa em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

As serpentes, ani mais maravilhosos que me fascinam

A minha família, por ser meu ponto de retorno e partida a cada novo desafio.

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera, por acreditar na minha capacidade e permitir a realização desse estudo.

Ao Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior pela co-orientação e pelas sugestões na realização desse estudo.

A Prof. Dra. Sandra de Moraes Gimenez Bosco, pelo apoio, dedicação, amizade, competência e por suas contribuições para o aprimoramento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bagagli, pelo uso das instalações do laboratório, pela participação na banca de qualificação e defesa, e pelas importantes sugestões para realização e finalização desse estudo.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni pela participação e importantes sugestões na Banca de Qualificação.

A Prof. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha pelo uso das instalações do laboratório, e pelas importantes sugestões nas análises dos antibiogramas.

Aos técnicos do IB Isaltino e Pedro, pela amizade, carinho e apoio nas análises microbiológicas e na elaboração dos "infundáveis" meios de cultura.

Ao pessoal do laboratório de Micologia: Thales, Assis, Tâmara, "Julianas", Gabriel, Ariane e Layla.

Ao pessoal do laboratório da Prof. Lurdinha, em especial ao Marquinho e Mariana.

Aos meus eternos melhores amigos Tatiana e Fábio, por tantos anos de amizade e companheirismo. Mesmo longe, vocês contribuíram grandemente para a realização desse projeto.

A meticulosa jovem pesquisadora Daniela Fossato pela fantástica ajuda na organização e correção do manuscrito.

Aos grandes aprimorandos, ex-aprimorandos e ex-pós-graduandos Renato (Bolão), Roberta, Tiago, Priscila e Bruno, meus especiais agradecimentos pela amizade, ajuda e dedicação na manutenção da área técnica.

Aos meus companheiros de CEVAP Vinícius, Vivian, Isabel, Renato (Zoo), Gustavo, Airton e Luciana.

Aos estagiários Luana, Camila, Augusto, Flávia, Milene, Larissa, Pedro, Jennifer e todos que passaram pelo CEVAP durante a realização desse trabalho. Um agradecimento especial a estagiária Bruna, pela ajuda em todas as coletas.

Um agradecimento especial a Natália Biscola, por ser minha companheira de congresso e pela ajuda na etapa final desse processo.

Um agradecimento especial ao meu querido amigo Eduardo Saad pela ajuda em todas as coletas e por compartilhar das minhas alegrias e angústias.

A todos os funcionários do CEVAP, Marquinho, Selma, Juliana, Granieri, "Dona" Dirce, Sheila, "Seu" Antônio, Sérgio, João, Paulo, Keila e em especial a Marli pela ajuda e companheirismo.

As funcionárias do Departamento de Doenças Tropicais, Michelle, Francielle e Mayara. Um agradecimento especial a Solange Sako Cagliariari pela atenção e socorro nas horas difíceis.

E a todos aqueles que forma direta ou indireta contribuiu para o êxito desse trabalho.

Eu tenho uma espécie de dever,  
dever de sonhar, de sonhar sempre,  
pois sendo mais do que um espetáculo de mim mesmo,  
eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso.

E, assim, me construo a ouro e sedas,  
em salas supostas, invento palco,  
cenário para viver o meu sonho  
entre luzes brandas e  
músicas invisíveis.

- Fernando Pessoa -

## RESUMO GERAL

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) foi criado em 1989 por um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, com a finalidade de promover a pesquisa básica, aplicada e tecnológica das peçonhas ofídicas. Esse estudo teve como objetivo elaborar uma proposta para a implantação de um programa de manutenção em cativeiro mais eficiente, visando à sobrevivência das serpentes e a independência de animais provenientes da natureza. Para tanto, foi necessária a construção de um sistema de cadastro de serpentes, a avaliação da infraestrutura e manejo utilizados, e a análise microbiológica de cada regime adotado. Foi observado que o Banco de Dados *on line* possibilita a organização dos dados e permite a rastreabilidade da peçonha. O cativeiro intensivo apesar de proporcionar facilidade na vistoria dos animais necessita de modificações na infraestrutura e manejo. No cativeiro semi-extensivo, foi observado que as instalações facilitam o manejo dos animais, necessitando apenas de adequações nos aquecedores. No biotério de roedores são necessárias diversas mudanças estruturais, controle de temperatura, umidade, tratamento da ração, maravalha e água oferecida aos animais. Na análise microbiológica, não foi observada diferença na frequência de bactérias entre as espécies, mas ocorreram diferenças entre os diferentes regimes de cativeiro utilizados, com destaque para o cativeiro intensivo. O isolamento de potencial patógenos nas amostras das serpentes estudadas apesar de não ser sinônimo de doença, foi considerado importante no processo de avaliação do tipo de manejo utilizado, considerando as numerosas condições estressantes proporcionadas pelo ambiente do cativeiro e o caráter oportunista desses agentes. Os resultados sugerem que o tipo de manejo adotado influencia na contaminação do ambiente utilizado pelos animais. Apesar de o sistema intensivo ser o método tradicionalmente utilizado na manutenção de ofídios destinados a produção de peçonha, o sistema semi-extensivo pode ser mais apropriado para este fim.

Palavras-chave: serpentes, manejo, cativeiro, microbiologia



## GENERAL ABSTRACT

The Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) was founded in 1989 by a group of researchers from the Sao Paulo State University – UNESP, with the objective of promoting basic, applied, and technological research of snake venoms. The purpose of the present study was to develop a implementation program proposal for a more efficient captivity maintenance, aiming to extend the snakes' life expectancy and the independence of animals brought from the wild. Therefore, it was necessary to build a snake registry system, an infrastructure and handling procedures evaluation, as well as a microbiological profile evaluation of each captivity environment adopted. It was observed that an on line data bank allows arrangement of the data as well as the traceability of the venom. Although intensive captivity enables easy check of the animal, it demands modifications in the infrastructure and handling. In semi-extensive captivity it was observed that the facilities meet all the structure and safety requirements in addition to making the animals' handling easier. In the rodents' the biotery, several structural changes are needed besides temperature and humidity control, feed treatment, saw dust and water. In the microbiological analysis, it was observed a difference in the frequency of bacteria between the species, but also between the distinct captivity environments used, with special remark to the intensive captivity. Even though the presence of pathogens does not mean illness, the isolation of potential pathogens in the snakes' samples analyzed was considered important in the evaluation process of the type of handling used, considering the numerous stressing conditions promoted by the captivity environment and the opportunistic character of these agents. Results suggest that the type of captivity adopted influences in the contamination of the environment used by the animals. Even though the intensive system is the method traditionally used in maintaining snakes for the production of venom, the semi-extensive system can be more appropriate for this purpose.

Key words: snakes, handling, captivity, microbiology

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Ficha de informações do Banco de Dados on line para cadastro de serpentes.....	12
<b>Figura 2.2.</b> Número de registros de serpentes peçonhentas cadastradas no Banco de Dados de Janeiro de 2004 e Janeiro de 2009.....	14
<b>Figura 2.3.</b> Procedência das 786 serpentes cadastradas no Banco de Dados.....	15
<b>Figura 2.4.</b> Ambientes de coleta registrados para <i>Caudisona durissa terrifica</i> .....	16
<b>Figura 2.5.</b> Ambientes de coleta registrados para <i>Bothropoides jararaca</i> .....	16
<b>Figura 2.6.</b> Ambientes de coleta registrados para <i>Bothropoides pauloensis</i> .....	17
<b>Figura 2.7.</b> Ambientes de coleta registrados para <i>Rhinocerophis alternatus</i> .....	17
<b>Figura 2.8.</b> Ambientes de coleta registrados para <i>Bothrops moojeni</i> .....	18
<b>Figura 2.9.</b> Distribuição sazonal dos viperídeos cadastrados entre 2004 e 2009.....	19
<b>Figuras 3.1A-B.</b> Estrutura do Serpentário Intensivo do CEVAP	38
<b>Figuras 3.2A-B.</b> Estrutura do Serpentário semi-extensivo do CEVAP.....	39
<b>Figuras 3.3A-B.</b> Estrutura do Biotério de roedores do CEVAP..	40
<b>Figuras 3.4A-B.</b> Manipulação de serpentes peçonhentas.....	41
<b>Figuras 3.5A-B.</b> Sala de triagem do CEVAP.....	42
<b>Figuras 3.6A-B.</b> Coleta de dados biométricos das serpentes recém-chegadas.....	43
<b>Figuras 3.7 A-B.</b> Manejo realizado no Serpentário Intensivo....	44
<b>Figura 3.8A-B.</b> Manejo realizado no Serpentário Semi-extensivo.....	46

<b>Figuras 3.9A-B.</b> Metodologia de extração utilizada no CEVAP	48
<b>Figura 3.10</b> Microchip utilizado para marcação individual das serpentes.....	49
<b>Figuras 3.11A-C.</b> Roedores mantidos no Biotério do CEVAP...	50
<b>Figuras 3.12A-B.</b> Pedilúvios utilizado no manejo sanitário.....	52
<b>Figuras 3.13A-B.</b> Agente físico (vassoura de fogo) utilizado no manejo sanitário do Serpentário Semi-extensivo..	53
<b>Figuras 4.1A-B.</b> Espécies de serpentes envolvidas na análise microbiológica.....	85
<b>Figuras 4.2A-B.</b> Serpentes com lesões sugestivas de micose	87
<b>Figuras 4.3A-B.</b> Coleta das amostras da cavidade oral e cloacal.....	88
<b>Figuras 4.4A-B.</b> Coleta das amostras de escamas.....	89
<b>Figura 4.5</b> Coleta de peçonha de <i>Bothropoides jararaca</i> .....	90
<b>Figura 4.6</b> Percentagem de bactérias isoladas nos diferentes grupos estudados.....	100
<b>Figura 4.7</b> Análise comparativa da frequência de bactérias isoladas nos diferentes grupos de estudo.....	101
<b>Figura 4.8</b> Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas nas amostras e o regime de cativeiro.....	104
<b>Figura 4.9</b> Análise comparativa da frequência de bactérias isoladas nas diferentes amostras analisadas.....	105
<b>Figura 4.10</b> Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas nas amostras e a espécie de serpente analisada.....	105

<b>Figura 4.11</b>	Análise comparativa da freqüência de bactérias isoladas em amostras de <i>Bothropoides jararaca</i> .....	106
<b>Figura 4.12</b>	Análise comparativa da freqüência de bactérias isoladas em amostras de <i>Caudisora durissa terrifica</i> .....	107
<b>Figura 4.13</b>	Análise comparativa entre a freqüência de bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente <i>Bothropoides jararaca</i> .....	107
<b>Figura 4.14</b>	Análise comparativa entre a freqüência de bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente <i>Caudisora durissa terrifica</i> .....	108
<b>Figura 4.15</b>	Análise comparativa da freqüência de bactérias isoladas em amostras de serpentes recém-capturadas.....	109
<b>Figura 4.16</b>	Análise comparativa da freqüência de bactérias isoladas em amostras de serpentes mantidas em cativeiro intensivo.....	109
<b>Figura 4.17</b>	Análise comparativa da freqüência de bactérias isoladas em amostras de serpentes mantidas em cativeiro semi-extensivo.....	110
<b>Figura 4.18</b>	Teste $\chi^2$ (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário”(I) e “resistente”(R) dos resultados obtidos frente aos 12 antimicrobianos testados.....	115
<b>Figura 4.19</b>	Teste $\chi^2$ (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário”(I) e “resistente”(R) dos isolados dos diferentes grupos analisados.....	116
<b>Figura 4.20</b>	Teste $\chi^2$ (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário”(I) e “resistente”(R) dos isolados nos diferentes regimes de cativeiro.....	117

<b>Figura 4.21</b>	Análise da comparação entre os resultados “sensível” (S), obtidos frente aos 12 antimicrobianos testados.....	118
<b>Figura 4.22</b>	Análise da comparação entre os resultados “intermediário” (I), obtidos frente aos 12 antimicrobianos testados.....	119
<b>Figura 4.23</b>	Análise da comparação entre os resultados “resistente” (R), obtidos frente aos 12 antimicrobianos testados.....	119
<b>Figuras 4.24 A-E</b>	Macromorfologia dos isolados de <i>Trichosporon</i> sp em escamas de serpentes.....	121
<b>Figuras 4.25 A-F</b>	Características morfológicas de <i>Trichosporon</i> sp em Agar Saboraud-Dextrose (SAB).....	122
<b>Figura 4.26</b>	Eletrforese em gel de agarose 1,5% do produto da extração de DNA genômico bruto de cinco isolados de <i>Trichosporon</i> sp.....	124
<b>Figura 4.27</b>	Eletrforese em gel de agarose 1,5% do produto da amplificação do material genético das amostras de <i>Trichosporon</i> sp isolados em escamas de serpentes.....	125

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Espécies de serpentes cadastradas no Banco de Dados entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2009.....	13
<b>Tabela 2.2.</b> Distribuição da frequência absoluta (n) e relativa (%) das serpentes cadastradas no Banco de Dados entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2009.....	14
<b>Tabela 2.3.</b> Frequência de machos e fêmeas de serpentes registradas durante o período de estudo.....	19
<b>Tabela 2.4.</b> Média e mediana da sobrevivência das serpentes peçonhentas (n=308) mantidas no CEVAP no período de 2004 a 2009	20
<b>Tabela 4.1.</b> Grupos de estudo de <i>Bothropoides jararaca</i> .....	86
<b>Tabela 4.2.</b> Grupos de estudo de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	86
<b>Tabela 4.3.</b> Espécies de serpentes com lesões sugestivas de micose incluídas no experimento microbiológico.....	87
<b>Tabela 4.4.</b> Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das bactérias isoladas nos diferentes grupos de serpentes estudados.....	99
<b>Tabela 4.5.</b> Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das amostras isoladas nos diferentes grupos de estudo (G1 a G6).....	102
<b>Tabela 4.6.</b> Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das bactérias isoladas nas diferentes amostras dos grupos estudados.....	102
<b>Tabela 4.7.</b> Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das bactérias isoladas nas diferentes amostras analisadas.....	103
<b>Tabela 4.8.</b> Perfil de sensibilidade (%) dos 129 microorganismos isolados da cavidade oral e peçonha dos diferentes grupos estudados.....	112
<b>Tabela 4.9.</b> Perfil de resistência (%) dos 129 microorganismos isolados da cavidade oral e peçonha dos diferentes grupos estudados.....	113

<b>Tabela 4.10.</b> Perfil de sensibilidade intermediária (%) dos 129 microorganismos isolados da cavidade oral e peçonha dos diferentes grupos estudados.....	114
<b>Tabela 4.11.</b> Amostras utilizadas para identificação molecular pelo seqüenciamento de rDNA.....	123
<b>Tabela 4.12.</b> Quantificação do produto de extração analisado em espectrofotômetro NanoVue®.....	124
<b>Tabela 4.13.</b> Identificação, espécie de serpente, número de acesso no Gene Bank e homologia dos cinco isolados seqüenciados	126

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xii
<b>CAPÍTULO 1: Introdução Geral</b>	<b>1</b>
RESUMO	2
1.0 INTRODUÇÃO	3
1.2 OBJETIVO	5
1.2.1 Objetivos específicos	5
1.3 REFERÊNCIAS	6
<b>CAPÍTULO 2: Elaboração de um sistema de cadastro de serpentes – Banco de Dados <i>on line</i>.</b>	<b>08</b>
RESUMO	09
2.1 INTRODUÇÃO	10
2.2 OBJETIVO	11
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.3.1 Banco de Dados <i>on line</i>	11
2.3.2 Análise estatística	12
2.4 RESULTADOS	13
2.4.1 Espécies	13
2.4.2 Procedência	15
2.4.3 Ambiente de coleta	15
2.4.4 Sazonalidade	18
2.4.5 Sexo	19
2.4.6 Sobrevida e óbitos	20
2.5 DISCUSSÃO	21
2.6 REFERÊNCIAS	26



<b>CAPÍTULO 3: Avaliação da Infra estrutura e manejo</b>	<b>31</b>
RESUMO	32
3.1 INTRODUÇÃO	33
3.2 OBJETIVOS	34
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.3.1 Avaliação da Infra estrutura do CEVAP	34
3.3.2 Manejo dos Serpentários e Biotérios de roedores do CEVAP	34
3.3.3 Recursos Humanos	35
3.4 RESULTADOS	36
3.4.1 Infra estrutura	36
3.4.1.1 Sala de triagem	36
3.4.1.2 Quarentenário	36
3.4.1.3 Serpentário Intensivo	37
3.4.1.4 Serpentário Semi-extensivo	38
3.4.1.5 Biotério de roedores	39
3.4.2 Recursos Humanos	40
3.4.3 Manejo dos Serpentários	41
3.4.3.1 Material usado no manejo das serpentes	41
3.4.3.2 Triagem	41
3.4.3.3 Quarentenário	42
3.4.3.4 Serpentário Intensivo	44
3.4.3.5 Serpentário Semi-extensivo	45
3.4.3.6 Alimentação das serpentes	46
3.4.3.7 Rotina de extração de peçonha	47
3.4.3.8 Microchipagem dos animais	49
3.4.4 Manejo do biotério de roedores	49
3.4.5 Manejo sanitário	51
3.4.5.1 Higienização do material utilizado no manejo das serpentes	51
3.4.5.2 Pedilúvios	52
3.4.5.3 Higienização do Quarentenário e Serpentário Intensivo	52
3.4.5.4 Higienização do Serpentário Semi-extensivo	53
3.4.5.5 Higienização do Biotério de roedores	53

3.4.5.6 Higienização das caixas provenientes do Serpentário Intensivo e Biotério de roedores	54
3.4.6 Descarte do lixo	54
3.4.6.1 Material proveniente das atividades veterinárias	54
3.4.6.2 Material proveniente das camas de roedores e caixas das serpentes	54
3.4.5.3 Carcaça de animais	56
3.5 DISCUSSÃO	56
3.6 REFERÊNCIAS	75

<b>CAPÍTULO 4: Análise microbiológica dos diferentes regimes de cativeiro adotados pelo CEVAP</b>	81
RESUMO	83
4.1 INTRODUÇÃO	84
4.2 OBJETIVOS	84
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	84
4.3.1 Animais	84
4.3.2 Grupos de estudo	85
4.3.3 Animais com lesões sugestivas de micose	86
4.3.4 Coleta das amostras para análise microbiológica	87
4.3.4.1 Cavidade oral e cloacal	88
4.3.4.2 Escamas	88
4.3.4.3 Peçonha	89
4.3.5 Processamento microbiológico	90
4.3.5.1 Identificação bacteriológica	91
4.3.5.2 Antibiograma	91
4.3.5.3 Identificação micológica	92
4.3.5.3.1 Características macromorfológicas (Colônia gigante)	93
4.3.5.3.2 Características micromorfológicas (Microcultivo)	93
4.3.5.3 Identificação molecular pelo sequenciamento de rDNA	93
4.3.5.3.1 Extração do DNA genômico	93
4.3.5.3.2 Amplificação do DNA	95

4.3.5.3.3 Purificação do DNA	96
4.3.5.3.4 Sequenciamento do DNA	96
4.3.5.3.4 Análise das sequências	97
4.3.6 Análise estatística	97
4.4 RESULTADOS	98
4.4.1 Análise bacteriológica	98
4.4.1.1 Grupos de estudo	98
4.4.1.2 Amostras	101
4.4.1.3 Espécies de serpentes	105
4.4.1.4 Regimes de cativeiro	108
4.4.2 Antibiograma	110
4.4.3 Análise micológica	120
4.4.3.1 Macromorfologia	120
4.4.3.2 Micromorfologia	122
4.4.3.3 Identificação molecular pelo seqüenciamento de rDNA	123
4.4.3.3.1 Extração do DNA genômico	123
4.4.3.3.2 Amplificação do DNA	125
4.4.3.3.3 Sequenciamento do DNA	126
4.5 DISCUSSÃO	127
4.6 REFERÊNCIAS	148
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	<b>163</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>166</b>

INTRODUÇÃO GERAL

---

CAPÍTULO 1

## RESUMO

Os viperídeos representam o grupo de serpentes mais importante para a saúde pública, sendo causadores da maioria e dos mais graves acidentes ofídicos registrados. Além da produção do soro antiofídico, as peçonhas ofídicas têm sido utilizadas para a elucidação de processos biológicos complexos, na elaboração de novas ferramentas de uso terapêutico, produção de novos fármacos e imunobiológicos. O CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos) foi criado em 1989 por um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, com a finalidade de promover a pesquisa básica, aplicada e tecnológica das peçonhas ofídicas. No início a estrutura era constituída de apenas uma quarentena, um pequeno biotério de roedores e quatro baias. No final de 2005 os pesquisadores do CEVAP iniciaram a ocupação da nova Sede no campus Lageado e a estrutura do serpentário conta atualmente com Recepção e Quarentenários, Serpentários Intensivo e Semi-extensivo e Biotério de Roedores. O plantel de serpentes do CEVAP é formado atualmente por cerca de 500 animais doados pela Polícia Florestal, Corpo de Bombeiros, Polícia Militar, Vigilância Sanitária e fazendeiros da região de Botucatu. Devido ao declínio no recebimento das serpentes, o Setor de Herpetologia do CEVAP percebeu a necessidade de estudos na área de manutenção em cativeiro, com a finalidade de buscar a auto-suficiência. O objetivo desse estudo foi elaborar uma proposta para a implantação de um programa de manutenção em cativeiro mais eficiente. Para tanto, foi necessário avaliar os diferentes regimes de cativeiros adotados pelo Centro, além de apontar os problemas envolvidos na infra estrutura e manejo utilizados, com a finalidade de aumentar o bem-estar e sobrevivência dos animais e melhorar a qualidade e quantidade de peçonha produzida.

Palavras-chave: serpentes, cativeiro, CEVAP

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma riquíssima ofidofauna, com 371 espécies divididas em 76 gêneros e 10 famílias <sup>1</sup>. Apesar dos esforços de tradicionais instituições e especialistas no assunto, muitas espécies dessa fauna são ainda mal conhecidas ou pouco estudadas <sup>2</sup>.

Recentemente foi sugerida alteração dos gêneros dos principais viperídeos causadores de acidentes no Brasil. As *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, atualmente são referidas como *Caudisona* <sup>1,4</sup>. As *Bothrops*, representadas pelas urutus, caiaçacas, jararacas e jararacas-do-rabo-branco, atualmente são conhecidas como *Rhinocerothis alternatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothropoides jararaca* e *Bothropoides pauloensis* <sup>1,4</sup>. Nesse estudo foi considerada a nova nomenclatura.

Os viperídeos representam o grupo mais importante para a saúde pública, sendo causadores da maioria e dos mais graves acidentes ofídicos registrados <sup>5</sup>. Em 2008 no Brasil foram notificados 26.905 acidentes, sendo o “grupo *Bothrops*” (*Bothrops*, *Bothropoides* e *Rhinocerothis*) responsável por 73,5% das notificações, seguido do gênero *Caudisona* (7,5%), *Lachesis* (3%) e *Micrurus* (0,7%). As serpentes consideradas não peçonhentas foram responsáveis por 3,5% dos acidentes e 11,8% dos casos não foram identificados <sup>5</sup>.

As peçonhas ofídicas são misturas heterogêneas complexas contendo proteínas que correspondem de 90 a 95% do peso seco do veneno, muitas das quais com atividades enzimáticas <sup>6</sup>. Além disso, podem conter peptídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos como sódio, cálcio, potássio, magnésio e pequenas quantidades de metais como ferro, zinco, cobalto, manganês e níquel <sup>7-10</sup>.

Além da produção do soro antiofídico, as peçonhas ofídicas têm sido utilizadas para a elucidação de processos biológicos complexos, na elaboração

de novas ferramentas de uso terapêutico, produção de novos fármacos e imunobiológicos<sup>11-17</sup>.

O CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos) foi criado em 1989 por um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, com a finalidade de promover a pesquisa básica, aplicada e tecnológica das peçonhas ofídicas<sup>18</sup>. Para tanto, foi necessária a implantação de um programa de manutenção de serpentes em cativeiro para a obtenção de matéria-prima. No início a estrutura era constituída de apenas uma quarentena, um pequeno biotério de roedores e quatro baias.

No final de 2005 os pesquisadores do CEVAP iniciaram a ocupação da nova Sede Administrativa e de Pesquisa com cerca de 2.000 m<sup>2</sup> de área construída dentro da área de 15.323,65 m<sup>2</sup> doada pela Faculdade de Ciências Agrônomicas, na Fazenda Experimental Lageado, Campus de Botucatu. A estrutura do serpentário conta atualmente com Recepção e Quarentenários, Serpentários Intensivo e Semi-extensivo e Biotério de Roedores.

O plantel de serpentes do CEVAP é formado atualmente por cerca de 500 animais doados pela Polícia Florestal, Corpo de Bombeiros, Polícia Militar, Vigilância Sanitária e fazendeiros da região de Botucatu. Cabe ressaltar que não são realizadas campanhas para captura dos animais.

O número de serpentes doadas ao CEVAP diminui a cada ano. Devido a esse declínio no recebimento das serpentes, o Setor de Herpetologia percebeu a necessidade de estudos na área de manutenção em cativeiro, com a finalidade de buscar a auto-suficiência.

O objetivo desse estudo foi elaborar uma proposta para a implantação de um programa de manutenção em cativeiro mais eficiente. Para tanto, foi necessário avaliar os diferentes regimes de cativeiros adotados pelo Centro, além de apontar os problemas envolvidos na infra estrutura e manejo utilizados, com a finalidade de aumentar o bem-estar e sobrevivência dos animais e melhorar a qualidade e quantidade de peçonha produzida.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a infra estrutura, o manejo e comparar a microbiota de serpentes peçonhentas mantidas em diferentes regimes de cativeiro no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP, Campus de Botucatu.

### 1.2.1 Objetivos específicos

- Elaborar um sistema de cadastro de serpentes por meio de um Banco de Dados *online*;
- Descrever a estrutura física do serpentário e propor melhorias nas suas instalações;
- Avaliar o manejo das serpentes peçonhentas mantidas em diferentes regimes de cativeiro;
- Identificar e comparar a microbiota bacteriana e leveduriforme presente nas escamas, cavidade cloacal, cavidade oral e peçonha de *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* recém capturadas, e aquelas mantidas em diferentes regimes de cativeiro;
- Identificar por seqüenciamento de rDNA a microbiota leveduriforme presente nas amostras de escamas, cavidade oral, cloacal e peçonha das serpentes mantidas em diferentes regimes de cativeiro;
- Avaliar a susceptibilidade “in vitro” das bactérias isoladas da cavidade oral e peçonha frente a diferentes antimicrobianos;
- Sugerir melhorias no manejo das serpentes mantidas em cativeiro.



### 1.3 REFERÊNCIAS\*

1. Bémils RS. Brazilian reptiles - list of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia 2010. [Acesso em 21 Set 2010]. Disponível em <http://www.sberpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>.
2. Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Junior V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Savier. p. 33-61.
3. Hoser R. A reclassification of the Rattlesnakes: species formerly exclusively referred to the genera *Crotalus* and *Sistrurus*. *Aus J Herpetol.* 2009;6:1-21.
4. Fenwick AM, Gutberlet RL, Evans JA, Parkinson CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoo J Linn Soc.* 2009;156:671-40.
5. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância e Epidemiologia. Guia de vigilância epidemiológica. Acidentes por animais peçonhentos. 2008. p. 5-6.
6. Henriques OB, Fichman M, Beraldo WT. Bradykinin-releasing factor from *Bothrops jararaca* venom. *Nature.* 1960;187:414-5.
7. Devi A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofen V, editors. *Venomous Animals and their Venoms*. New York: Academic Press; 1971. p.129-31.
8. Bieber AI. Metal and nonprotein constituents in snake venom. In: Lee CY, editor. *Snake venoms*. Berlin: Springer; 1979. p 295-306.
9. Bjarnson JB, Fox JW. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J Toxicol Toxin Rev.* 1988;7:121-9.

---

\* Segundo normas de Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

10. Laporta-Ferreira IL, Santos MAS. Comparative analysis of inorganic elements in venoms from three subspecies of *Crotalus durissus* from Brazil J Nat Toxin. 1997;6 Suppl 1:103-10.
11. Wen FH. Soroterapia. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FF, Málaque CMS, Haddad V Jr, editores. Animais Peçonhentos no Brasil. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 380-93.
12. Tibballs J, Sutherland S, Kerr S. Studies on Australian snake venoms. Part 1: The haemodynamic effects of brown snake (*Pseudonaja*) species in the dog. Anaesth Intensive Care. 1989;17(4):466-9.
13. Ménez A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? Toxicon. 1998;36(11):1557-72.
14. Deluca M, Ward CM, Ohmori K, Andrews RK, Berndt MC. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen Receptor,  $\alpha\beta 1$ . Biochem Biophys Res Commun. 1995; 206(2):570-6.
15. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. 2006; 63(24):3030-41.
16. Bustillo S, Leiva LC, Merino L, Acosta O, Bal de Kier Joffé E, Gorodner JO. Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina. Rev Latin Am Microbiol. 2008; 50(3-4):79-82.
17. Juan FC, Thomazini IA, Gianini MJM, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, Barravieira B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. Sao Paulo Med J. 1995;113(5): 1000-2.
18. Barravieira B. O interior do Estado de São Paulo na história dos animais peçonhentos. Em: Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. São Paulo: EPUB; 1999. p.3-6.

Elaboração de um sistema de cadastro  
de serpentes – Banco de dados on line -

---

CAPÍTULO 2

## RESUMO

Um banco de dados biológico tem como principal objetivo integrar e consultar os elementos resultantes de pesquisas de um projeto biológico de forma otimizada. O objetivo desse estudo foi elaborar um sistema de cadastro para as serpentes mantidas no CEVAP, possibilitando o armazenamento, organização, eficiência e rapidez na distribuição e consulta de dados. Para a construção do banco de dados *online* foi utilizado o Sistema Relacional SQL Server e a linguagem ASP. O banco de dados foi baseado nas informações sobre a espécie, procedência e dados biométricos das serpentes. Foram incluídas 786 serpentes, sendo a *Caudisona durissa terrifica* a espécie mais abundante (n=594). As serpentes registradas foram provenientes principalmente da cidade de Botucatu, possivelmente devido à localização do CEVAP. O ambiente de coleta mais registrado para a grande maioria dos viperídeos foi pastagem, provavelmente devido aos tipos de hábitat ocupados por essas espécies. Os meses de Março a Maio apresentaram maior número de registros de serpentes corroborando o pico de atividade da maioria dos viperídeos tropicais. Nos primeiros 12 meses de cativeiro ocorreu alta mortalidade entre as espécies de *Micrurus* spp e *B. jararacussu*, provavelmente devido à síndrome da má adaptação em cativeiro. O cativeiro intensivo foi responsável pelo maior número de óbitos entre *C. d. terrifica*, sugerindo que a ausência de gradientes de temperatura, privação de banhos de sol e o manejo constante expõe as serpentes a permanente estresse crônico, aumentando a mortalidade dos animais nesse sistema. Recordes de longevidade foram observados em *Bothrops moojeni* e *Bothropoides jararaca*. Apesar dos animais que ocupam áreas abertas apresentarem maior tolerância as alterações ambientais, a umidade mantida no serpentário intensivo merece ser reavaliada, pois parece favorecer a longevidade de serpentes encontradas em áreas mais florestadas.

Palavras-chave: banco de dados *online*, serpentes, cativeiro

## 2.1 INTRODUÇÃO

A bioinformática envolve aspectos multidisciplinares, intimamente ligados ao conhecimento biológico, fundamentais no momento atual em que as pesquisas ressaltam o seu valor e utilidade para a Ciência<sup>1</sup>. Suas aplicações são variadas, seja no diagnóstico de doença, desenvolvimento de novos fármacos, ou análise dos dados originados de genomas seqüenciados, a partir da utilização de algoritmos para as seqüências de DNA<sup>1-6</sup>.

A crescente aplicação da tecnologia de informação nas ciências biológicas conduz a uma mudança fundamental na maneira como a pesquisa biológica é realizada<sup>1</sup>. A tendência, portanto, é armazenar informações biológicas brutas de todos os tipos em banco de dados<sup>1-2</sup>.

Normalmente nas coleções biológicas, sejam museus, herbários, bancos de germoplasma e serpentários, as informações ficam armazenadas em fichas e livros de registro e geralmente representam um recurso subutilizado devido a dificuldades para a sua recuperação de forma eficiente<sup>2-6</sup>.

Em estudos realizados na área de toxilogia, os dados biológicos das serpentes são extremamente importantes devido à diferença na composição e atividade das peçonhas ofídicas<sup>7</sup>. Essas diferenças são relatadas por vários autores e pode ser observada em níveis ontogenético<sup>8-11</sup>, sexual<sup>12-14</sup>, geográfico<sup>15,16</sup>, inter e intraespecífico<sup>13,16,17</sup> e pode ser influenciada pelo tempo decorrido entre uma extração de peçonha e a imediatamente anterior<sup>18,19</sup>.

Portanto, o objetivo desse estudo foi elaborar um sistema de cadastro para as serpentes mantidas no CEVAP, possibilitando o armazenamento, organização, eficiência e rapidez na distribuição e consulta de dados. Dessa maneira, foi possível que a peçonha produzida fosse rastreada, viabilizando a disponibilização de venenos certificados, com garantia de origem e qualidade.

## **2.2 OBJETIVO**

O presente capítulo teve como objetivo elaborar um sistema de cadastro de serpentes por meio de um banco de dados *online*, com a finalidade de organizar sistematicamente as informações sobre as serpentes mantidas no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP.

## **2.3 MATERIAL EM MÉTODOS**

### **2.3.1 Banco de Dados *online***

Foi construído um sistema de cadastro de serpentes por meio de um Banco de Dados a fim de possibilitar maior controle de recebimento e óbitos dos animais mantidos nos diferentes setores do CEVAP.

Para a construção do Banco de Dados *online*, foi utilizado o Sistema Gerenciador de Banco de Dados Relacional SQL Server. A criação do banco e suas tabelas foram efetuadas por meio da linguagem ASP. A empresa Visual Informática foi responsável pela elaboração do banco de dados.

O Banco de Dados foi baseado nas informações contidas nas Fichas de Registros utilizadas no processo de cadastramento dos animais. Foram consideradas as informações relacionadas à espécie, procedência, dados biométricos, data de recebimento e coleta, informações sobre o coletor e ambiente de coleta (Figura 2.1).

O sistema foi alimentado diariamente com as informações contidas no livro de Registro de Serpentes que deram entrada no Serpentário no período de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2009.

Espécie	<input type="text"/>
RG	<input type="text"/>
Chip	<input type="text"/>
Sexo	<input type="text"/>
Peso entrada (em gramas)	<input type="text"/>
Peso saída (em gramas)	<input type="text"/>
Comprimento total (em centímetros)	<input type="text"/>
Comprimento de cauda (em centímetros)	<input type="text"/>
Engodo	<input type="text"/>
Data de recebimento	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Recebido por	<input type="text"/>
Data de coleta	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Cidade	<input type="text"/>
Estado	<input type="text"/>
Procedência	<input type="text"/>
Ambiente de coleta	<input type="text"/>
Coletor	<input type="text"/>
Fezse	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Sengue	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Veneno	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Outros	<input type="text"/>
Quarentena 01	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Quarentena 02	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Destino	<input type="text"/>
Óbito	<input type="text" value="00/00/0000"/>
Observações	<input type="text"/>

**Figura 2.1.** Ficha de Informações do Banco de Dados *online* para cadastro das serpentes

### 2.3.2 Análise estatística

Os dados cadastrados no Banco de Dados foram analisados utilizando-se tabelas de frequência absoluta (n) e percentual (%), análise de variância (ANOVA) e teste “t” de Student.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Espécies

No período de estudo, foram incluídas 786 serpentes distribuídas em duas famílias e oito espécies (Tabela 2.1). O ano de 2004 foi responsável pelo maior número de registros para todos os viperídeos analisados. No período de estudo, a *Caudisona durissa terrifica* foi a espécie mais abundante (n=594), seguida de *Bothropoides jararaca* (n=100). A serpente *Micrurus corallinus* foi responsável por um único registro e a *Bothrops jararacussu* por somente dois registros (Tabela 2.2).

**Tabela 2.1.** Espécies de serpentes cadastradas no Banco de Dados entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2009.

Família	Espécie	N	%
Viperidae	<i>Bothropoides jararaca</i>	100	12,72
	<i>Bothropoides pauloensis</i>	50	6,36
	<i>Rhinocerothis alternatus</i>	18	2,3
	<i>Bothrops jararacussu</i>	2	0,25
	<i>Bothrops moojeni</i>	16	2
	<i>Caudisona durissa terrifica</i>	594	75,6
Elapidae	<i>Micrurus corallinus</i>	1	0,12
	<i>Micrurus lemniscatus</i>	5	0,65
<b>TOTAL</b>		<b>786</b>	<b>100</b>

N: número de animais; %: percentagem em relação ao número total de animais

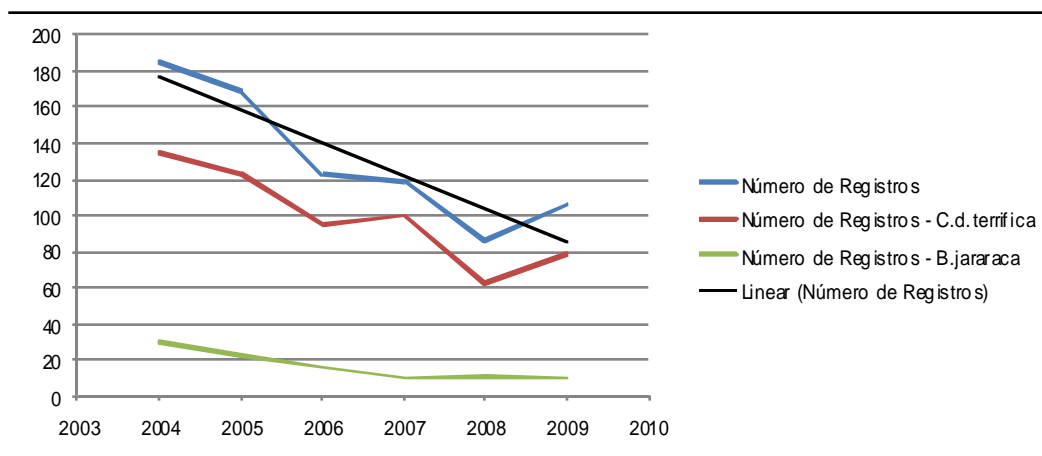


**Tabela 2.2.** Distribuição da frequência absoluta (n) e relativa (%) das espécies de serpentes cadastradas no Banco de Dados entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2009.

Espécies		2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
<i>Bothropoides jararaca</i>	n	30	23	16	10	11	10	100
	%	30	23	16	10	11	10	12,72
<i>Bothropoides pauloensis</i>	n	12	12	8	6	8	4	50
	%	24	24	16	12	16	8	6,36
<i>Bothrops jararacussu</i>	n	1	0	0	0	0	1	2
	%	50	0	0	0	0	50	0,25
<i>Bothrops moojeni</i>	n	5	5	3	1	1	1	16
	%	31,25	31,25	18,75	6,25	6,25	6,25	2,03
<i>Caudisona durissa terrifica</i>	n	134	123	95	100	63	79	594
	%	22,55	20,7	16	16,85	10,6	13,3	75,57
<i>Micrurus corallinus</i>	n	0	0	1	0	0	0	1
	%	0	0	100	0	0	0	0,14
<i>Micrurus lemniscatus</i>	n	0	0	1	1	1	2	5
	%	0	0	20	20	20	40	0,64
<i>Rhinocerophis alternatus</i>	n	6	5	1	3	1	2	18
	%	33,33	27,8	5,55	16,66	5,55	11,11	2,29

n: frequência absoluta; %: frequência percentual

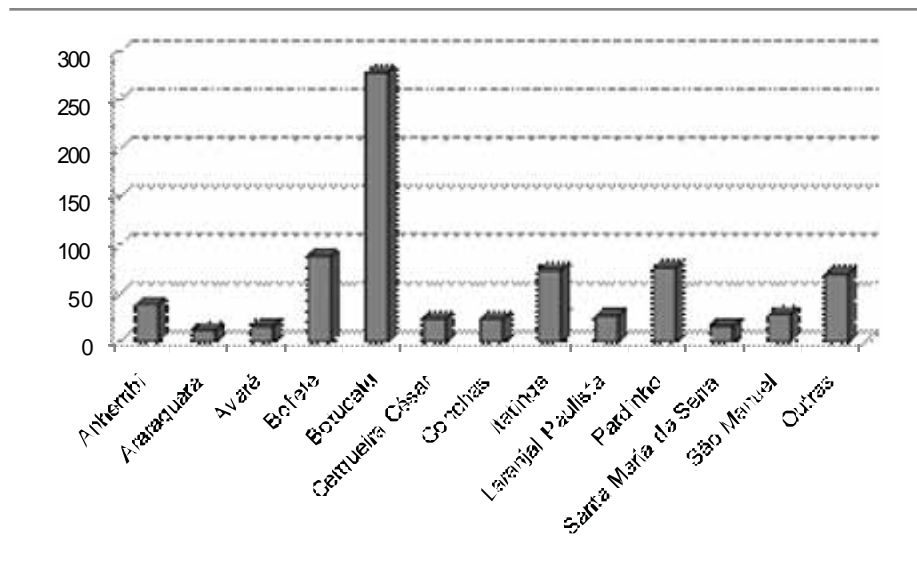
Foi observado ao longo do período de estudo, um declínio anual no número de registros para todos os viperídeos analisados, com destaque para *Bothropoides jararaca* e *Caudisona durissa terrifica* (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Número de registros de serpentes peçonhentas cadastradas no Banco de Dados de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2009.

## 2.4.2 Procedência

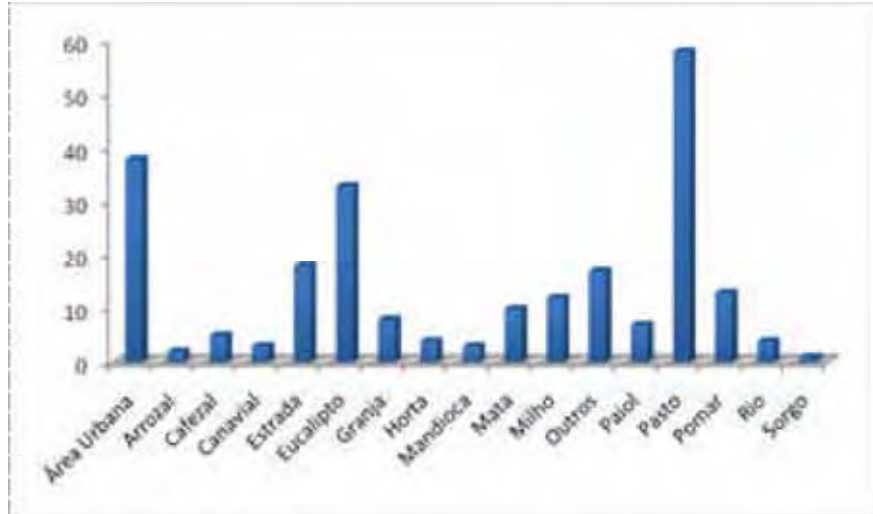
As serpentes registradas foram provenientes de 39 cidades do interior do Estado de São Paulo (Figura 2.3). A cidade de Botucatu foi a mais expressiva no envio, com 279 serpentes, seguida pela cidade de Bofete com 89 e Pardinho com 77 serpentes, respectivamente.



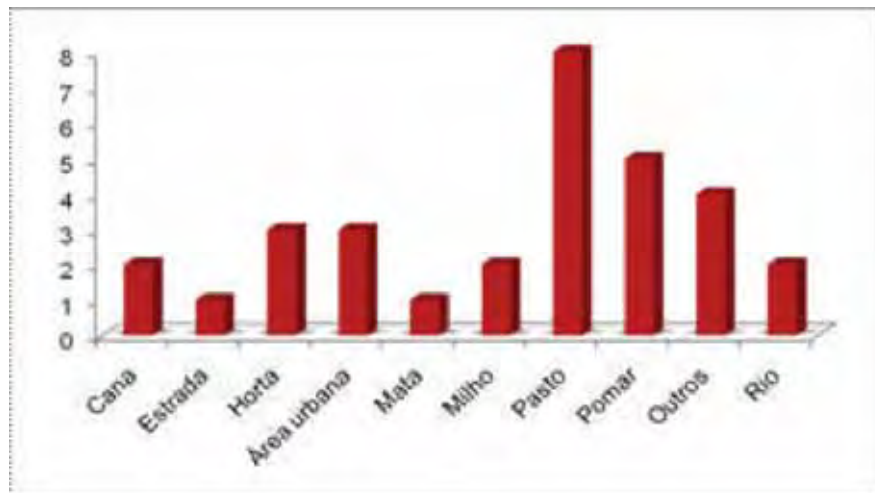
**Figura 2.3.** Procedência das 786 serpentes cadastradas no Banco de Dados.

## 2.4.3 Ambiente de coleta

Foram considerados 300 apontamentos com informações relacionadas ao ambiente de coleta das serpentes. Para a espécie *Caudisona durissa terrifica*, foram analisados 236 registros de ambientes de coleta, sendo áreas de pasto (24,58%) e eucalipto (14%) os mais registrados (Figura 2.4). Para *Bothropoides jararaca* foram considerados 31 registros, sendo áreas de pasto (25,8%) e pomar (16,13%) os mais abundantes (Figura 2.5).



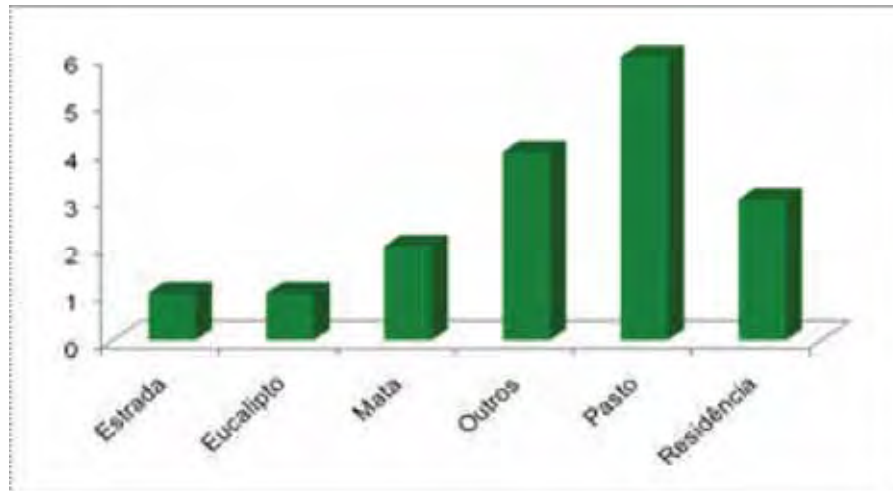
**Figura 2.4.** Percentagem dos ambientes de coleta registrados para *Caudisona durissa terrifica*.



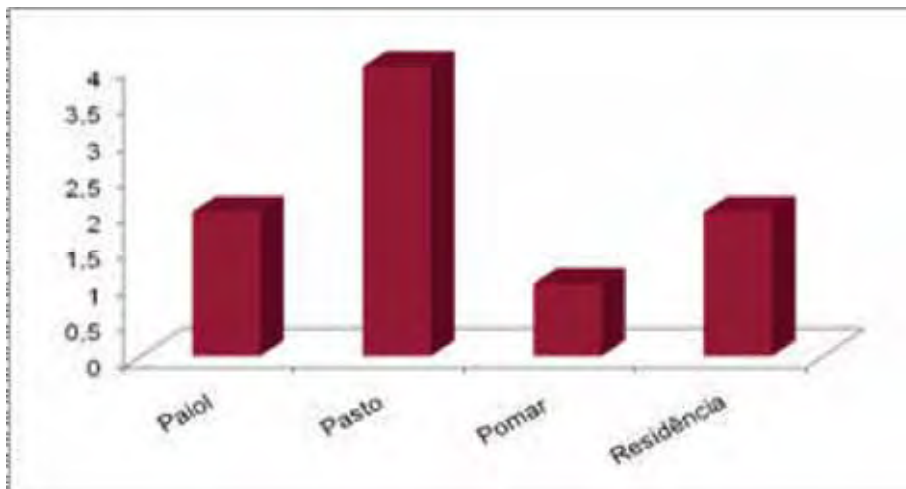
**Figura 2.5.** Percentagem dos ambientes de coleta registrados para *Bothropoides jararaca*.

Foram analisados 17 registros para *Bothropoides pauloensis*, sendo áreas de pasto (35%) e entulho (23,53%) os ambientes mais freqüentes (Figura 2.6). Para as serpentes *Rhinocerophis alternatus*, dos nove registros de ambientes de coleta analisados, áreas de pasto (44,45%), paiol e residência

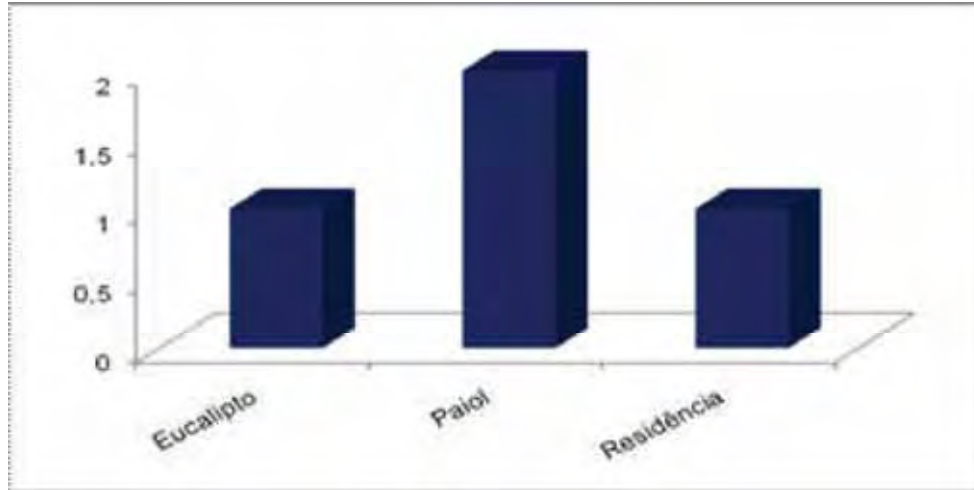
(ambos com 22,22%) foram os mais frequentes (Figura 2.7). Dos quatro registros de ambiente de coleta considerados para *Bothrops moojeni*, foram encontradas áreas de paiol (50%), eucalipto e residência (ambos com 25%) (Figura 2.8).



**Figura 2.6.** Percentagem dos ambientes de coleta registrados para *Bothropoides pauloensis*.



**Figura 2.7.** Percentagem dos ambientes de coleta registrados para *Rhinocerothis alternatus*.

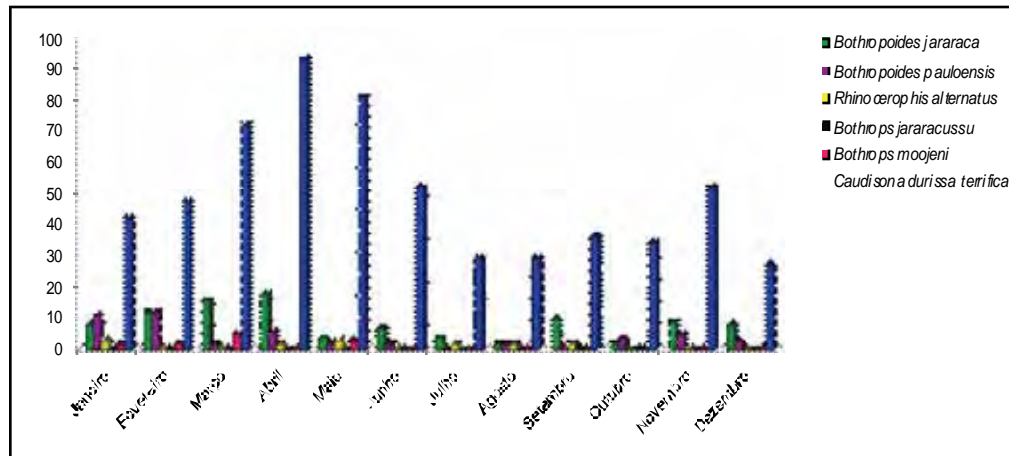


**Figura 2.8.** Percentagem dos ambientes de coleta registrados para *Bothrops moojeni*.

Para serpentes do gênero *Micrurus*, os registros de ambiente de coleta são referentes a áreas de mata. Não foram obtidos registros de ambiente de coleta para serpentes *B. jararacussu*.

#### 2.4.4 Sazonalidade

Os meses de Março, Abril e Maio foram responsáveis pelo maior número de registros de serpentes pertencentes à família Viperidae (Figura 2.9). Os elapídeos foram registrados em Fevereiro (n=2), Março (n=1), Abril (n=1) e Maio (n=2).



**Figura 2.9.** Distribuição sazonal dos viperídeos cadastrados entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2009.

#### 2.4.5 Sexo

No período de estudo, as fêmeas foram responsáveis por 404 (51,4%) dos registros e os machos por 382 registros (48,6%) (Tabela 2.3). O teste “t de Student” e análise de variância (ANOVA) mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de registros de machos e fêmeas de todas as espécies de serpentes (Figura 1 e Tabela 1 - Anexo III).

**Tabela 2.3.** Frequência de machos e fêmeas de serpentes registradas durante o período de estudo.

Espécie	N (♀)	N (♂)	Total
<i>Bothropoides jararaca</i>	55	45	100
<i>Bothropoides pauloensis</i>	30	20	50
<i>Rhinocerophis alternatus</i>	11	7	18
<i>Bothrops jararacussu</i>	2	0	2
<i>Bothrops moojeni</i>	8	8	16
<i>Caudisona durissa terrifica</i>	293	301	594
<i>Micrurus corallinus</i>	1	0	1
<i>Micrurus lemniscatus</i>	4	1	5
<b>Total</b>	<b>404</b>	<b>382</b>	<b>786</b>

N (♀): número de fêmeas; N (♂): número de machos

### 2.4.6 Sobrevida e óbitos

Foram analisados 308 registros referentes aos óbitos das serpentes peçonhentas mantidas em cativeiro intensivo no CEVAP no período de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2009. Foram consideradas somente as fichas com datas de recebimento e óbito contendo dia, mês e ano. A média e a mediana da sobrevida das serpentes analisadas estão descritas na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4.** Média e mediana da sobrevida das serpentes peçonhentas (n=308) mantidas no CEVAP no período de 2004 a 2009.

Serpente	N=308	Média (dias)	Mediana (dias)
<i>Bothropoides jararaca</i>	48	674,37	375
<i>Bothropoides pauloensis</i>	30	541	345
<i>Bothrops jararacussu</i>	2	75	75
<i>Bothrops moojeni</i>	10	891	1020
<i>Caudisona durissa terrifica</i>	199	538,94	360
<i>Micrurus lemniscatus</i>	5	180	180
<i>Rhinocerophis alternatus</i>	14	486,43	255

N: número de animais registrados.

Nos primeiros 12 meses de cativeiro foram observados 52,22% de mortalidade para *C. d. terrifica*, 51,02% para *B. jararaca*, 40% para *B. moojeni*, 53,33% para *B. pauloensis* e 78,57% para *R. alternatus*. Foi observado que 100% das serpentes do gênero *Micrurus* vêm a óbito em um período de seis meses.

Foi analisado o número de óbitos (n=212) que ocorreram entre 2007 e 2009 para *C. d. terrifica* mantida em cativeiro individual e coletivo. Os testes “t de Student” e ANOVA (análise de variância) mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre o número de óbitos, sendo mais freqüente em cativeiro intensivo (Figura 2.11 e Tabela 2 - Anexo III).

Não foi possível a análise do número de óbitos para as demais serpentes devido ao baixo número de dados existentes.

## 2.5 DISCUSSÃO

Um banco de dados é um conjunto de registros dispostos em estrutura regular e pode ser considerada uma coleção de dados inter-relacionados, estruturados e projetados para suprir as necessidades de um grupo específico de aplicações e usuários <sup>1</sup>. Um banco de dados organiza e estrutura as informações de modo a facilitar consultas e atualizações de dados <sup>1</sup>. A organização sistemática dos dados depositados no sistema criado para cadastro de serpentes do CEVAP aperfeiçoou a precisão das buscas de informações, tornando-as disponíveis de forma imediata.

A preponderância da espécie *Caudisona durissa terrifica* nos registros do presente estudo reflete sua predominância na entrada no Serpentário e seu padrão de atividade em campo <sup>20</sup>. Essa superioridade de cascavéis também é observada em outros criadouros científicos da Região Sudeste do Brasil <sup>21</sup>.

A *Bothropoides jararaca* foi a segunda espécie de serpente peçonhenta mais registrada no banco de dados. Dentro do gênero *Bothropoides*, a espécie *B. jararaca* é freqüentemente a espécie mais abundante nos institutos de pesquisa localizados em sua área de dispersão <sup>21</sup>.

O pequeno número de registros de serpentes do gênero *Micrurus* pode ser explicado pelo seu comportamento fossorial e baixa densidade populacional <sup>22,23</sup>. A captura dessas serpentes ocorreu em áreas de mata, corroborando o comportamento discreto desses animais e ocupação de áreas florestadas <sup>22,23</sup>.

A baixa freqüência da espécie *Bothrops jararacussu* pode estar relacionada à sua região de ocorrência, principalmente em áreas de mata fechada, dificultando assim seu encontro, captura e envio <sup>24</sup>.



A redução no número de serpentes registradas registrada nesse estudo também foi observada por pesquisadores do Instituto Butantan<sup>25</sup>. Nas décadas de 50, 60, 70, 80 e 90 foram recebidas 6562, 6045, 4853, 3293, 1898 *Bothropoides jararaca* respectivamente<sup>25</sup>.

O declínio do número de serpentes peçonhentas ocorre no mundo todo<sup>26</sup>. Entre 1970 e 1977 foram coletadas 7330 serpentes da espécie *Crotalus horridus* em Minnesota (EUA), enquanto que entre 1980 e 1987 este número foi reduzido para apenas 1082 serpentes<sup>26</sup>. Reading *et al*, em um estudo realizado na Europa, Austrália e Nigéria, verificou um sério declínio em 11 das 17 populações de serpentes estudadas pertencentes a 8 espécies<sup>27</sup>. Embora as causas desse declínio sejam desconhecidas, acredita-se que este fato esteja relacionado à modificação da paisagem que antigamente era formada por áreas de mata e atualmente foi alterada por monoculturas e áreas de pastagem<sup>26,27</sup>.

A grande maioria das espécies de serpentes das florestas tropicais brasileiras não consegue sobreviver em ambientes alterados como pastos, plantações de diversos tipos ou florestas monoespecíficas para extração de madeira e celulose, como eucaliptais e pinheirais<sup>28</sup>. Por outro lado, algumas espécies parecem se beneficiar da alteração de habitats causada pela ação humana, como é o caso da cascavel (*Crotalus durissus*), cuja distribuição geográfica esta em constante expansão<sup>28,29</sup>.

Os dados analisados apontaram a cidade de Botucatu como principal procedência das serpentes registradas. Essa predominância é provável consequência da localização do CEVAP, facilitando dessa maneira, o acesso dos fornecedores.

O grande número de capturas de *C. d. terrificus* em áreas de pastagem está relacionado ao tipo de habitat ocupado por essa espécie<sup>20,23</sup>. Apesar de estar associada preferencialmente as fitofisionomias abertas, nesse estudo a espécie foi registrada em áreas alteradas com presença de mata, evento

também observado por Bastos *et al*<sup>29</sup>. A intensificação do processo de fragmentação de áreas florestais pode facilitar a ampliação na distribuição e o aumento da densidade populacional de cascavéis<sup>29</sup>. Trata-se de um fato relevante, uma vez que o gênero está associado a aproximadamente 8% dos acidentes causados no Brasil, além de apresentar o maior índice de letalidade entre os acidentes ofídicos registrados<sup>30</sup>.

O ambiente de coleta mais registrado para *B. jararaca*, *B. pauloensis* e *R. alternatus* foi área de pastagem, fato observado para todos os viperídeos descritos nesse estudo, com exceção de *B. moojeni*. Esse fato pode ser explicado pelo tipo de habitat ocupado por essas espécies, que pode variar desde florestas tropicais decíduas até savanas e campos abertos<sup>23,31,32</sup>. Apesar de *B. moojeni* ser a principal espécie de *Bothrops* dos cerrados, o ambiente de coleta mais registrado foi área de paiol, provavelmente devido à disponibilidade de alimento proporcionado por esse ambiente<sup>33</sup>.

A atividade das serpentes depende de fatores associados ao clima, a disponibilidade de alimento ou a aspectos reprodutivos, os quais interferem pelo modo como elas exploram o ambiente<sup>34,35</sup>. Na região tropical o pico de atividade da maioria dos viperídeos é unimodal e ocorre entre abril e maio<sup>20,36,37</sup>, fato que corrobora os dados relacionados à sazonalidade das serpentes registradas nesse estudo.

Em um centro produtor de peçonha, a produção de matéria-prima de boa qualidade é dependente da sobrevivência de cada exemplar mantido em cativeiro<sup>22,38</sup>. Entretanto, muitas vezes são observadas altas taxas de mortalidade das serpentes nos plantéis<sup>38</sup>.

Nesse estudo foi observado que a grande maioria dos viperídeos analisados, 50% dos exemplares vem a óbito nos primeiros 12 meses de cativeiro, enquanto que para serpentes do gênero *Micrurus*, 100% dos animais vem a óbito dentro de um período de seis meses. Langlada<sup>39</sup> verificou que sob algumas condições impostas pelo cativeiro, a sobrevivência média de animais do

gênero *Crotalus* não excedia 70 dias. Leinz *et al*<sup>40</sup>, reportaram o óbito de 50% de *Bothrops jararacussu* nos primeiros seis meses de cativeiro, mesma taxa referida por Serapicos e Merusse<sup>41</sup> para *Micrurus corallinus*.

A alta mortalidade encontrada nos serpentários é apontada por alguns autores, como síndrome da má adaptação em cativeiro<sup>42,43</sup>. Essa síndrome é descrita como uma enfermidade que aflige serpentes mantidas em cativeiro, devido ao estresse prolongado decorrente de um ambiente cativo e recusa de alimentação<sup>44</sup>. Os tecidos tendem a perder a integridade estrutural e diversas enfermidades começam a se manifestar tais como, ulcerações da mucosa oral e entérica, além de ocorrer debilidade alimentar e um aumento dos efeitos de parasitismo<sup>44</sup>. Foi observado que viperídeos norte americanos que não se adaptaram em cativeiro, apresentaram necrose espontânea do pâncreas, seguida de regeneração deficiente<sup>44,45</sup>.

Quanto à longevidade, recordes observados nesse estudo referem-se à *Bothrops moojeni* e *Bothropoides jararaca*. Esses dados discordam dos encontrados por Costa *et al*<sup>38</sup>, onde os maiores registros de longevidade foram observados para serpentes que ocupam principalmente áreas abertas como *Bothropoides erythromelas* e *Caudisona durissa*. Apesar de *C. d. terrifica* apresentar maior tolerância às alterações ambientais, a umidade mantida no serpentário intensivo merece ser reavaliada. A manutenção da umidade em torno de 60% mantida no serpentário interno do CEVAP parece favorecer a longevidade de serpentes encontradas em áreas mais “vegetadas”.

A baixa sobrevivência observada na serpente da espécie *Bothrops jararacussu* corroboram os dados encontrados por Leinz *et al*<sup>40</sup> e diferem dos encontrados por Costa *et al*<sup>38</sup>. Os resultados sugerem que devido à ocupação de áreas mais florestadas, a *B. jararacussu* adapta-se com mais dificuldade ao ambiente artificial do cativeiro.

A sobrevivência observada nesse estudo para *M. lemniscatus* é inferior a encontrada por Oliveira *et al*<sup>46</sup>. As serpentes do gênero *Micrurus* são muito

sensíveis do ponto de vista fisiológico, e, portanto de difícil manutenção em cativeiro.

O grande número de óbitos registrados no cativeiro intensivo em relação ao semi-extensivo difere dos resultados observados por outros autores<sup>19,47</sup>. Normalmente, os óbitos são menos frequentes em cativeiro intensivo devido ao maior controle da umidade, temperatura e alimentação<sup>47</sup>.

Os resultados desse estudo sugerem que devido à ausência de gradientes de temperatura, impedindo a termorregulação<sup>19,48</sup>, privação de banhos de sol e o manejo constante do cativeiro intensivo, expõe as serpentes em constante estresse crônico, aumentando a mortalidade dos animais nesse sistema<sup>49,50</sup>.

Morgan & Tromborg<sup>51</sup> citam a redução de espaço, temperatura subótima, umidade e substrato inadequados como potenciais fontes de estresse crônico. Enquanto o estresse agudo é considerado adaptativo, capacitando os animais para escapar do perigo, o stress crônico por tempo prolongado pode afetar o bem estar dos animais mantidos em cativeiro<sup>52</sup>. O stress crônico pode suprimir ciclos reprodutivos<sup>53</sup>, respostas imunes<sup>49,54</sup>, reduzir a razão de crescimento, além de acarretar redução de peso<sup>53</sup>.

Portanto, os resultados da análise do Banco de Dados permitem sugerir que o sistema aplicado no manejo dos animais mantidos em cativeiro semi-extensivo no CEVAP é mais indicado para a manutenção de serpentes *Caudisona durissa terrificca*. Estudos futuros são necessários para a avaliação do melhor sistema de manutenção para outras espécies de viperídeos.

## 2.6 REFERÊNCIAS \*

1. Ami SF. Do laboratório ao campo virtual: desenvolvimento de um banco de dados de venenos de serpentes brasileiras e análise computacional das estruturas primárias de fosfolipases A2 [Dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006.
2. Cure JR, Dutra RRC. Organização de bancos de dados zoológicos. Rev Bras Biol. 1990;7(4):445-57.
3. Cure JR, Laroca S. Programa Fortran para manipulação de dados em ecologia de comunidades animais. Dusenía. 1984;14(4):211-7.
4. Durcan T, Meacham CA. Multiple entry keys for the identification of Angiosperms families using microcomputer. Taxon. 1986B;35(3):492-4.
5. Knutson L, Thompson FC, Carlson RW. Biosystematics and biological control information systems in entomology. Apic Zool Rev. 1987;2:361-412.
6. Krombein IV, Mello IF, Crockett JI. The North American hymenoptera catalog: a pioneering effort in computerized publication. Bull Ent Soc Amer. 1974;20(1):24-9.
7. Cominetti MR, Pontes CLS, Souza DHF. Métodos cromatográficos e critérios de pureza. In: Selistre de Araújo HS, Souza DHF. Editores. Métodos em toxicologia: toxinas de serpentes. São Carlos: EdUFSCar; 2007. p.11-23.
8. Mackessy SP. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). Comp Biochem Physiol. 1993;106B(Suppl 1):181-89.
9. Andrade DV, Abe A. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. Herpetologica. 1999;55:200-4.
10. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Gutierrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* snake venoms from Colombia. Toxicon. 2003;42:405-11.
11. Zelanis A, Ventura JS, Cudzinski-Tavassi AM, Furtado MFD. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases. An ontogenetic approach. Comp Biochem Physiol. 2007;145C: 601-609.
12. Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. Nature. 1996;379:537-40.

---

\* Segundo normas de Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

13. Daltry JC, Ponnundurai G, Shin CK, Tan NH, Thorpe RS, Wuster W. Electrophoretic profiles and biological activities: intraespecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*. 1996;34:67-79.
14. Furtado MFD, Travaglia-Cardoso Sr, Rocha MMT. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon*. 2006;48:401-10.
15. Perrone MAL, Siles Vilarroel M, Furtado MFD. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfológicamente duvidosas. *Mem Inst Butantan*. 1989;51(Suppl 1):25-32.
16. Santoro ML, Souza-e-Silva MCC, Gonçalves LRC, Almeida-Santos SM, Cardoso DF, Laporta Ferreira IL, *et al.* Comparison of the biological activities in venom from three subspecies of South America rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol*. 1999;122C:61-73.
17. Chippaux JP, Willians V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991;29:1279-303.
18. Furtado MFD, Colletto GMDD, Dias da Silva W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos e de algumas espécies dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem Inst Butantan*. 1991;53(Suppl 2):149-59.
19. Melgarejo-Gimenez AR. Criação e manejo de serpentes. In: Andrade A, Pinto SR, Oliveira RS, editores. *Animais de laboratório - criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2006. p.175-200.
20. Salomão GM, Almeida-Santos SM, Puerto G. Activity pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae) feeding, reproduction and snake bite. *Studies Neotrop Fauna Environ*. 1995;30(2):101-6.
21. Grazzidin FB. Estudo filogeográfico de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) baseado no DNA mitocondrial (Squamata: Serpentes: Viperidae) [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências; 2004.
22. Oliveira L, Almeida-Santos SM, Costa ACOR, Scartozzoni RR, Germano VJ, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: A longevidade do gênero *Micruurus*. *Publ Av Inst Pau-Brasil Hist Nat*. 2005;8-9:55-61.
23. Melgarejo-Gimenez AR. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FF, Málaque CMS, Haddad V Jr, editores. *Animais Peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.33-61.

24. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the western hemisphere. Lanceheads: Genus *Bothrops*. New York: Cornell University Press; 2004. p.334-409.
25. Grego KF. Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae) [Tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2006.
26. Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the western hemisphere. Rattlesnakes. New York: Cornell University Press; 2004. p.504-5.
27. Reading CJ, Luiselli LM, Akani GC, Bonnet X, Amori G, Ballouard JM, *et al.* Are snake populations in widespread decline? Biol Lett. In Press. 2010.
28. Martins M, Mdina FB. Panorama geral dos répteis ameaçados de extinção. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editores. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília: Fundação Biodiversitas; 2008. p.327-34.
29. Bastos EGM, Araujo AFB, Silva HR. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. Rev Bras Zool. 2005;22(3):812-5.
30. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância e Epidemiologia. Boletim eletrônico epidemiológico. Acidentes por animais peçonhentos. Ofidismo. 2010;(2):17-8.
31. Hoge AR. Poisonous snakes of the world. Part 1: Checklist of the pitvipers, Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. Mem Inst Butantan. 1981;42-43:179-309.
32. Campbell JA, Lamar W. The Venomous Reptiles of Latin America. Ithaca: Cornell University Press; 1989. p.180-220.
33. Puerto G, Laporta-Ferreira IL, Sazima I. Serpentes na selva de pedra. Ciência Hoje. 1991;13(76):66-7.
34. Gibbons JW, Semlitsch RD. Activity patterns. In: Seigel RA, Collins JT, Novak SS, editors. Snakes: Ecology and evolutionary biology. New York: McMillan Publishing Company; 1987. p.396-421.
35. Reinert HK. Habitat selection in snakes. In: Seigel RA, Collins JT, Novak SS, editors. Snakes: Ecology and evolutionary biology. New York: McMillan Publishing Company; 1993. p. 201-204.
36. Sazima I. Natural history of the jararaca pit viper, *Bothrops jararaca*, in southeaster Brazil. In: Campbell J, Brodie Jr ED, editors. Biology of the Pitvipers. Texas: Selva Press; 1992 p.199-216.
37. Hartmann MT, Marques OAV. Reproductive biology of the Southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). Amphibia-Reptilia. 2004;25:77-85.

38. Costa ACOR, Almeida-Santos SM, Germano VJ, Oliveira L, Scartozzoni RR, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: a longevidade dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. *Publ Av Inst Pau-Brasil Hist Nat*. 2005;8-9:63-8.
39. Langlada F. Ciclo sexual bienal de serpentes *Crotalus* do Brasil. *Comprovação*. *Mem Inst Butantan*. 1972;36:67-72.
40. Leinz FF, Janeiro-Cinquini TRF, Ishizuka MM, Lang LV. Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) mantidas em cativeiro. *Mem Inst Butantan*. 1989;51(Suppl 1): 33-8.
41. Serapicos EO, Merusse JLB. Relationship between the capture, seasons and death of coral snakes - *Micrurus corallinus* (Reptilia-Ophidia-Elapidae). *Mem Inst Butantan*. 2000;59:236-8.
42. Frye FL. *Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry*. Florida: Krieger Publishing; 1991. p.423-33.
43. Serapicos EO, Casagrande RA, Matushima ER, Merusse JLB. Alterações macro e microscópicas observadas em serpentes *Micrurus corallinus* mantidas em biotério (Reptilia – Ophidia – Elapidae). *Rev Port Cienc Vet*. 2005;100(553-554);71-4.
44. Cowan DF. Diseases of captive reptiles. *J American Vet Med Assoc*. 1968;153: 848-59.
45. Murphy JB, Armstrong BL. Diseases, infections and treatments. In: *Maintenance of rattlesnakes in captivity*. Lawrence: University of Kansas Printing Service; 1978. p.6-24.
46. Oliveira L, Almeida-Santos SM, Costa ACOR, Scartozzoni RR, Germano VJ, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: a longevidade do gênero *Micrurus*. *Publ Av Inst Pau-Brasil Hist Nat*. 2005;8-9:55-61.
47. Belluomini HE. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. Comparação dos resultados entre serpentário exposto e aquecido. *Arq Inst Bid*. 1964;31(4): 149-54.
48. Jim J, Sakate M. Biologia das serpentes. In: Benedito Barraviera, editor. *Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos*. Rio de Janeiro: EPUB; 1999. p.109-34.
49. Barnett JL, Hems worth PH, Hennessey DP, Mc Callum TH, Newman EA. The effects of modifying the amount of human contact and behavioral, physiological, and production responses of laying hens. *Appl Anim Behav Sci*. 1994;41: 87-100
50. Ferrante V, Canali E, Mattiello S, Verga M, Sacerdote P, Manfredi B, *et al*. Preliminary study on the effect of size of individual stall on the behavioral and immune reactions of dairy calves. *J Anim Feed Sci*. 1998;7(1):29-36.
51. Morgan KN, Tromborg CT. Sources of stress in captivity. *Appl Anim Behav Sci*. 2007;102:262-302.
52. Sapolsky R. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: the current state of confusion. *Stress*. 1996;1: 1-11.



- 53.** Chrousos GP. The neuroendocrinology of stress: its relation to the hormonal milieu, growth, and development. *Growth Genet Hormones*. 1997;13:1-8.
- 54.** Barnett JL, Hems worth PH, Hennessey DP, Mc Callum TH, Newman EA. The effects of modifying the amount of human contact and behavioral, physiological, and production responses of laying hens. *Appl Anim Behav Sci*. 1994;41: 87-100.

Avaliação da Infra estrutura e Manejo

---

Capítulo 3

## RESUMO

Devido à grande importância do manejo na sobrevivência de serpentes em cativeiro, o objetivo desse estudo foi avaliar a infra estrutura e o manejo de diferentes sistemas adotados pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP). Para a avaliação da infra estrutura, considerou-se o tamanho das instalações, materiais e equipamentos utilizados na construção dos serpentários e biotérios. Na avaliação do manejo foram utilizados dados relacionados à alimentação das serpentes e roedores, temperatura e umidade nos serpentários e biotério, metodologia de extração de peçonha e controle sanitário dos diferentes setores. O cativeiro intensivo apesar de proporcionar facilidade na vistoria dos animais necessita de modificações nas estruturas das estantes e a instalação de mecanismos de controle de temperatura e umidade. No cativeiro semi-extensivo, as instalações além de atenderem todos os requisitos estruturais e de segurança, facilitam o manejo dos animais, necessitando apenas de adequações nos aquecedores. O tempo de quarentena de 270 dias é considerado adequado, embora exames clínicos sejam necessários para evitar a introdução de doenças no plantel principal. O manejo alimentar é apropriado, sendo recomendado o controle de peso do alimento oferecido. A metodologia utilizada na extração de peçonha é segura para o animal e para o extrator, além de permitir estudos individualizados. A marcação das serpentes por microchipagem possibilita a identificação das serpentes mantidas em cativeiro semi-extensivo. No biotério de roedores é recomendado o controle de temperatura e umidade, autoclavagem da ração e maravalha, além do tratamento da água oferecida aos animais. Deve ser considerada a implantação de um sistema de gestão ambiental, para que seja estabelecido um compromisso com a causa da conservação do meio ambiente.

Palavras-chave: infra estrutura, manejo, cativeiro, serpentes

### 3.1 INTRODUÇÃO

A experiência do Brasil é pioneira na criação de serpentes para produção de peçonhas e foi iniciada nos primeiros anos do século XX <sup>1-2</sup>. Apesar do pioneirismo do Brasil na criação de serpentes em cativeiro para essa finalidade, apenas um reduzido número de autores tem abordado cientificamente a montagem e a importância da manutenção de serpentários para a produção de peçonhas <sup>3-7</sup>.

A manutenção de um biotério de serpentes envolve a captura de animais na natureza, infra estrutura de custo elevado, técnicas de manejo adequadas e profissionais especializados <sup>8,9</sup>. Para que ocorra sucesso na manutenção desses animais, além de fatores estruturais e logísticos, é necessário um conhecimento mínimo sobre o habitat, a dieta e a reprodução de cada espécie de serpente em particular <sup>3,10</sup>.

Devido ao grande potencial farmacológico das peçonhas, a criação de serpentes em cativeiro visando à obtenção de veneno, vem tornando-se atividade cada vez mais relevante <sup>3</sup>. Dessa maneira, os serpentários vêm enfrentando o desafio de aprimorar a manutenção desses animais, a fim de se obter uma maior sobrevivência do plantel <sup>11,12</sup>, já que as principais causas de óbitos em serpentes cativas estão relacionadas ao manejo inadequado <sup>13-15</sup>.

Devido à grande importância do manejo na sobrevivência de serpentes em cativeiro, o objetivo desse estudo foi avaliar a infra estrutura e o manejo de diferentes sistemas adotados pelo CEVAP, com a finalidade de identificar os pontos deficientes da manutenção, visando à melhoria na qualidade de vida dos animais e na qualidade de peçonha produzida.

### **3.2 OBJETIVOS**

O presente capítulo teve como objetivos:

- Avaliar a infra estrutura do serpentário (setores de triagem, quarentenários e diferentes sistemas de cativeiro);
- Avaliar o manejo das serpentes peçonhentas mantidas em diferentes regimes de cativeiro;
- Avaliar a infra estrutura e o manejo do Biotério de roedores;
- Sugerir melhorias na infra estrutura e manejo desses diferentes setores.

### **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.1 Avaliação da Infra estrutura do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)**

Para a avaliação da infra estrutura, considerou-se o tamanho das instalações, tipo de piso, vedação de portas, sistemas de aquecimento, ventilação e luminosidade, densidade de animais, segurança dos equipamentos e materiais utilizados.

#### **3.3.2 Manejo dos Serpentários e Biotério de roedores do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)**

Para a avaliação do manejo das serpentes foram utilizados dados relacionados à recepção dos animais, manipulação (metodologia e instrumentos utilizados), manutenção (temperatura, umidade, frequência de alimentação), metodologia para a extração de peçonha, microchipagem e

controle sanitário (higienização e desinfecção) do quarentenário e serpentários intensivo e semi-extensivo do CEVAP.

Para a avaliação do manejo no biotério de roedores foram utilizados dados relacionados à reprodução e manutenção dos animais (temperatura, umidade e frequência de alimentação) do CEVAP.

### **3.3.3 Recursos Humanos**

Para a avaliação dos recursos humanos considerou-se a formação profissional e a familiaridade da equipe com os comportamentos das serpentes.

### **3.4 RESULTADOS**

#### **3.4.1 Infraestrutura**

Foi observado que até a finalização desse estudo (22 de Dezembro de 2009), o plantel do CEVAP era composto de 450 serpentes peçonhentas destinadas à produção de peçonha.

As instalações do Serpentário do CEVAP são constituídas pelos setores de Triagem e Quarentenários, Biotério de roedores, Serpentário Semi-extensivo e Serpentário Intensivo.

##### **3.4.1.1 Sala de Triagem**

A Sala de Triagem do CEVAP é localizada junto ao Quarentenário e apresenta piso frio, azulejos até o teto e bancadas de granito.

##### **3.4.1.2 Quarentenário**

O Quarentenário do CEVAP é dividido em três setores: Quarentena 1 (Q1) e Quarentena 2 (Q2) e Quarentena 3 (Q3).

As salas são revestidas com piso frio e azulejos até o teto. A temperatura do local é mantida por aquecedores externos (resistência cônica 220V). As portas dos setores não apresentam visor e a vedação é ineficiente.

No quarentenário, as serpentes são mantidas em estantes de aço, individualizadas em caixas de polipropileno. As caixas variam de 45 x 32 x 28 cm, 34 x 22 x 12 cm e 56 x 37 x 24 cm, dependendo do tamanho da serpente. O número de estantes mantidas no Quarentenário não é suficiente para alojar o

número de serpentes existentes em cada sala. As estantes não apresentam estabilidade e alguns animais ficam sobrepostos nas prateleiras, acima da altura dos técnicos.

Foi observado que as instalações do Quarentenário são pequenas para o número de serpentes mantidas no local, além de ficarem localizadas muito próximas ao Serpentário Semi-extensivo (distância inferior a 10 metros).

As caixas utilizadas para o acondicionamento de serpentes no Quarentenário e Serpentário Intensivo foram consideradas seguras e de fácil manutenção. Por serem transparentes permitiram rápida vistoria, mas o sistema de ventilação foi considerado ineficiente.

Não foram observados mecanismos de controle de fotoperíodo nas salas.

### 3.4.1.3 Serpentário Intensivo

O Serpentário Intensivo do CEVAP abriga serpentes de forma individualizada, sendo dividido em três salas, cada uma com aproximadamente 70m<sup>2</sup>. A Sala 1 abriga animais jovens de diferentes espécies, a Sala 2 abriga serpentes do gênero *Caudisona* e a Sala 3 abriga espécies pertencentes ao “grupo *Bothrops*” (*Bothropoides jararaca*, *Bothropoides pauloensis*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*) (Figura 3.1 A).

As salas possuem piso frio e azulejos até o teto. As portas dos setores não apresentam visor e a vedação é ineficiente. A temperatura do local é fornecida por aquecedores externos (resistência cônica 220V) (Figura 3.1 B).

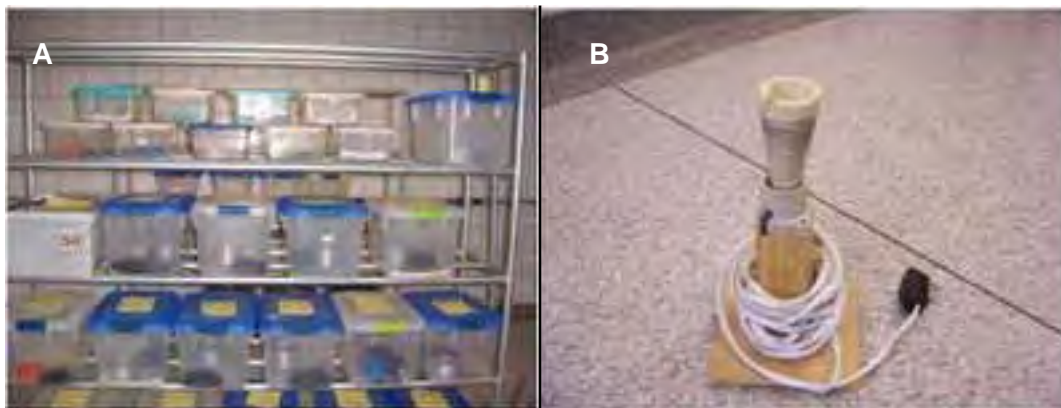
As serpentes são mantidas em estantes, acondicionadas em caixas de polipropileno, de maneira individual. As caixas variam de 45 x 32 x 28 cm, 34 x 22 x 12 cm e 56 x 37 x 24 cm, dependendo do tamanho da serpente. O número de estantes mantidas nas salas do Serpentário Intensivo não é suficiente para



alojar o número de serpentes existentes em cada sala. Foi observado que 10% das serpentes mantidas na Sala 1 (juvenis) e aproximadamente 20% das serpentes mantidas na Sala 2 (*Caudisona*) ficam alojadas no chão. As estantes não apresentam estabilidade e alguns animais ficam sobrepostos nas prateleiras, acima da altura dos técnicos.

As caixas utilizadas para o acondicionamento de serpentes no Quarentenário e Serpentário Intensivo são consideradas seguras e de fácil manutenção. Por serem transparentes permitem rápida vistoria, mas não são dotadas de um bom sistema de ventilação.

Não foram observados mecanismos de controle de fotoperíodo nas salas.



**Figuras 3.1 A-B.** Estrutura do Serpentário Intensivo do CEVAP. **A.** Sala 2 (grupo “*Bothrops*”) mostrando serpentes mantidas em caixas de polipropileno. **B.** Resistência cônica de 220V utilizada com o aquecedor externo.

#### 3.4.1.4 Serpentário Semi-Extensivo

O Serpentário Semi-extensivo, também chamado de cativeiro coletivo, é composto de oito recintos, sendo seis ocupados por serpentes e dois reservados para a rodízio no contr de sanitário. Os recintos são divididos em área externa (5,5 x 3,1 m) e área interna (5,5 x 2,2m). A área externa é construída

de alvenaria, com muros lisos de 1,5 m de altura e cobertura em tela metálica, forrados com grama, bebedouro com água corrente (1,3 x 0,56m) e abrigo de telhas de fibrocimento (2,8 x 1,2) (Figura 3.2 A). A área interna é construída em cimento, forrada com maravalha e com aquecedores (2 x 0,3m) contendo quatro lâmpadas de 60 W cada (Figura 3.2 B). Estas duas áreas são comunicáveis por meio de uma porta que pode ser trancada durante a manutenção dos animais.



**Figuras 3.2 A-B.** Estrutura do Serpentário Semi-extensivo do CEVAP. **A.** Área externa. **B.** Área interna.

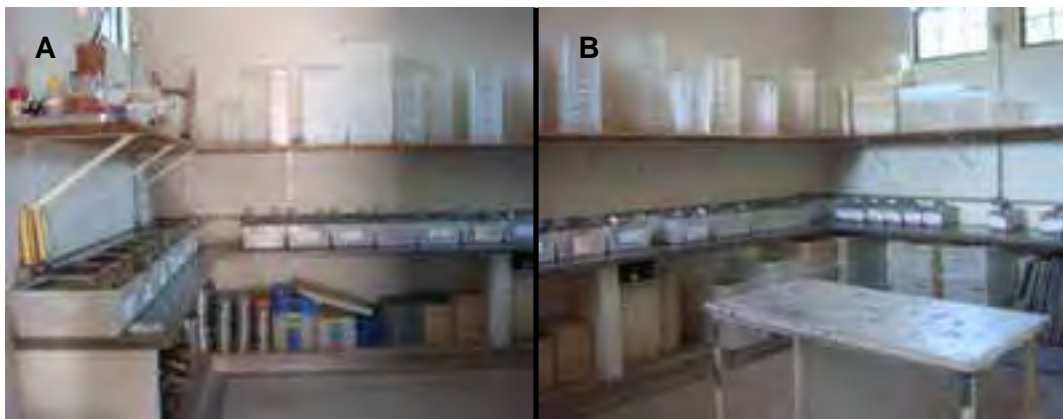
#### 3.4.1.5 Biotério de roedores

O Biotério de roedores do CEVAP é dividido em salas de criação e recebimento de animais e setor de lavagem. A sala de criação também é utilizada para o armazenamento de material do próprio biotério e do Serpentário Semi-extensivo.

Foi constatado que o setor de lavagem fica muito próximo a sala de criação do biotério (dois metros de distância) e a higienização das caixas de serpentes e do biotério são realizadas no mesmo local.

A sala de criação apresenta bancada de granito e estantes de madeira utilizadas para o armazenamento de material. A temperatura das salas é proporcionada por aquecedores externos (resistências cônicas de 220 V). Não foi observado sistema de ventilação mecânica nesse setor. (Figuras 3.3 A e 3.3 B).

As matrizes dos roedores são mantidas em caixas de polipropileno com dimensões de 30 x 20 x 13 cm ou 41 x 34 x 16 cm, dependendo do tamanho do roedor. Todas as caixas apresentaram grades de aço-inox.



**Figuras 3.3 A-B.** Sala do Biotério de roedores do CEVAP. **A.** Caixas de animais nas bancadas de granito. **B.** Armazenamento de materiais

### 3.4.2 Recursos Humanos

O CEVAP conta atualmente com um pesquisador, dois técnicos de laboratório, um pós-doutorando, quatro pós-graduandos lato sensu e oito pós-graduandos em níveis de mestrado e doutorado. Efetivamente apenas seis profissionais das áreas de biologia, veterinária e zootecnia se envolvem com a manutenção das serpentes uma vez que deve-se obedecer rigorosas normas além do risco no manejo.

### 3.4.3 Manejo dos Serpentários

#### 3.4.3.1 Material usado no manejo das serpentes

No manejo das serpentes são utilizados ganchos herpetológicos com haste de madeira para a manipulação dos animais. Os ganchos apresentam entre 70 e 150 cm, dependendo do tamanho da serpente manipulada. Os ganchos utilizados permitem manipulação do animal com segurança e praticidade (Figuras 3.4 A e 3.4 B).



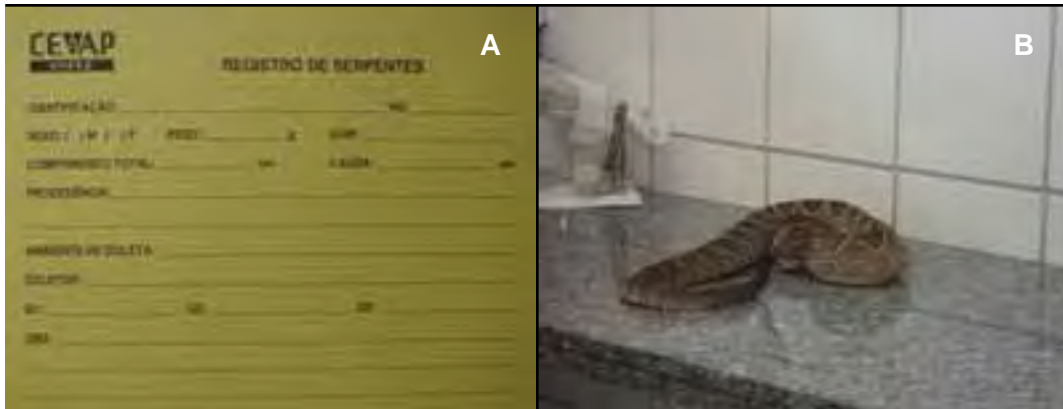
**Figuras 3.4 A-B.** Manipulação de serpentes peçonhentas. **A.** Manejo de *Rhinocerophis alternatus* com gancho de 1,50m. **B.** Manejo de *Bothropoides jararaca* com gancho de 0,70 m.

#### 3.4.3.2 Triagem

A sala de triagem do CEVAP é localizada junto ao Quarentenário e destinada ao recebimento e triagem dos animais recém chegados da natureza.

As serpentes recém chegadas recebem uma ficha de identificação, na qual são armazenados dados sobre a procedência do animal, data e ambiente de coleta, data de recebimento e número de registro da serpente (Figuras 3.5 A e 3.5 B).

Após o registro na sala de triagem, o animal passa por uma avaliação clínica, sendo considerada a condição corpórea (desenvolvimento da musculatura axial e palpação das costelas), presença de lesões e hidratação da serpente. Após a avaliação, as serpentes são encaminhadas para o Quarentenário.



**Figuras 3.5 A-B.** Sala de triagem do CEVAP. **A.** Ficha de identificação de serpentes. **B.** Preparação de *Caudisona durissima terrifica* para a avaliação clínica.

### 3.4.3.3 Quarentenário

O Quarentenário do CEVAP é dividido em três setores: Quarentena 1 (Q1), Quarentena 2 (Q2) e Quarentena (Q3). Em cada setor o animal permanece em observação durante 90 dias, totalizando no mínimo, 270 dias de quarentena.

No Quarentenário, as serpentes são mantidas em caixas de polipropileno de maneira individual. As caixas são forradas com jornal e água *ad libitum*. A inspeção é realizada diariamente, sendo as caixas trocadas quando necessário.

A temperatura do local é mantida entre 25°C e 28°C, umidade relativa em torno de 60% e fotoperíodo de oito horas de claro e 16 horas de escuro. Foi

observado que nos meses mais frios, apesar dos aquecedores, a temperatura mantida no Quarentenário chegou a 20°C.

Após o processo de registro, as serpentes permanecem um período de no mínimo 90 dias na Quarentena 1 (Q1). Nesse período, são armazenados na ficha de registro dados relacionados ao comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cauda (CC), peso e sexo do animal. A contenção das serpentes para a coleta de dados biométricos é realizada com o auxílio de ganchos e tubos de polipropileno (Figuras 3.6 A e 3.6 B).

Para controle de endoparasitas e ectoparasitas, todas as serpentes passam por vermifugação com Ivermectina (Ivomec®) (0,2 mg/Kg intramuscular – duas doses, com o intervalo de 15 dias) e banho de imersão em água morna para controle de ectoparasitas, além de borrifar uma solução de Tridorfon 0,02% (Neguvon®) nos animais quando necessário.

Durante o período de permanência na Q1, Q2 e Q3, também são observados a frequência alimentar, defecação e ecdise.



**Figuras 3.6 A-B.** Coleta de dados biométricos das serpentes recém-chegadas. **A.** Imobilização de serpente peçonhenta para obtenção de dados biométricos. **B.** Contenção em tubo de polipropileno.



### 3.4.3.4 Serpentário Intensivo

No Serpentário Intensivo, também chamado de individual, os animais são mantidos em estantes, individualizados em caixas de polipropileno transparentes dependendo do tamanho do animal. As caixas são forradas com jornal, sendo oferecidos 100 mL de água em bebedouros de polipropileno para evitar o excesso de umidade com a movimentação da serpente (Figura 3.7 A e 3.7 B). As caixas são inspecionadas diariamente e trocadas quando necessário.

Apesar da pouca quantidade de água mantida nos bebedouros, alguns animais em especial as serpentes *C. d. terrifica* ficam constantemente úmidos, surgindo em alguns casos, lesões esbranquiçadas (sugestivas de micose) nas escamas das serpentes.

Foi observado que nos meses mais frios, a temperatura mantida no Serpentário Intensivo chegou a 20°C, apesar do uso dos aquecedores.

Nos meses mais quentes, a umidade mantida no Serpentário Intensivo foi considerada elevada para a Sala 2 (serpentes do gênero *Caudisona*).



**Figuras 3.7 A-B.** Manejo realizado no Serpentário Intensivo. **A.** *Rhinocerophis alternatus* mantida individualizada em cativeiro intensivo. **B.** *Caudisona durissa terrifica* em caixa de polipropileno forrada com jornal e recipiente com água.

### 3.4.3.5 Serpentário Sem i-extensivo

O Serpentário Semi-extensivo, também chamado de coletivo, é composto de oito recintos, sendo seis ocupados por serpentes e dois reservados para rodízio no contrde sanitário. Os recintos são divididos em área interna, forrada com maravalha e com aquecedores (Figura 3.8 A) e área externa, forrada com grama, bebedouro com água corrente e abrigo de telhas de fibrocimento (Figura 3.8 B).

A temperatura e o fotoperíodo são proporcionados pelo clima natural. O aquecedor da área interna proporciona aumento de 5°C de temperatura em relação à fornecida pelo ambiente natural.

A manutenção do Serpentário Semi-extensivo é realizada cada 15 dias, sendo retiradas sobras de pele e fezes. Esse período é reduzido ou aumentado quando necessário.

Foi observado que o número de serpentes mantido nesses recintos não interfere nos procedimentos de limpeza e alimentação. Na alimentação dos animais, as serpentes são separadas em diferentes pontos do recinto para que ocorra melhor distribuição do alimento e para evitar a disputa das serpentes pelo mesmo roedor.

O aquecedor mantido na parte externa apesar de fornecer aquecimento, altera o fotoperíodo dos animais nos meses frios, devido à permanência constante das serpentes sob a luz do aquecedor.





**Figuras 3.8 A-B.** Manejo realizado no Serpentário Semi-extensivo. **A.** Área interna do cativeiro semi-extensivo com aquecedores. **B.** Área externa do cativeiro semi-extensivo com abrigo e bebedouro de água corrente. As setas vermelhas indicam a conexão entre os dois setores.

#### 3.4.3.6 Alimentação das serpentes

A alimentação dos animais do plantel normal (serpentes não incluídas em projetos de pesquisa) é oferecida mensalmente (um roedor não pesado por serpente), sendo constituída por camundongos (*Mus musculus*), ratos (*Rattus norvegicus*) ou gerbils (*Meriones unguiculatus*) de acordo com o tamanho da serpente (não pesados). A alimentação dos animais do plantel de pesquisa é seguida de acordo com o protocolo estipulado para cada estudo.

Foi observado que, se o animal recusava o alimento, era oferecido um roedor de outra espécie, ou de tamanho diferente. Foi constatado que os animais mantidos no quarentenário (principalmente na Q1) recusaram o alimento com frequência.

Alguns espécimes de *Caudisoma durissa terrifica* mantidos tanto em cativeiro intensivo (n=2) quanto no semi-extensivo (n=5), e um espécime de *Bothrops moojeni* mantida em cativeiro intensivo apresentaram regurgito crônico. Não foi realizado nenhum exame clínico para diagnosticar a causa.

A alimentação forçada é utilizada somente no caso de filhotes. Para os filhotes de *Bothropoides jararaca* e *Bothropoides pauloensis* são usados pedaços de girinos introduzidos na cavidade oral da serpente. No caso de *Bothrops jararacussu*, é utilizado ração felina pastosa administrada por meio de sonda gástrica.

Foi observado que nos sete primeiros dias após a alimentação das serpentes, o manejo e a circulação de pessoas no quarentenário e serpentário intensivo são evitados. Durante esse período são trocadas apenas caixas com grande quantidade de fezes e extremamente úmidas.

#### **3.4.3.7 Rotina de extração de peçonha**

As serpentes são submetidas a extrações de peçonha a cada 30 ou 45 dias, dependendo das pesquisas realizadas no Centro. Os animais são submetidos à hipóxia com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por um período de 4 a 12 minutos, dependendo do tamanho da serpente. Os animais são acondicionados em caixas de polipropileno transparentes para facilitar a visualização da sedação do animal. Após a dormência da serpente, o animal é contido com o apoio suave de gancho herpetológico.

Apesar de alguns exemplares apresentarem hemorragia discreta na mucosa oral, não foi observada nenhuma enfermidade nas serpentes submetidas à extração.

A extração de peçonha dos animais mantidos em cativeiro individual ocorre na Sala de Extração localizada no Serpentário Intensivo. A extração dos animais mantidos na Quarentena e no Serpentário Semi-extensivo é realizada no Biotério de Roedores.

O processo de extração de peçonha é realizado por três pessoas (extrator, auxiliar de coleta e auxiliar de sedação). A peçonha é coletada por

meio de compressão suave das glândulas (Figura 3.9 A). São utilizados prendedores de madeira com cabo longo e microtubos estéreis de 1,5 mL ou 2 mL, dependendo do tamanho do animal. Nesse processo, o esgotamento completo das glândulas de peçonha foi evitado.

Após o procedimento de extração, a peçonha extraída é armazenada em sacola térmica a 4°C e os animais são devolvidos em suas respectivas caixas. Em seguida, o veneno é armazenado a -18°C para posterior liofilização (Figura 3.9 B).

No período de estudo, não foram registrados animais com estomatites e não ocorreram óbitos durante o processo de hipóxia que antecede a extração de peçonha.

A metodologia aplicada permitiu o aproveitamento máximo da peçonha extraída, sem que ocorressem danos aos animais.



**Figuras 3.9 A-B.** A. Metodologia de extração utilizada no CEVAP. A. Coleta de peçonha em microtubos. B. Microtubos de 1,5 mL com peçonhas congeladas preparadas para a liofilização.

### 3.4.3.8 Microchipagem dos animais

Todos os animais do CEVAP são microchipados após 270 dias de quarentena. O microchip (transponder) é encapsulado em biovidro 8625, possui 12 mm de comprimento, 2 mm de diâmetro e seqüência única de 15 dígitos (Figura 3.10). O microchip é implantado por via subcutânea com auxílio de aplicador, no lado esquerdo do último terço do corpo da serpente. Filhotes de serpentes e animais com peso inferior a 40 gramas não são microchipados devido a baixa quantidade de musculatura axial capaz de manter o microchip.



**Figura 3.10.** Microchip utilizado para marcação individual das serpentes.  
Fonte: AnimalTag® (imagem ampliada).

### 3.4.4 Manejo do Biotério de Roedores

O biotério de roedores do CEVAP é caracterizado como biotério convencional destinado à alimentação das serpentes. Eventualmente alguns animais são utilizados em experimentos relacionados às diferentes atividades das peçonhas ofídicas.

A temperatura é mantida entre 25°C ( $\pm 2$ ), com umidade relativa de 60%. O fotoperíodo adotado foi oito horas de claro e 16 horas de escuro.

Os animais mantidos no biotério são considerados “outbred” (linhagens geneticamente heterozigotas para muitos dos pares de alelos). Os roedores pertencem às espécies, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Meriones unguiculatus* (Figuras 3.11 A, 3.11 B e 3.11 C).



**Figuras 3.11 A.C.** Roedores mantidos no Biotério do CEVAP. **A.** *Mus musculus*. **B.** *Rattus norvegicus*. **C.** *Meriones unguiculatus*.

As matrizes são formadas por duas fêmeas e um macho por caixa. Os acasalamentos realizados no biotério seguem esquemas pré-definidos (duas fêmeas para cada macho) e são realizados de acordo com a necessidade de reposição de cada grupo. Cada caixa apresenta fichas com informações sobre a data de formação da matriz, a data de nascimento dos filhotes e data do desmame.

Foi observado que os insumos (maravalha e ração) utilizados no biotério não passam por processo de autoclavagem. A forragem da cama dos animais é constituída de serragem grossa de *Pinus* não esterilizada. A água é oferecida em mamadeiras de vidro de 500 mL, e, apesar de potável, não é submetida a tratamento específico.

A ração oferecida é específica para animais de biotério, em forma de *pellets* (Labina®), com 10 mm de diâmetro e níveis adequados de vitamina C

estabilizada, dispensando suplementação. A quantidade de ração oferecida é de 25 a 40g por animal.

Os animais provenientes do desmame foram separados por sexo e mantidos em caixas de 41 x 34 x 16 cm, com no máximo 20 animais.

A manutenção das caixas é realizada três vezes por semana, onde são trocadas a cama dos animais (maravalha) e a mamadeira de água. A manipulação dos animais é realizada com luvas cirúrgicas estéreis, sem o auxílio de pinça.

Foram encontrados alguns exemplares (6% das caixas de matrizes) de *Mus musculus* com áreas do corpo sem pelagem e *Meriones urguiculatus* com lesões no focinho (20% das caixas de matrizes).

A criação dos roedores apresenta princípios básicos de higiene nos quais se procede à limpeza e desinfecção do ambiente e material utilizado. Quanto ao pessoal técnico, é usado jaleco para o trabalho com os animais.

### **3.4.5 Manejo sanitário**

#### **3.4.5.1 Higienização do material utilizado no manejo das serpentes**

No manejo das serpentes os tratadores utilizam luvas cirúrgicas estéreis e jalecos. Entre o manejo dos animais, os ganchos herpetológicos são mergulhados em solução de Iodophor 0,08% (Biofor®). Foi observado que esse procedimento não é realizado nos ganchos utilizados no manejo das serpentes alojadas no Serpentário Semi-extensivo.

### 3.4.5.2 Pedilúvios

No Quarentenário e Serpentário Intensivo são adotados pedilúvios como barreiras de redução de contaminação de vetores.

Os pedilúvios são fixados nas entradas das Quarentenas Q1 e Q3, e Serpentário Intensivo. A higienização dos calçados nessa solução é obrigatória. Para a circulação o Serpentário Intensivo, além do pedilúvio, é necessário a troca do calçado por botas de polipropileno (Figuras 3.12 A e 3.12 B). Foi observado que os pedilúvios são trocados semanalmente.



**Figuras 3.12 A-B.** Pedilúvios utilizados no manejo sanitário. **A.** Pedilúvio na entrada do cativeiro intensivo do CEVAP. **B.** Pedilúvio na entrada da quarentena (Q3) do CEVAP.

### 3.4.5.3 Higienização do Quarentenário e Serpentário Intensivo

A higienização do Serpentário Intensivo é realizada a cada sete dias ou quando necessário. A higienização das salas é iniciada com limpeza seca, sendo lavadas a cada sete dias com água, sabão e hipoclorito de sódio (produto comercial na diluição de 1:5).



#### 3.4.5.4 Higienização do Serpentário Semi-extensivo

A higienização do Serpentário Semi-extensivo é realizada a cada 15-20 dias, com a lavagem dos bebedouros com água e sabão e lavadora de alta pressão.

A cada três meses é realizado um rodízio entre os recintos para a realização da vassoura de fogo (agente físico), higienização dos bebedouros com hipoclorito de sódio (agente químico) e vazão sanitário (agente químico) de 45 dias, totalizando uma intervenção sanitária pelo menos uma vez por ano em cada recinto (Figuras 3.13 A e 3.13 B).



**Figuras 3.13 A-B.** Agente físico (vassoura de fogo) utilizado no manejo sanitário do Serpentário Semi-extensivo

#### 3.4.5.5 Higienização do Biotério de roedores

A limpeza do biotério é realizada três vezes por semana, após a manutenção das caixas de criação. As salas são higienizadas com álcool três vezes por semana e lavadas com água, sabão e hipoclorito de sódio (produto comercial na diluição de 1:5) a cada sete dias.



### **3.4.5.6 Higienização das caixas provenientes do Serpentário Intensivo e Biotério**

A higienização das caixas de serpentes e roedores é realizada no setor de lavagem. As caixas são higienizadas com água, detergente e desinfetadas com hipoclorito de sódio (produto comercial na diluição de 1:5). As caixas de serpentes do Serpentário Intensivo são lavadas nas próprias salas das serpentes.

### **3.4.6 Descarte do lixo**

#### **3.4.6.1 Material proveniente das atividades veterinárias**

Os materiais sólidos provenientes do atendimento laboratorial (seringas, agulhas, algodão, papel toalha) são depositados em sacos plásticos brancos com o status de lixo contaminado e destinados a coleta seletiva hospitalar oferecida pelo departamento municipal de limpeza urbana.

O material perfurante/cortante (lâminas de bisturi e de vidro) é acondicionado em caixas padronizadas de papelão para descarte de material biológico contaminado e destinado a coleta seletiva hospitalar.

#### **3.4.6.2 Material proveniente das camas de roedores e caixas das serpentes**

O material proveniente das camas dos roedores, Serpentário Intensivo e Semi-extensivo é depositado em sacos plásticos brancos com o status de lixo contaminado e destinados a coleta seletiva hospitalar oferecida pelo departamento municipal de limpeza urbana.

### **3.4.6.3 Carcaças de animais**

Após a necropsia, os animais não incluídos em coleção científica são depositados em sacos plásticos brancos com o status de lixo contaminado e destinados a coleta seletiva hospitalar oferecida pelo departamento municipal de limpeza urbana.

### 3.5 DISCUSSÃO

Para criar ou manter serpentes em cativeiro é necessário que a infra estrutura do serpentário esteja direcionada as necessidades básicas dos animais <sup>3,4</sup>. Segundo Melgarejo, a área física de um serpentário deve apresentar algumas características indispensáveis para permitir tanto o conforto dos animais quanto a segurança da equipe de tratadores. A área física ideal depende do tipo do regime de cativeiro adotado e do número de animais a serem criados <sup>3</sup>.

Diferentemente do que ocorre com os biotérios para mamíferos (roedores, cães, didelídeos e primatas não-humanos), a área física dos serpentários destinados a produção de peçonha não possuem regras para as suas instalações <sup>17</sup>. Normalmente os serpentários apresentam somente biotérios de roedores, quarentenários e salas de manutenção e criação de serpentes <sup>3,18,19</sup>.

No CEVAP, as instalações divididas em triagem, biotério, sala de extração, quarentenários e diferentes regimes de cativeiro visam à independência desses setores quanto á estrutura física, pessoal e material, a fim de prover maior segurança e menor risco de contaminações.

A sala de triagem do CEVAP é localizada no início das instalações para que somente os animais recém chegados da natureza tenham acesso a essa área, sem necessidade de passar pelos outros ambientes do serpentário.

A importância das instalações da quarentena em criadouros comerciais, científicos e zoológicos é ressaltada por diversos autores <sup>20-22</sup>. Apesar de não existir uma legislação que especifique a estrutura de um quarentenário, há um consenso sobre o isolamento da área, construções com paredes e pisos de fácil limpeza e higienização, além da presença de pontos de energia <sup>21</sup>.

Em criadouros de aves e suínos, recomenda-se que as instalações da quarentena devem ficar distantes pelo menos 500 metros da área de produção,

e de preferência utilizar barreira física entre ambas <sup>20</sup>. Em zoológicos, a distância recomendada entre a quarentena e os recintos de exposição é de no mínimo 50 metros <sup>23</sup>. Apesar de diversos autores recomendarem que o quarentenário e a coleção principal de serpentes devem ficar distantes, nenhum autor informa qual a distância mínima adequada <sup>20,24,25</sup>. Se for considerada a mesma distância recomendável para zoológicos, o quarentenário do CEVAP está localizado muito próximo ao plantel de serpentes, além de não possuir barreira física entre esses setores.

As serpentes podem ser mantidas em dois sistemas de cativeiro: o semi-extensivo, onde os ofídios são mantidos coletivamente, em áreas abertas limitadas, e o intensivo, onde os animais são confinados em caixas individuais <sup>3,5</sup>. A escolha do sistema de manutenção depende principalmente do objetivo da criação e da localização geográfica do serpentário <sup>3-5</sup>.

O sistema semi-extensivo é apropriado para estabelecer o manejo de monoculturas de serpentes por períodos longos, quando se dispõe de uma área extensa, situada dentro da distribuição da espécie em questão <sup>3</sup>. O sistema intensivo é utilizado na criação de um variado número de espécies, provenientes de diversos climas, em uma área reduzida <sup>3,6</sup>.

Os serpentários semi-extensivos devem possuir gramado, fonte de água, abrigos para as serpentes, e áreas destinadas ao manejo <sup>6</sup>. Os serpentários intensivos devem possuir salas revestidas com pisos lisos de fácil manutenção, portas com visores e boa vedação, além de estantes laváveis com rodízios e eficiente estabilidade para evitar acidentes <sup>3</sup>.

No serpentário do CEVAP, os dois sistemas de cativeiro são adotados. No Serpentário Intensivo o tipo de piso é liso, não poroso, sem rodapés e de fácil higienização. Em contrapartida, as portas não possuem visor, nem fechamentos com boa vedação.

As estantes mantidas no Serpentário Intensivo do CEVAP são instáveis, sem rodízios e de número reduzido. É recomendável que as estantes

apresentem três ou quatro fileiras horizontais de caixas que devem ser acomodadas na altura dos membros da equipe<sup>3,18</sup>. O empilhamento de caixas é desaconselhável, pois dificulta a ventilação das caixas, além de aumentar o índice de acidentes.

O número de serpentes por sala no presente estudo chegou a ultrapassar 100 animais mantidos empilhados nas prateleiras das estantes e acondicionados no chão. O serpentário do Instituto Vital Brasil ocupa de 80 a 100 serpentes por sala, mas todas alojadas em estantes<sup>3</sup>. Leloup<sup>5</sup> recomenda o máximo de 50 serpentes por sala a fim de evitar doenças transmissíveis. É recomendável, portanto, a diminuição do número de serpentes por sala ou a aquisição de novas estantes.

As caixas utilizadas no Serpentário Intensivo devem ser construídas com material resistente, com amplo acesso, de fácil desinfecção e sistema de fechamento eficiente<sup>26,27</sup>. As caixas de serpentes de polipropileno utilizadas no CEVAP possuem todos os requisitos básicos para o acondicionamento de serpentes, além de proporcionar rápida vistoria dos animais. As desvantagens estão na acomodação nas prateleiras e na deficiência na ventilação.

No Serpentário Semi-extensivo, as instalações além de atenderem todos os requisitos estruturais e de segurança, facilitam o manejo dos animais. As portas entre a área externa e interna permitem o manejo adequado das serpentes. O revestimento de alvenaria na área interna e a grama utilizada na área externa permitem fácil higienização do local.

Como nos serpentários, as instalações de qualquer biotério de roedores devem ser projetadas de forma a atender às recomendações para criação e/ou manutenção dos animais, bem como as necessidades particulares de cada instituição<sup>17,28</sup>. Como regra geral, recomenda-se que a instalação de um biotério seja dividida em áreas destinadas ao quarentenário, salas de criação, depósitos de materiais, corredores de distribuição e recolhimento, laboratórios

e setores de higienização e esterilização<sup>28</sup>. Todos os setores devem possuir paredes e pisos lisos de fácil manutenção<sup>17</sup>.

O biotério de criação de roedores do CEVAP possui paredes e pisos de superfície lisa, impermeável, não absorvente e resistente a agentes químicos, sendo considerado apropriado nesses requisitos<sup>17</sup>. A divisão entre setores somente entre salas de criação e higienização é prejudicial ao bom funcionamento do biotério devido à proximidade desses setores.

A sala de criação do biotério de roedores é também utilizada para o armazenamento de caixas e insumos. O armazenamento de material nas dependências do biotério deve ser descartado a fim de diminuir o trânsito de pessoas, evitando o aumento do nível de ruídos no local, que pode proporcionar stress nas colônias<sup>29</sup>.

Além de instalações adequadas, o sucesso da manutenção de um plantel de serpentes destinado à produção de peçonha está diretamente relacionado ao manejo empregado<sup>11,12,14,15</sup>. Para uma boa operacionalização de um serpentário, são de fundamental importância a existência de equipamentos apropriados e setores com protocolos de rotina bem definidos<sup>27</sup>.

O trabalho de um serpentário deve ser realizado por uma equipe familiarizada com os comportamentos e as necessidades básicas das serpentes<sup>3-7</sup>. Desse modo, são evitadas atitudes que produzam reações agressivas ou defensivas que possam colocar em risco o bom andamento da rotina<sup>3,26</sup>.

Os instrumentos utilizados no manejo das serpentes precisam ser práticos e proporcionar segurança ao tratador e ao animal<sup>27</sup>. O gancho herpetológico é o instrumento tradicional utilizado no manuseio das serpentes e permite levantar, transportar e imobilizar o animal com muita praticidade<sup>30</sup>. O comprimento do gancho deve ser apropriado para o tamanho da serpente e deve estar de acordo com a área disponível da sala<sup>30</sup>. Os ganchos utilizados

no manejo das serpentes do CEVAP são práticos, eficientes, além de possuir baixo custo.

O setor de triagem em criadouros tem como objetivos realizar a investigação das condições físicas dos animais, providenciar adequado tratamento veterinário inicial e orientar o destino dado para cada indivíduo<sup>21</sup>. No CEVAP, o setor de triagem funciona como uma etapa inicial de quarentena.

A quarentena tem o propósito de possibilitar a detecção dos animais que podem apresentar doenças com período de incubação curto, e sinais clínicos de doenças que apresentam períodos longos de incubação<sup>31-34</sup>.

O período mínimo de quarentena recomendado para répteis é de 90 dias<sup>24,27,32,34</sup>. Devido à natureza ectotérmica das serpentes, alguns agentes patogênicos podem se manifestar após um ano da entrada no serpentário<sup>27,35</sup>. Alguns autores recomendam um período de 180 dias devido à alta prevalência de doenças virais<sup>24,32,35</sup>.

Durante o período que a serpente passa no quarentenário, medidas profiláticas devem ser instituídas, como exames coproparasitológicos para identificação de *Salmonella* sp, *Cryptosporidium* sp, *Amoeba* sp, exames hematológicos, sorologia para *Paramixovirus* sp, e controle de ectoparasitas com acaricida<sup>18,19,27,34</sup>. Além disso, todos os animais recém incluídos no quarentenário devem possuir acompanhamento na frequência de alimentação, ganho de peso e trocas de pele<sup>21,24,34</sup>.

No quarentenário do CEVAP, as serpentes ficam em observação por um período além do recomendado pela maioria dos autores<sup>18,24,27,32,34</sup>. São administrados medicamentos para endo e ectoparasitas e a frequência de alimentação e ecdise é supervisionada. Em contrapartida, não há realização de exames laboratoriais. Essa atitude é prejudicial para o serpentário, pois pode proporcionar a introdução de agentes capazes de dizimar todo o plantel estabelecido<sup>34,35</sup>.

O sistema intensivo é o tipo de manejo mais empregado entre os serpentários <sup>4,18,19</sup>. Esse sistema proporciona facilidade na vigilância dos animais em relação à alimentação, reprodução, e controle de fatores ambientais como temperatura e umidade <sup>3,4,18</sup>.

No cativeiro intensivo, um substrato apropriado forrando o piso da caixa da serpente é extremamente importante para o conforto do animal <sup>25</sup>. A finalidade do substrato é manter a umidade, proporcionar suporte físico e segurança psicológica ao animal <sup>21,30</sup>. Frequentemente os serpentários utilizam maravalha, jornal ou papelão ondulado como substrato <sup>25,26,36</sup>. Nas caixas de serpentes do CEVAP é utilizado jornal. Para proporcionar maior conforto e diminuir o estresse dos filhotes em geral e serpentes fossoriais, é recomendável o uso de refúgios como tijolo oco, canudo de papel ou vaso de planta vazado <sup>36</sup>.

Alguns autores recomendam o uso de um recipiente com água limpa em cada caixa de serpente <sup>19,37</sup>. A permanência de um recipiente com água auxilia nas trocas de pele, devido à umidade e a presença de um substrato rígido e rugoso que permite o atrito necessário para que ocorra a liberação da pele <sup>26</sup>. Foi observado nesse estudo que apesar da pouca quantidade de água nos bebedouros, alguns animais ficam constantemente úmidos, tornando a caixa imprópria para o animal. Como as serpentes são animais que geralmente bebem pouca água, a retirada do bebedouro por períodos curtos pode diminuir a umidade da caixa e a frequência do manejo, sem causar prejuízos ao animal.

A temperatura e a umidade são os principais fatores que podem influenciar na capacidade das serpentes se ajustarem ao ambiente do cativeiro <sup>21,25,26</sup>. Índices de temperatura e umidade inadequados podem proporcionar o surgimento de inúmeras doenças, diminuindo dessa maneira, a sobrevivência dos animais nos serpentários <sup>36,38</sup>.

As serpentes são animais ectotérmicos, dependendo, portanto, de fonte de calor externo para regular funções como alimentação, assimilação de



nutrientes e reprodução <sup>21,26</sup>. Temperaturas abaixo de 25°C não são recomendáveis, pois podem causar stress fisiológico, podendo alterar a digestão e o apetite, além de causar problemas respiratórios e imunossupressão <sup>39,40</sup>.

A umidade relativa do ar recomendada difere entre as espécies de serpentes <sup>25,27,41</sup>. A umidade em torno de 60% é recomendada para espécies como *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides pauloensis*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Rhinocerophis alternatus* <sup>25,40</sup>. Para *Caudisona durissa terrifica*, a umidade relativa recomendada é inferior a 30% e para *Lachesis muta*, ultrapassa 70% <sup>25</sup>. A umidade relativa inferior a recomendada causa desidratação e disecdises (trocas de peles imperfeitas) <sup>16,40</sup>, enquanto que a umidade acima do ideal pode proporcionar a proliferação de fungos e bactérias, além de ser extremamente deletéria para a maioria dos répteis <sup>41</sup>.

No cativeiro intensivo do CEVAP, as resistências cônicas mantêm a temperatura entre 22°C e 28°C, além de retirar a umidade do ambiente. A umidade relativa do ar mantida em 60% para todas as espécies deve ser reconsiderada, devido à umidade excessiva observada nas caixas de serpentes *C. d. terrifica*. É recomendável, portanto, mecanismos de controle que mantenham umidade adequada para cada sala e a temperatura acima de 25°C.

O manejo semi-extensivo foi o primeiro regime de cativeiro empregado no início da criação dos serpentários para produção de peçonha <sup>1</sup>. O mais famoso serpentário semi-extensivo foi construído em 1911 por Vital Brazil, na tentativa de recriar as condições ecológicas do habitat das serpentes <sup>2</sup>. Esse serpentário apesar de oferecer áreas para banho de sol, água, sombra e abrigos, não proporcionava boa sobrevivência às serpentes <sup>3</sup>.

Apesar da alta mortalidade de serpentes observada no início da criação do serpentário semi-extensivo, esse sistema pode ser utilizado com grande

sucesso, desde que as instalações sejam adequadas e as necessidades biológicas das espécies de serpentes sejam atendidas <sup>7</sup>.

Esse tipo de sistema permite que as serpentes aproveitem elementos naturais como sol, chuvas, ventos, e os espaços amplos possibilitam a termorregulação e movimentação desses animais <sup>3,7</sup>.

A termorregulação nas serpentes é uma atividade realizada por meio de posturas comportamentais como achatamento, inclinação, enrolamento ou extensão do corpo, permitindo troca de temperatura entre a serpente e o ambiente <sup>42</sup>. A importância da termorregulação na vida das serpentes varia conforme sua espécie, relações filogenéticas, distribuição geográfica e fatores fisiológicos <sup>43-45</sup>.

Anteriormente acreditava-se que os répteis conservassem a sua temperatura corporal próxima a uma temperatura ótima fixa <sup>46</sup>. Atualmente é conhecido que as diversas atividades desempenhadas por esses animais têm diferentes temperaturas ótimas <sup>47,48</sup>. A possibilidade de termorregular pode proporcionar as serpentes maior sucesso na digestão, reprodução e defesa <sup>49,50</sup>. Além disso, devido à manutenção de muitos animais no sistema semi-extensivo, o comportamento social de agregação pode modificar a interação entre superfície e meio, e há evidências de que algumas agregações são termorreguladoras <sup>42</sup>.

As desvantagens do sistema semi-extensivo estão relacionadas à necessidade de grandes áreas para a instalação dos serpentários e ao clima, que deve ser o mesmo, ou muito semelhante ao ambiente nativo das serpentes que serão criadas <sup>7</sup>.

A manutenção adequada da temperatura é o maior problema enfrentado pelo manejo semi-extensivo <sup>3</sup>. Temperaturas muito baixas impedem a atividade normal das enzimas gástricas, pancreáticas e hepáticas, e mesmo nos répteis mais adaptados ao cativeiro, ocorre alterações no apetite, digestão e assimilação da dieta <sup>38,39</sup>. Nos dias mais frios do inverno, apesar do uso do

aquecedor, a temperatura das baias do CEVAP dificilmente ultrapassa 20°C. A adiçãõ de novos aquecedores com o objetivo de proporcionar um aumento na temperatura, e o fechamento das portas de comunicaçãõ entre as áreas interna e externa devem ser considerados.

Embora a manutençãõ da umidade seja considerada um dos principais problemas encontrados nos serpentários <sup>25,27,16</sup>, no sistema semi-extensivo esse problema dificilmente é enfrentado, já que a umidade é proporcionada pelo ambiente natural <sup>7</sup>. No CEVAP, a umidade mantida no cativeiro semi-extensivo é suplementada pelos bebedouros de água corrente.

Além da temperatura e umidade, o fotoperíodo tem um papel fundamental na manutençãõ de serpentes e répteis em geral <sup>16,51</sup>. Alguns autores sugerem que o fotoperíodo pode influenciar diretamente o processo reprodutivo e outros processos fisiológicos sazonais <sup>51,52</sup>. O fotoperíodo inapropriado pode resultar na recusa do alimento, vitelogêneses anormais, granulomas, tumores, obesidade, além de tornar as serpentes mais susceptíveis ao stress, podendo acarretar supressãõ na resposta inflamatória e na produçãõ de anticorpos <sup>40,53</sup>.

Os aquecedores mantidos no Serpentário Semi-extensivo precisam ser adaptados para que a luminosidade não permaneça constante nas 24 horas do dia, evitando a alteraçãõ do fotoperíodo das serpentes mantidas nesse sistema.

O manejo alimentar inapropriado e o descuido na qualidade da dieta oferecida para as serpentes mantidas em cativeiro podem causar doenças e até mesmo óbitos nesses animais <sup>39,54</sup>.

O trato gastrointestinal das serpentes é simples e relativamente curto, quando comparado a outros répteis <sup>40</sup>. Devido a esta singular anatomia, é extremamente importante que as serpentes sejam providas de uma dieta balanceada e de alta qualidade em cativeiro, para que possam maximizar a absorçãõ de nutrientes <sup>26,40</sup>.

A frequência da alimentação das serpentes varia com a idade e depende da rotina do serpentário <sup>26</sup>. Normalmente são oferecidos roedores *Mus musculus* ou *Rattus norvegicus*, cujo tamanho, peso e quantidade são determinados conforme a necessidade de cada serpente <sup>3,18,19</sup>. No serpentário do CEVAP, além dessas duas espécies, são oferecidos roedores da espécie *Meriones unguiculatus*.

Apesar dos roedores não serem pesados antes da alimentação das serpentes mantidas no CEVAP, é oferecido somente um roedor por mês, para se evitar a obesidade <sup>18</sup>.

A obesidade é uma doença não infecciosa frequentemente diagnosticada em serpentes mantidas em cativeiro <sup>40,26,54</sup>. A falta de movimentação devido à permanência no cativeiro intensivo, aliado a superalimentação, traz sérios riscos à saúde das serpentes <sup>26</sup>. Alguns autores recomendam de 10 a 20% do peso do animal em alimento por mês, a fim de se evitar a obesidade <sup>18,19,40</sup>.

Além da obesidade, a anorexia e a regurgitação são distúrbios normalmente observados em cativeiro <sup>54</sup>. A anorexia é definida como falta de apetite ou falta de resposta alimentar <sup>16</sup>. É considerada como um sinal clínico relacionada à gastroenterites causada por parasitismo, vírus, fungos, bactérias, abscessos orais, estomatites necróticas, normalmente provenientes de um manejo inadequado <sup>55</sup>. Nos serpentários, normalmente a anorexia é proporcionada pelo estresse causado na adaptação da serpente ao ambiente do cativeiro <sup>26,55</sup>.

Para a determinação da verdadeira causa da anorexia é recomendável a realização de exames coproparasitológicos e hemograma completo <sup>55</sup>. Em alguns casos, a alimentação forçada é recomendada para a recuperação do animal <sup>54,56</sup>.

A regurgitação também é considerada como um sinal clínico associado a importantes doenças e ao manejo inadequado <sup>55</sup>. Regurgitos são comuns em

serpentes mantidas em ambientes com temperaturas baixas ou quando a queda da temperatura noturna é muito brusca<sup>16</sup>. Excessivo manejo pós-prandial, itens inapropriados, endoparasitas e estresse não específico também podem causar regurgitos em serpentes<sup>16,40</sup>.

Portanto, a interrupção do manejo adotado pelo CEVAP nos primeiros sete dias após a alimentação das serpentes mantidas em cativeiro intensivo é uma prática altamente recomendada para evitar a regurgitação. Recomenda-se a realização de exames clínicos nos animais com regurgitação crônica para evitar perdas no plantel.

O manejo seguro das serpentes durante o procedimento de extração de peçonha está entre as prioridades dos serpentários produtores de soros e imunobiológicos<sup>57</sup>. Esses centros produtores estão sempre em busca de novas técnicas que minimizem os riscos e facilitem a execução dessa tarefa<sup>58</sup>.

A contenção da serpente e seu manuseio para a extração de peçonha apresentam dificuldades que se constituem em perda de peçonha, traumas para o animal e riscos para os técnicos<sup>58</sup>.

A metodologia aplicada no processo de extração depende da espécie de serpente e a rotina utilizada pelo serpentário<sup>57-59</sup>. A técnica tradicionalmente empregada para a extração de serpentes peçonhentas, que compreende o manuseio do animal sem sedativos, representa considerável risco para a serpente e para o técnico extrator de veneno<sup>58,59</sup>. Atualmente, os centros realizam a extração com o auxílio de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), e a coleta é feita em *pod*, utilizando Becker de vidro graduados<sup>57,60</sup>.

No CEVAP, a metodologia de extração adotada é segura para os técnicos e extratores, permitindo o estudo na identificação de diferenças regionais, sexuais e individuais das peçonhas ofídicas<sup>61</sup>.

A ocorrência de discreta hemorragia na cavidade oral das serpentes durante o procedimento de extração é relatada por outros autores<sup>57,58</sup> e

normalmente é observada em animais que permanecem muito tempo sob efeito do gás carbônico<sup>58</sup>.

A estomatite infecciosa é uma enfermidade freqüentemente diagnosticada em serpentes mantidas em cativeiro, estando normalmente associadas a agentes bacterianos<sup>37,38</sup>. Normalmente ocorre em serpentes que sofrem repetidos processos de extração de peçonha<sup>62,63</sup>. Apesar de ser considerada comum, não foi observado nenhum animal com estomatite no CEVAP. A metodologia aplicada permitiu o aproveitamento máximo da peçonha extraída, sem que ocorressem danos na cavidade oral dos animais.

Embora exista uma grande variedade de técnicas para realizar a marcação individual em répteis<sup>64</sup>, poucas podem ser utilizadas em serpentes<sup>65,66</sup>. A ausência de patas exclui a técnica de “toe-clipping” e a mudança periódica da pele impede uma marcação externa permanente<sup>65,66</sup>.

Um sistema de marcação permanente não deve interferir no crescimento, comportamento, sobrevivência ou na probabilidade de recaptura dos animais<sup>64,67</sup>.

Diversos métodos de identificação já foram utilizados para individualizar as serpentes mantidas nos criadouros, sendo muitos deles considerados invasivos. Law ke & Stroud<sup>68</sup> empregaram um método de queimaduras com gelo seco nas laterais do corpo das serpentes, enquanto que Pough<sup>69</sup> utilizou pequenos “brincos” plásticos coloridos nas escamas.

Em 1988, Szima<sup>70</sup> adotou um sistema de identificação por meio de marcas naturais presentes em *Bothropoides jararaca*, envolvendo um sistema de registro fotográfico. Apesar de não invasivo, o método logo foi considerado limitado.

O sistema de marcação considerado tradicional consiste em cortes com retiradas de fragmentos das escamas ventrais dos animais<sup>71,72</sup>. Como a maior parte das espécies de serpentes apresenta mais do que 100 placas ventrais,

esse sistema permite identificar plantéis razoavelmente grandes, apesar da grande mão-de-obra para marcação e leitura<sup>72</sup>. No entanto, esse método pode prejudicar a performance da serpente até que haja cicatrização completa<sup>71</sup>. Além disso, a leitura pode ser feita de maneira incorreta, resultando em identificação errônea do animal<sup>65</sup>.

Recentemente, este problema foi resolvido com a criação de uma Instrução Normativa do IBAMA (02/2001)<sup>73</sup> que estabeleceu a obrigatoriedade de se identificar os animais mantidos em criadouros por sistema eletrônico, utilizando-se microchips (*transponders*). Este sistema é prático, seguro para o animal, além de extremamente eficiente, pois permite a leitura do código do microchip a 1,5m de distância da serpente<sup>74</sup>. A única desvantagem desse sistema é o custo extremamente elevado<sup>74</sup>.

A partir de 2007 o CEVAP iniciou o processo de microchipagem de todos os animais pertencentes ao plantel. Após a saída do quarentenário, todas as serpentes são devidamente microchipadas. Desde o início do processo não foram observadas complicações relacionadas à implantação dos *transponders* nas serpentes. Além disso, esse sistema permitiu a identificação das serpentes mantidas em cativeiro semi-extensivo.

A saúde de um réptil cativo esta diretamente relacionada com o modo em que é criado<sup>16</sup>. A dieta inadequada é um dos principais fatores que acarretam enfermidades nesses animais<sup>27,54</sup>.

Os serpentários produtores de peçonha freqüentemente possuem um biotério de roedores para suprir as necessidades alimentares dos animais mantidos no plantel. Para que o roedor produzido seja de boa qualidade, são necessários conhecimentos básicos das técnicas utilizadas no manejo desses animais<sup>75</sup>.

Em um biotério de roedores, recomenda-se apenas uma espécie de animal por sala<sup>17,76</sup>. A presença de mais de uma espécie no biotério (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Meriones unguiculatus*) do CEVAP não é

recomendada, pois podem acarretar contaminação cruzada entre os patógenos presentes nas diferentes colônias <sup>76</sup>. Para a resolução do problema, é recomendada a instalação de barreiras secundárias como paredes ou portas <sup>17</sup>.

A cama dos roedores mantidos em um biotério deve apresentar partículas macias, ser inócuo, ter alto poder de absorção, permitir um eficiente isolamento térmico e ser facilmente descartável <sup>17,76</sup>. A cama, por estar em contato íntimo com os animais, deve ser autoclavada, evitando-se assim a contaminação das colônias por ácaros, vírus e bactérias <sup>77</sup>. No biotério analisado nesse estudo, é utilizada serragem grossa de *Pinus* não autoclavada, o que pode ter permitido o aparecimento de áreas sem pelagem em alguns espécimes de *Mus musculus* e lesões no focinho em *Meriones unguiculatus*.

A qualidade do alimento e da água fornecida na dieta dos roedores tem sido descrita como parte essencial no desenvolvimento da defesa desses animais <sup>76</sup>. Vários componentes nutricionais da dieta influenciam na resistência ou na predisposição ao desenvolvimento de doenças causadas por parasitas, bactérias e vírus murinos <sup>76</sup>.

O uso da ração peletizada autoclavável sem suplementação é altamente indicado por proporcionar nutrição adequada, melhor rendimento e fácil manuseio <sup>17,77</sup>. A água deve ser tratada com esterilização, acidificação ou filtração <sup>78</sup>. No CEVAP, embora a ração utilizada não seja autoclavada, é de boa qualidade, pois atende as necessidades nutricionais dos animais sem precisar de suplementação. A ausência de água tratada oferecida aos animais pode veicular agentes nocivos que podem comprometer a qualidade sanitária das colônias <sup>78</sup>. Além disso, a ausência de bebedouros autoclavados pode facilitar a instalação de biofilmes de bactérias nesses recipientes, sendo recomendado, portanto, o uso de filtros ou a acidificação da água pela adição de ácido clorídrico como medida de controle de contaminação nos bebedouros e tratamento da água <sup>79</sup>.



A temperatura e a umidade relativa do ambiente do biotério são importantes para a higidez dos animais <sup>77,80</sup>. A temperatura de conforto de pequenos roedores é de 21°C a 24°C enquanto que a umidade ideal é de 45% a 55% <sup>80</sup>.

As mudanças bruscas de temperatura costumam provocar estresse, com queda de resistência e maior susceptibilidade a infecções <sup>76,80</sup>. Temperaturas elevadas provocam queda na reprodução e até sua parada total, enquanto temperaturas baixas podem provocar afecções respiratórias <sup>77</sup>.

A umidade relativa das salas dos roedores tende sempre a aumentar, devido à liberação contínua de vapor d'água pela da respiração e da evaporação da urina, tornando-se necessário um sistema que retire eficazmente o excesso de água do ambiente <sup>80</sup>. Esse processo é realizado durante a troca de ar da sala, que deve ser regulada para que a retirada excessiva de vapor não torne o ambiente seco <sup>77</sup>. A baixa umidade causa ressecamento de mucosas e pele, enquanto a alta umidade pode provocar problemas respiratórios.

A ausência de mecanismos renovadores de ar causa acúmulo de substâncias tóxicas na sala de criação <sup>76,77</sup>. A liberação de amônia proveniente da degradação de excretas nitrogenadas pode afetar o sistema respiratório dos roedores e dos bioteristas <sup>80</sup>.

A temperatura e umidade mantidas no biotério do CEVAP são consideradas adequadas, mas não são constantemente monitoradas. Um sistema de ventilação que produza troca regular de ar (10 a 15 trocas/hora) das salas é recomendável para que ocorra controle na temperatura, umidade, além de diminuir os possíveis poluentes químicos resultantes da higienização das salas <sup>80,81</sup>.

O fotoperíodo é um dos mais importantes itens que influenciam o ritmo biológico de animais de laboratório <sup>80</sup>. O controle automático do fotoperíodo nas salas dos animais do biotério do CEVAP deve ser estabelecido, pois a

variação na duração dos períodos claro/escuro pode alterar ciclos reprodutivos, tempo de duração do parto e hábitos comportamentais <sup>76</sup>.

A permanência de animais utilizados para experimentação na mesma sala de criação é desaconselhável. O biotério de criação e experimentação deve ser independente quanto à estrutura física, material e pessoal, a fim de evitar contaminações indesejáveis, prejudicando dessa maneira, os experimentos realizados <sup>81</sup>.

O som é uma das variáveis mais importantes do meio ambiente em biotérios <sup>81</sup>. O ruído, apesar de inevitável, deve ser controlado para que não provoque estresse, podendo levar os animais a convulsões e morte <sup>80</sup>. É aconselhável que os materiais mantidos na sala de criação sejam armazenados em outro local e que a sala de higienização próxima ao biotério do CEVAP seja transferida para uma área mais distante para diminuir a intensidade de ruídos nesse setor.

Portanto, por se tratar de material biológico vivo, devemos garantir a integridade física tanto das serpentes, quanto dos roedores, levando-se em consideração a nutrição, a manipulação adequada e contaminações microbiológicas desses animais utilizados como produtores de matéria-prima e experimentação animal <sup>77</sup>.

Na complexa operação de um criadouro de serpentes, as ações associadas ao manejo e alimentação dos animais, ao destino das camas, dejetos e carcaças, devem ser estabelecidas por meio de procedimentos apropriados <sup>82</sup>.

O manejo sanitário, tem por objetivo manter as condições de higiene no sistema de criação, com o intuito de minimizar a ocorrência de doenças, obter boa performance e bem-estar dos animais, além de assegurar um produto de boa qualidade <sup>83,84</sup>. A higienização das instalações e o controle de vetores são formas de controlar as doenças em um plantel <sup>83</sup>.

O uso de luvas no manejo das serpentes visa à diminuição na contaminação entre o manipulador e o animal manejado <sup>22</sup>. Essa prática é extremamente importante, uma vez que diversos trabalhos têm apontado os répteis como importantes transmissores de zoonoses <sup>85-87</sup>.

O uso de soluções viricidas, bactericidas e fungicidas para limpeza e desinfecção dos ganchos herpetológicos entre o manejo dos animais auxilia no controle da disseminação de patógenos entre as serpentes <sup>88</sup>. Esta prática deve ser utilizada em todos os setores do Centro, incluindo os animais mantidos no cativeiro semi-extensivo.

A presença de barreiras de contaminação utilizadas na forma de pedilúvios em todos os setores do Serpentário Intensivo é extremamente recomendada para que o ingresso de doenças por meio de vetores seja reduzido <sup>89</sup>. Além disso, recomenda-se o uso de pedilúvios no serpentário Semi-extensivo.

O processo de limpeza de um sistema de criação consiste na remoção dos detritos acumulados nas instalações, com o objetivo de reduzir a carga microbiana e minimizar o contato dos animais com excesso de matéria orgânica, a qual potencialmente aumenta o risco da veiculação de agentes patogênicos aos animais <sup>82</sup>. A limpeza prévia é um passo essencial ao sucesso dos programas de desinfecção <sup>83</sup>.

A desinfecção é o conjunto de medidas empregadas para impedir a penetração e crescimento de germes num determinado ambiente ou estrutura, tornando-os livres de agentes infectantes, com o uso de substâncias desinfetantes ou outras formas físicas de desinfecção <sup>89</sup>. Desinfetantes são substâncias químicas que destroem as formas vegetativas de microorganismos, mas não necessariamente sua forma esporulada <sup>89</sup>.

No passado, era prática comum a realização de desinfecções apenas nos casos de ocorrência de surtos de doenças <sup>83</sup>. Hoje, por meio do desenvolvimento de programas de limpeza e desinfecção como parte dos

esquemas de profilaxia, a desinfecção preventiva representa uma prática comum e extremamente necessária em criadouros<sup>82</sup>. Uma desinfecção completa e eficiente somente pode ser executada após a retirada dos animais das instalações. Somente assim se obtém o máximo de ação do desinfetante, uma vez que a ausência de animais e de equipamentos permite que o produto tenha um contato direto com os microrganismos e tempo suficiente para a ação<sup>82-84</sup>.

A limpeza seca, seguida de limpeza química no Serpentário Intensivo, diminui a chance de contaminação do ambiente por microorganismos, melhorando a qualidade de vida dos animais mantidos nesse sistema<sup>83</sup>.

No Serpentário Semi-extensivo, a limpeza física (vassoura de fogo) aliada à limpeza química proporcionada pelo vazio sanitário permite uma desinfecção adequada das baias das serpentes. Considera-se vazio sanitário o período em que a instalação permanece vazia e os processos de limpeza e desinfecção são realizados. O tempo de vazio sanitário varia com o tipo de criação, status sanitário da propriedade e a programação dos novos lotes<sup>90</sup>.

O uso da cal no vazio sanitário aumenta o pH, reduz a quantidade de água livre, afetando diretamente a microbiota do local, impedindo a proliferação de bactérias, inclusive *Salmonella* sp e *Clostridium* sp<sup>90</sup>. O período de 45 dias utilizado no vazio sanitário na higienização do Serpentário Semi-extensivo prejudica o desenvolvimento da grama utilizada na área externa das baias, e dificulta a limpeza do local devido à impregnação da cal nos recintos. Portanto, o período entre 15 e 30 dias de vazio deve ser considerado<sup>90</sup>.

Embora não exista uma rotina de limpeza simplificada e universalmente aplicável, nem tampouco critérios rígidos sobre os intervalos de tempo para higienização das salas de criação do Biotério de roedores do CEVAP, a limpeza realizada três vezes por semana reduz o nível de poeira e dejetos que são ressuspensos no ar<sup>80</sup>. Dessa maneira, há redução do nível desses poluentes no ambiente e, por consequência, diminuição da velocidade de

disseminação de microorganismos e o risco de contaminações cruzadas entre as colônias<sup>90</sup>.

A higienização das caixas de manutenção de roedores e serpentes é realizada de forma adequada, com limpeza prévia e desinfecção química. No entanto, foi observado que as caixas de serpentes e roedores são lavadas na mesma sala. Essa prática não é adequada, pois facilita a contaminação entre as caixas<sup>90</sup>. Portanto, recomenda-se que a lavagem das caixas das serpentes oriundas da quarentena seja realizada em sala adequada para este fim.

Apesar do CEVAP não possuir um sistema de gestão ambiental, as medidas utilizadas no destino de resíduos orgânicos e de atividades veterinárias, bem como o descarte das carcaças de animais mortos, são considerados adequados e estão de acordo com o sistema de gestão ambiental adotados pelos zoológicos brasileiros<sup>82</sup>.

O sistema de gestão ambiental em criadouros (SGA) vem assumindo importância cada vez mais relevante e objetiva minimizar ou solucionar impactos ambientais decorrentes da manutenção de animais selvagens<sup>82</sup>. Portanto, o CEVAP deve considerar a implantação de um SGA, para que além do compromisso com a sanidade, com o bem-estar dos animais e com a qualidade da peçonha produzida, seja estabelecido um compromisso com a causa da conservação do meio ambiente.

Deste modo, a adequação da infra estrutura, aliada ao aperfeiçoamento de medidas utilizadas no manejo, tanto dos ofídios, quanto dos roedores, podem proporcionar um aumento no bem-estar dos animais e na quantidade e qualidade da peçonha produzida.

### 3.6 REFERÊNCIAS\*

1. Belluomini HE. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. Comparação de resultados entre serpentário exposto e biotério aquecido. *Arq Inst Biol.* 1964;31(4): 149-54.
2. Brazil V. Ophidismo. Contribuição ao estudo do ophidismo. São Paulo: Imprensa Médica. 1905. p. 241-7.
3. Melgarejo-Gimenez AR. Criação e manejo de serpentes. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editores. *Animais de laboratório.* Rio de Janeiro: Editora Focruz, 2006. p. 175-99.
4. Ashley BD, Burchfield PM. Maintenance of a snake colony for the purpose of venom extraction. *Toxicon.* 1968;5: 267-75.
5. Leloup P. Essais de rationalisation dans le maintien d'un serpentarium a but industriel. *Acta Tropica.* 1973;30:281-311.
6. Leloup P. Observation sur la reproduction de *Bothrops mojoneni* en captivité. *Acta Zool Pathol Antverp.* 1975;65: 173-201.
7. Leloup P. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. *Acta Zool Pathol Antverp.* 1984;78(1):177-98.
8. Getreuer WK. The handling of venomous snakes. *Lit Serp.* 1985;5:234-44.
9. Boyer DM, Mitchell LA, Murphy JB. Reproduction and husbandry of the bushmaster *Lachesis m muta* at the Dallas Zoo. *Int Zoo Yearbook.* 1989;28:190-4.
10. Marques OAV, Sazima I. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FF, Málague CMS, Haddad V Jr, editores. *Animais Peçonhentos no Brasil.* São Paulo: Sarvier. 2003. p. 62-71.
11. Oliveira L, Almeida-Santos SM, Costa ACOR, Scartozzoni RR, Germano VJ, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: A longevidade do gênero *Micrurus*. *Publ Av Inst Pau-Brasil Hist Nat.* 2005;8-9:55-61.
12. Costa ACOR, Almeida-Santos SM, Germano JV, Oliveira L, Scartozzoni RR, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I. A longevidade dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. *Publ Av ulsas Inst Pau Brasil.* 2005;8:63-9.
13. Cowan DF. Adaptation, maladaptation and disease. In: Murphy, J.B, editor. *Reproductive biology and diseases of captive reptiles.* Lawrence: Society for the Study of Amphibians and Reptiles; 1980. p.191-6.

---

\* Segundo normas de Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

14. Leinz FF, Janeiro-Cinquini TRF, Ishizuka MM, Lang LV. Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) mantidas em cativeiro. Mem Inst Butantan. 1989;1(1):33-8.
15. Guillette LJ, Cree A, Rooney AA. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: Warwick C, Frye FL, Murphy JB, editors. Health and welfare of captive reptiles. London: Chapman and Hall; 1995. p. 32-81.
16. Mckeown S. General husbandry and management. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Elsevier; 1996. 9-19p.
17. Couto, SER. Instalações e barreiras sanitárias. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editores. Animais de laboratório. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.33-44.
18. Grego KF. Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae) [Tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2006.
19. Rameh-de-Albuquerque LC. Aspectos hematológicos, bioquímicos, morfológicos e citoquímicos de células sanguíneas em viperídeos neotropicais dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidos em cativeiro [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007.
20. Sesti LAC. Biossegurança: políticas e metodologias para a implantação de sistemas de produção de suínos com altos níveis de saúde. In: Sobestiansky J, Wet I, Silveira PRS, Sesti LAC, editores. Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho. Campinas: Embrapa. 1998; p.317-32.
21. Vilani RGOC. Estrutura hospitalar, quarentenário e centros de triagem. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editores. Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. São Paulo: Roca; 2007. p.33-41.
22. Cubas ZS. Biossegurança em zoológicos. Cienc Vet Trop. 2008;11(1):174-7.
23. Silva JCR, Correa SHR. Manejo e Biossegurança. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editores. Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. 2007. São Paulo: Roca. p.1226-44.
24. Jacobson ER, Implications of infectious diseases for captive propagation and introduction programs of threatened/endangered reptiles. J Zoo Wild Med. 1993;24(3):245-55.
25. Franciso LR, Grego KF, Mas M. Biology and keeping south american snakes in captivity. In: Fowler ME, Cuba ZS, editors. Biology, medicine and surgery of South American wild animals. Philadelphia; Saunders Co.; 1999. p.40-51.
26. Koleniskovas CKM, Grego KF, Albuquerque LCR. Ordem Squamata – Subordem Ophidia (Serpentes). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editores. Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. São Paulo: Roca; 2007. p.68-85.

27. Rossi JV. General husbandry and management. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Elsevier; 2006. p.25-41.
28. Cardoso TAO. Considerações sobre a biossegurança em biotérios. Bd Centr Panam Febre Aftosa. 2001;64-67.
29. Majerowicz J. Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (Laean) de Bio-Manguinhos [Dissertação]. Rio de Janeiro (RJ); Instituto Oswaldo Cruz, Instituto de tecnologia em imunobiológicos. 2005.
30. Lock Brad. Venomous snake restraint and handling. Journal of Exotic Pet Medicine. 2008;17(4):273-84.
31. Jacobson ER, Morris P, Norton TM, Wright K. Quarantine. J Herpet Med Surgery. 2001;11:24-30.
32. Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N. Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. Rev Vet Journal. 2008;175:53-68.
33. Woodford MH. Quarantine and Health Screening Protocols for Wildlife prior to Translocation and Release into the Wild. Switzerland IUNC; 2000. p.9-25.
34. Jacobson ER, Gaskin JM, Wells S, Bowler K, Schumacher J. Epizootic of ophidian paramixovirus in a zoological collection: pathological, microbiological and serological findings. J Zoo Wild Dis. 1992;23(3):318-27.
35. Chanhom L, Jintakune P, Wilde H, Cox MJ. Venomous snake husbandry in Thailand. Wild Environ Med. 2001;12:17-23.
36. NSW. Department of environment and climate change. Hygiene protocol for the control of disease in captive snakes. Sydney: NSW; 2008. p.3-8.
37. Rosenthal KL, Mader DR. Microbiology. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Elsevier; 1996. p.117-25.
38. Frye FL. Reptile care: an atlas of diseases and treatments. Neptune City: T. F. H. Publications; 1991. p.209-24.
39. Scott PW. Nutritional diseases. In: Lawton MPC, Cooper JE, editors. Manual of reptile. Podde: J. Looker Printers; 1992. p.138-52.
40. Mitchell MA. Snake care and husbandry. Vet Clin Exot Anim. 2004;(7):421-6.
41. Kauffeld C. The effect of altitude, ultra-violet light, and humidity on captive reptiles. Int Zoo Yearb.1969;9:8-9.
42. Lillywhite HB. Temperature, energetic, and physiological ecology. In: Seigel RA, Collins JT, Novak SS, editors. Snakes: ecology and evolutionary biology. New York: McGraw-Hill; 1987. p.422-77.
43. Heath JE. Reptilian thermoregulation: evaluation of field studies. Science. 1964;146:784-5.



44. Huey RB, Peterson CR, Arnold JS, Porter W. Hot rocks and not-so-hot rocks: retreat site selection by garter snakes and its thermal consequences. *Ecology*. 1989; 70(4):1931-4.
45. Slip DJ, Shine R. Reptilian endothermy: a field study of thermoregulation by brooding diamond pythons. *J Zool*. 1988A; 216:367-78.
46. Brattstorm BH. Body temperatures of reptiles. *Am Midl Nat*. 1965; 73:376-422.
47. Avery RA. Field studies of body temperatures and thermoregulation. In: Gans C, Pough HF, editors. *Biology of reptilia. Physiology C. Physiological ecology*. New York: Academic Press; 1982. p. 93-166.
48. Stuginsky DR. Termofilia e termogênese pós-prandiais em *Bothrops moojeni* (Serpentes: Viperidae) em cativeiro [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. 2009.
49. Heckrotte C. Relations of body temperature, size and crawling speed of the common garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Copeia*. 1967:759-63.
50. Stevenson RD, Peterson CR, Tsuji JS. The thermal dependence of locomotion, tongue-flicking, digestion and oxygen consumption in the wandering garter snake. *Physiol Zool*. 1995; 58:46-57.
51. Gehrmann WH. Influence of constant illumination on thermal preference in the immature water snake, *Natrix erythrogaster transversa*. *Physiol Zool*. 1971; 44:84-9.
52. Crews D, Garrick LD. Methods of inducing reproduction in captive reptiles. In: Murphy JB, Collins JT, editors. *Reproductive biology and diseases of captive reptiles*. New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles; 1980. p.49-69.
53. Demardo D. Stress in captive reptiles. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 119-23.
54. Donoghue S. Nutrition. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: Elsevier; 2006. p.251-98.
55. Funk RS. Differential diagnoses by symptoms. Snakes. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: Elsevier; 2006. p.675-82.
56. Carciofi AC, Oliveira LD. Doenças Nutricionais. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editores. *Tratado de animais selvagens – medicina veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. p.838-64.
57. Leinz FF, Janeiro-Cinquini TR, Ishizuka MM. Carbon dioxide as an auxiliary in the venom extraction of *Bothrops jararaca* snakes (Viperidae, Crotalinae). *Mem Inst Butantan*. 1990; 52(1):17-23.
58. Biasi P, Belluomini HE, Hoge AR, Puerto G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem Inst Butantan*. 1977; 40-41:167-72.
59. Allen R, Maier E. The extraction and processing of snake venom. *Copeia*. 1941; 4:248-52.

60. Vieira EGJ, Rolim-Rosa R, Iizuka H, Furtado MFD, Fernandes W. Influências sazonal e do processo de extração sobre a produção, toxicidade do veneno e sobrevivência de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824). Mem Inst Butantan. 1988;50(1):29-35.
61. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 1991;29:1279-303.
62. Belluomini HE, Saliba AM, Abe AS. Inquérito anátomo-patológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* [Serpentes, Viperidae, Crotalinae]. Mem Inst Butantan. 1977;40-41:123-8.
63. Mavridis SC, Hipolito M, Baldassi L, Calil BEM, Moulin AAP, Barbosa ML. Inquérito bacteriológico de serpentes dentes e mortas mantidas em cativeiro. Mem Inst Butantan. 1993;55(Supl 1):55-63.
64. Famer JW. A review of marking techniques for amphibians and reptiles. In: Seigel RA, Collins JT, Novak SS, editors. Snakes: Ecology and Evolutionary Biology, Macmillan Publishing Company: New York; 1979. p.143-64.
65. Jemison SC, Bishop LA, May PG, Farrel TM. The Impact of PIT-tags on growth and movement of the rattlesnake, *Sistrurus miliarius*. J Herpetol. 1995;29(1):129-32.
66. Beausdeil NJ, Mellor DJ, Stafford KJ. Methods of marking New Zealand wildlife: amphibians, reptiles and marine mammals. Wellington: Department of Conservation; 2004. p.69-103.
67. Blanchard FN, Finster EB. A method of marking living snakes for future recognition, with a discussion of some problems and results. Ecology. 1933;14:334-47.
68. Lewke RE, Stroud RK. Freeze-branding as a method of marking snakes. Copeia. 1974;4:997-1000.
69. Pough FH. A quick method for permanently marking snakes and turtles. Herpetologica. 1970;26(4):428-30.
70. Saizma I. Um estudo de biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. Mem Inst Butantan. 1988;50(3):83-99.
71. Blanchard FN, Finster EB. A method of marking living snakes for future recognition, with a discussion of some problems and results. Ecology. 1933; 14: 334-47.
72. Brown WS, Parker WS. A ventral scale clipping system for permanently marking snakes (Reptilia, Serpentes). J Herpetol. 1976;10:247-9.
73. Instrução normativa 2/2001. Ministério do Meio Ambiente (Brasil). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Diário oficial da União 44-E; 2001. p. 35.
74. Camper JD, Dixon JR. Evaluation of a microchip system for amphibians and reptiles. Texas: Texas Parks and Wildlife Department Research Publication; 1988. p.1-22.
75. Andrade A. Bioterrorismo: evolução e importância. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p. 19-24.

76. Gilioli R, Andrade LAG, Passos LAC, Silva FA, Rodrigues DM, Guaraldo AMA. Parasite survey in mouse rats colonies of Brazilian laboratory animals houses kept under differences barrier conditions. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2000;52(1):33-7.
77. Cardoso TAO. Considerações sobre a biossegurança em biotérios. *Bol Pan Fiebre Aftosa.* 2001:64-7.
78. Rowland NE. Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comp Med.* 2007;2:149-60.
79. Homberg FR, Zsuzanna P, Thomann PE. Control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice by chlorine treatment of drinking water. *Lab Anim Sci.* 1993;43:635-7.
80. Santos BF. Macro e Microambientes. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editores. *Animais de laboratório.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.55-8.
81. Cardoso CVP. Classificação de biotérios quanto à finalidade. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editores. *Animais de laboratório.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p.29-32.
82. Cruz JB. Gestão ambiental em zoológicos. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editores. *Tratado de animais selvagens – medicina veterinária.* São Paulo: Roca; 2007. p.27-32
83. Sesti LAC, Sobestiansky J, Barcellos D. Limpeza e desinfecção em Suinocultura. *Suinocultura Dinâmica.* Campinas: Embrapa; 1998. p.1-11.
84. Silva EM. Desinfetantes e desinfecção na avicultura. São Paulo: FACTA, 1992, 18p.
85. Ebani W, Fratini F. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. *An Fac Med Vet.* 2005;58:85-91.
86. Pflieger S, Benyr G, Sommer R, Hassl A. Pattern of *Salmonella* excretion in amphibians and reptiles in a vivarium. *Int J Hyg Environ Health.* 2003;206:56-9.
87. Magnino S, Cadin P, Dei-Cas P, Madsen M, McLauchlin, Nockler K, *et al.* Biological risks associated with consumption of reptile products. *Int J Food Microbiol.* 2009;134:163-75.
88. Spinoza H, Gorniak S, Bernardi M. *Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária.* Rio de Janeiro: Guanabara; 1997. p.443-55.
89. Lovatto PA. Higiene e Profilaxia. *Suinocultura geral.* Campinas: Embrapa; 2000. p.63-83.
90. Ferreira HA, Ferreira MC, Traldi AB. Efeito de condicionadores químicos na cama de frango sobre o desempenho de frangos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004;54:542-6.
91. Eaton P. Higiene in the animal house. In: Poole TB, Robinson R, editors. *The WFAU handbook on the care and management of laboratory animals.* New York: Churchill Livingstone; 1987. p.145-58.

Análise microbiológica dos diferentes regimes de cativoiro adotados pelo CEVAP

---

Capítulo 4

## RESUM O

A mortalidade de serpentes mantidas em cativeiro é elevada, e provavelmente está relacionada ao estresse causado pelas dificuldades desses animais se adaptarem ao ambiente cativo. O objetivo desse estudo foi avaliar a microbiota bacteriana e fúngica de duas espécies de serpentes mantidas em diferentes regimes de cativeiro no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP). Bacilos gram-negativos foram os principais agentes isolados, com destaque para representantes da família Enterobacteriaceae. Por meio de seqüenciamento de rDNA, foi identificado *Trichosporon asahii* em animais saudáveis e com lesões sugestivas de micose mantidos em cativeiro intensivo. Os antimicrobianos mais efetivos foram os aminoglicosídeos e as fluorquindonas. Os isolados bacterianos mostraram baixa resistência a diversos antimicrobianos testados, permitindo o uso desses antibióticos com segurança em processos infecciosos que afligem estas serpentes. As doenças infecciosas causadas por bactérias e fungos normalmente estão relacionadas à imunossupressão causada pelo ambiente cativo e ao manejo inadequado. Não foi observada diferença na frequência de bactérias entre as espécies, mas ocorreram diferenças entre os distintos regimes de cativeiro utilizados, com destaque para o cativeiro intensivo, onde foram mais frequentes. O isolamento de potencial patógenos nas amostras das serpentes estudadas apesar de não ser sinônimo de doença, foi considerado importante no processo de avaliação do tipo de manejo utilizado, considerando as numerosas condições estressantes proporcionadas pelo ambiente do cativeiro e o caráter oportunista desses agentes. Os resultados sugerem que o tipo de manejo adotado influencia na contaminação do ambiente utilizado pelos animais. Apesar de o sistema intensivo ser o método tradicionalmente utilizado na manutenção de ofídios destinados a produção de peçonha, os resultados sugerem que o sistema semi-extensivo pode ser mais apropriado para este fim.

Palavras-chave: microbiota, serpentes, manejo, cativeiro

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Apesar da extensa experiência que os centros e os institutos possuem na manutenção de serpentes em cativeiro, a mortalidade desses animais é elevada, e provavelmente está relacionada ao estresse causado pelas dificuldades de se adaptarem ao ambiente cativo<sup>1-5</sup>.

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 doenças infecciosas nestes animais<sup>6-8</sup>. Estas por sua vez, são a principal causa de morte em répteis cativos<sup>9-11</sup>, ocasionando problemas para o laboratório produtor de peçonha, que pode não dispor de matéria-prima de qualidade<sup>1,12</sup>.

Dentre os agentes infecciosos bacterianos, o grupo mais importante pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade nos répteis, é o dos bastonetes Gram-negativos<sup>10,11,13-16</sup>. Os bastonetes gram-negativos estão envolvidos em processos infecciosos cutâneos<sup>17</sup>, pulmonares<sup>13,14,18</sup>, orais<sup>9,14,19</sup>, gastroentéricos<sup>2,5,16</sup> e generalizados<sup>16,20</sup>, além de vislumbrar a ocorrência de abscessos<sup>2,19</sup>. Além das infecções bacterianas, doenças fúngicas têm sido devastadoras para as serpentes cativas<sup>25-28</sup>. Normalmente há dificuldade no isolamento do agente e os óbitos ocorrem com muita frequência<sup>25,29,32</sup>.

Desse modo, a finalidade desse estudo foi avaliar a microbiota de duas espécies de serpentes mantidas em diferentes regimes de cativeiro e utilizadas como produtoras de peçonha no Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP).

## 4.2 OBJETIVOS

O presente capítulo teve como objetivos:

- Identificar a microbiota bacteriana e leveduriforme presente nas escamas, cavidade cloacal, oral e peçonha de *Bothropoides jararaca* e *Caudisona durissa terrifica* recém capturadas, e aquelas mantidas em diferentes regimes de cativeiro;
- Comparar as frequências dos micro organismos bacterianos encontrados nas amostras das serpentes mantidas nesses diferentes regimes;
- Avaliar a susceptibilidade “in vitro” das bactérias isoladas da cavidade oral e peçonha frente a diferentes antimicrobianos;
- Identificar as leveduras isoladas por meio do Sequenciamento do rDNA.

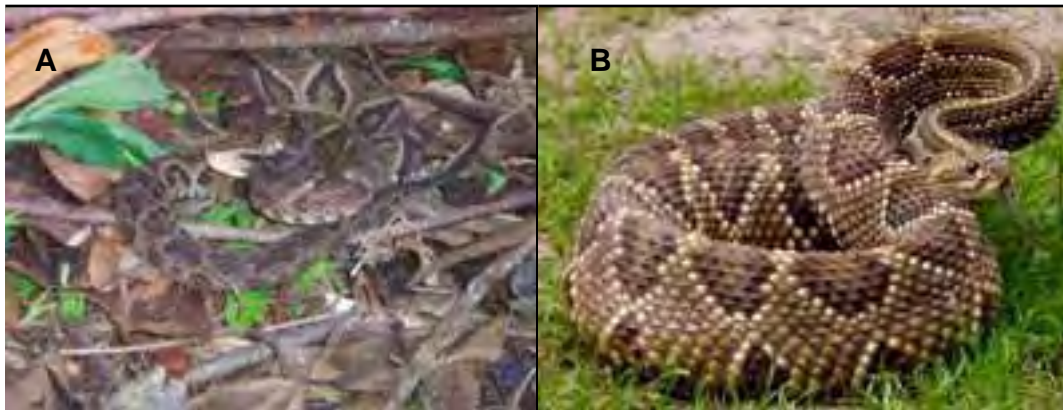
## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Animais

Na avaliação da microbiota das serpentes foram utilizados 56 animais adultos de ambos os sexos, sendo 26 de *Bothropoides jararaca* (Figura 4.1 A) e 30 de *Caudisona durissa terrifica* (Figura 4.1 B) mantidos em diferentes regimes de cativeiro. Foram avaliados os regimes de quarentenário (recém-capturadas), cativeiro intensivo (individual) e semi-extensivo (coletivo), conforme descrição prévia no capítulo 3 deste estudo.

Foram incluídas no experimento serpentes recém-capturadas consideradas aparentemente saudáveis com base na condição corpórea (musculatura axial bem desenvolvida e costelas dificilmente palpáveis). As serpentes cativas foram incluídas com base na condição corpórea, sucesso da realização da ecdise, rotina alimentar e hidratação.

A contenção das serpentes para a coleta de dados biométricos foi realizada com o auxílio de gancho herpetológico e tubos de polipropileno. Foram coletados dados relacionados ao comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cauda (CC), peso, sexo e data da chegada do animal (Tabelas 1 e 2 – Anexo II). Durante o experimento os animais não foram submetidos a procedimentos de contenção química, uso de antibióticos ou medicamentos para endo e ectoparasitas.



**Figuras 4.1 A-B.** Espécies de serpentes envolvidas na análise microbiológica. **A.** *Bothropoides jararaca*. **B.** *Caudisona durissa terrifica*.

#### 4.3.2 Grupos de Estudo

Foram determinados seis grupos de estudo baseados na espécie de serpente estudada e no tipo de regime de cativeiro analisado. Os grupos estão descritos nas Tabelas 4.1 e 4.2.



**Tabela 4.1.** Grupos de estudo de *Bothropoides jararaca*.

<i>Bothropoides jararaca</i>											
Recém - capturadas (n=10)				Cativeiro individual (n=10)				Cativeiro coletivo (n=06)			
Grupo	RG	Microchip	Sexo	Grupo	RG	Microchip	Sexo	Grupo	RG	Microchip	Sexo
G1-01	1397	∅	♀	G3-01	219	303115	♂	G5-01	558	305191	♀
G1-02	1423	∅	♀	G3-02	535	339162	♀	G5-02	565	366986	♀
G1-03	1458	∅	♀	G3-03	541	363261	♀	G5-03	632	368199	♀
G1-04	1525	∅	♀	G3-04	564	308050	♀	G5-04	646	320505	♀
G1-05	1653	∅	♀	G3-05	603	340335	♀	G5-05	751	330884	♀
G1-06	1655	∅	♀	G3-06	675	305893	♀	G5-06	777	319399	♀
G1-07	1670	∅	♀	G3-07	809	346211	♀	∅	∅	∅	∅
G1-08	1695	∅	♀	G3-08	860	313471	♀	∅	∅	∅	∅
G1-09	1696	∅	♀	G3-09	861	331069	♀	∅	∅	∅	∅
G1-10	1697	∅	♀	G3-10	1364	346464	♀	∅	∅	∅	∅

G1: *Bothropoides jararaca* recém-capturadas; G3: *Bothropoides jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *Bothropoides jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; ∅: ausente; ♀: fêmeas; ♂: machos.

Nota: A numeração inicial dos microchips é 963000000.

**Tabela 4.2.** Grupos de estudo de *Caudisona durissa terrifica*.

<i>Caudisona durissa terrifica</i>											
Recém - capturadas (n=10)				Cativeiro individual (n=10)				Cativeiro coletivo (n=10)			
Grupo	RG	Microchip	Sexo	Grupo	RG	Microchip	Sexo	Grupo	RG	Microchip	Sexo
G2-01	1482	∅	♀	G4-01	606	306026	♀	G6-01	623	340738	♀
G2-02	1488	∅	♀	G4-02	837	368447	♀	G6-02	637	307398	♀
G2-03	1530	∅	♀	G4-03	843	328484	♀	G6-03	639	334920	♀
G2-04	1531	∅	♀	G4-04	870	369585	♀	G6-04	640	318731	♀
G2-05	1535	∅	♀	G4-05	884	305445	♀	G6-05	810	319342	♀
G2-06	1542	∅	♀	G4-06	885	337892	♀	G6-06	815	326418	♀
G2-07	1544	∅	♀	G4-07	886	306059	♀	G6-07	831	330981	♀
G2-08	1545	∅	♀	G4-08	891	304123	♀	G6-08	862	360826	♀
G2-09	1546	∅	♀	G4-09	901	363167	♀	G6-09	890	325614	♀
G2-10	1547	∅	♀	G4-10	904	315509	♀	G6-10	941	304537	♀

G2: *C. d. terrifica* recém-capturadas; G4: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G6: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo; ∅: ausente; ♀: fêmeas; ♂: machos.

Nota: A numeração inicial do microchip é 963000000.

#### 4.3.3 Animais com lesões sugestivas de micose

Foram incluídos no experimento microbiológico três animais das espécies *Bothropoides pauloensis*, *Bothrops mojeni* e *C. d. terrifica* mantidos em cativeiro intensivo e que apresentavam lesões esbranquiçadas nas

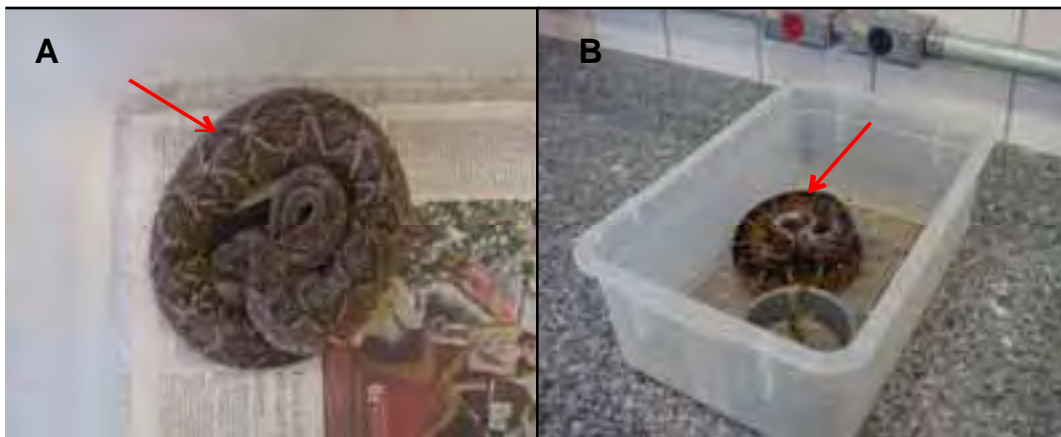
escamas, sugestivas de micose (Tabela 4.3 e Figuras 4.2 A e B). Para a coleta das amostras foi utilizada a metodologia descrita no item Escamas 4.3.4.2.

**Tabela 4.3.** Espécies de serpentes com lesões sugestivas de micose incluídas no experimento microbiológico.

<b>N</b>	<b>Amostra</b>	<b>Espécie</b>	<b>RG</b>	<b>Microchip</b>
1	Escama	<i>Caudisona durissa terrifica</i>	158	307337
2	Escama	<i>Bothropoides pauloensis</i>	828	336229
3	Escama	<i>Bothrops moojeni</i>	1350	336362

N: número da amostra.

Nota: A numeração inicial dos microchips é 963000000.



**Figuras 4.2 A-B.** Serpentes com lesões sugestivas de micose. **A.** *Caudisona durissa terrifica*. **B.** *Bothropoides pauloensis*.

#### 4.3.4 Coleta das amostras para análise microbiológica

Foram coletadas amostras de peçonha em microtubos e duas zaragatoas da cavidade oral, cloacal e escamas, para posterior análise microbiológica. Após a coleta, as zaragatoas destinadas à análise bacteriológica foram imediatamente introduzidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (0,85%) estéril<sup>49</sup>. As zaragatoas para análise micológica foram introduzidas no próprio invólucro das zaragatoas<sup>49</sup>.

As amostras foram devidamente identificadas com o número do grupo, RG da serpente e tipo de material coletado. Após a coleta, as amostras foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Micologia e Microbiologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP campus de Botucatu, para processamento biológico.

#### 4.3.4.1 Cavidade oral e cloacal

Para a obtenção das amostras da cavidade oral e cloacal foram utilizadas zaragatoas estéreis de padrão normal embebidas em solução fisiológica estéril. As zaragatoas foram introduzidas no interior da cavidade oral (Figura 4.3 A) e cloaca (Figura 4.3 B) do animal e rotacionadas por um período de aproximadamente 15 segundos<sup>49</sup>. Após a coleta, o material foi acondicionado em sacola térmica a 4°C<sup>49</sup>.



**Figuras 4.3 A-B.** Coleta das amostras da cavidade oral e cloacal. **A.** Coleta da cavidade oral de *C. d. terrifica*. **B.** Coleta da cavidade cloacal de *C. d. terrifica*.

#### 4.3.4.2 Escamas

Para a obtenção das amostras das escamas foram utilizadas zaragatoas estéreis de padrão normal, umedecidas com solução fisiológica estéril (Figura

4.4 A). As zaragatoas foram friccionadas nas escamas dorsais do segundo terço do corpo das serpentes por um período de aproximadamente 15 segundos <sup>49</sup> (Figura 4.4 B). Após a coleta, o material foi acondicionado em sacola térmica a 4°C <sup>49</sup>.



**Figuras 4.4 A-B.** Coleta das amostras de escamas. **A.** Zaragatoa umedecida com solução fisiológica estéril para coleta da amostra de escamas **B.** Coleta da amostra de escama de *C. d. terrifica*

#### 4.3.4.3 Peçonha

Para a obtenção das amostras de peçonha os animais foram submetidos à hipóxia com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por um período de 4 a 12 minutos, dependendo do tamanho da serpente <sup>50</sup>.

Após a sedação, foi introduzida na cavidade oral e presa das serpentes uma zaragatoa umedecida com álcool 70%, proporcionando assepsia do local. Esse procedimento foi realizado na tentativa de minimizar a contaminação da peçonha pelos microorganismos presentes na mucosa oral. A peçonha foi coletada por meio da compressão suave das glândulas de peçonha em microtubos estéreis de 1,5 mL (Figura 4.5) e acondicionada em sacola térmica a 4°C <sup>49</sup>.



**Figura 4.5.** Coleta de peçonha de *Bothropoides jararaca*

#### 4.3.5 Processamento microbiológico

As amostras de peçonha (20  $\mu$ L por placa) e as zaragatoas obtidas da cavidade oral, cloacal e escamas foram distribuídas em placas de Petri contendo Agar Sangue de carneiro (5%) desfibrinado (AS), Agar McConkey (MC) e Agar Saboraud-Dextrose (SAB). O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de uma aça de níquel-cromo e um bico de Bunsen, foram realizadas sementeiras por esgotamento de modo a possibilitar a obtenção de culturas isoladas e puras.

Os meios AS e MC foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C com leituras a cada 24, 48 e 72 horas e o meio SAB foi incubado a 25°C em estufa micológica com leituras de no mínimo sete dias.

#### 4.3.5.1 Identificação bacteriológica

A avaliação da morfologia colonial foi avaliada quanto a características macroscópicas (tamanho e coloração das colônias, presença ou não de hemólise), microscópicas (caracterização morfo-tintorial) e provas bioquímicas gerais e específicas de acordo com Quinn *et al*<sup>51</sup>.

A identificação dos micro organismos provenientes do AS e MC foi realizada por meio de série bioquímica EPM (Fermentação da glicose, Produção de gás, Uréia e Fenilalanina), Mili (Motilidade, Descarboxilação da Lisina e Indol) e Citrato de Simmons, incubados em estufa a 37°C por 24h para posterior leitura e interpretação das provas<sup>52</sup>.

Foi registrada a produção de gás (CO<sub>2</sub>), produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), hidrólise da uréia, desaminação do triptofano, descarboxilação da lisina, motilidade, indol e utilização do citrato. Como provas complementares foram utilizadas os testes de Voges-Proskauer (VP), Catalase e DNase (5). Os resultados positivos e negativos foram comparados com as tabelas de identificação de bactérias<sup>52</sup>.

#### 4.3.5.2 Antibiograma

As culturas bacterianas obtidas das peçonhas e cavidade oral foram submetidas aos testes de susceptibilidade "in vitro" frente a 12 diferentes antimicrobianos: Amicacina (30 µg), Amoxicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Ceftiofur (30 µg), Cloranfenicol (10 µg), Enrofloxacina (05 µg), Gentamicina (10 µg), Norfloxacina (10 µg), Polimixina B (300 µg), Sulfametoxazol+trimetoprim (25 µg), Tigeciclina (15 µg) e Tobramicina (10 µg). A escolha dos antimicrobianos foi realizada de acordo com a importância clínica e epidemiológica dos isolados obtidos.

Os antibiogramas foram realizados em meio de Muller & Hinton, empregando-se o método de disco difusão, indicado para bactérias aeróbias de crescimento rápido, com o objetivo de observar o perfil de resistência e sensibilidade de um determinado micro organismo por meio das zonas de inibição de crescimento in “vitro”<sup>51,52</sup>.

As colônias puras com no máximo 24 horas de incubação foram colhidas em “pool” com alça de níquel-cromo, diluídas em 5 mL de solução salina estéril e homogêneas até verificar-se uma turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL)<sup>53</sup>. A semeadura foi aplicada uniformemente com o auxílio de zaragatoas umedecidas nas culturas bacterianas e os discos de antimicrobianos foram depositados manualmente nas placas com o auxílio de uma agulha estéril, em condições de esterilidade em fluxo laminar. Após 18-24 horas de incubação em aerobiose a 37°C foi realizada a leitura com uma régua transparente milimetrada para determinar precisamente o diâmetro (em mm) do halo de inibição.

As concentrações, bem como os critérios de interpretação, foram baseadas nas recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI”<sup>54</sup>.

#### **4.3.5.3 Identificação micológica**

Na avaliação micológica, foram consideradas somente as colônias leveduriformes devido à relevância na medicina humana e na medicina de répteis<sup>10,11</sup>.

As diferentes colônias de leveduras foram repicadas em tubos de ensaio contendo SAB inclinado e incubadas a 25°C. Após cinco dias os micro organismos foram submetidos a testes de identificação presumida<sup>55</sup>.

As leveduras foram identificadas quanto a características macromorfológicas (técnica de colônia gigante) e micromorfológicas (técnica de microcultivo) <sup>55,56</sup>.

#### **4.3.5.3.1 Características macromorfológicas (Colônia gigante)**

Foi inserido um pequeno fragmento de cada amostra de levedura no centro de uma placa de Petri contendo SAB. As placas foram incubadas em estufa a 25°C por sete dias e após o desenvolvimento, a colônia foi submetida à ação do formol (0,5 mL), e observados o tempo de crescimento, textura, topografia, aspecto, superfície, bordas, coloração e pigmento <sup>55</sup>.

#### **4.3.5.3.2 Características micromorfológicas (Microcultivo)**

Para observação das características microscópicas foram utilizadas placas de Petri de vidro contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro. Foram semeados fragmentos das amostras em quadrados de um cm<sup>2</sup> de SAB e em seguida cobertas por lamínula estéril. Foi adicionado algodão embebido em solução salina estéril para evitar o ressecamento da amostra. As placas foram incubadas a 25°C durante sete dias e após o desenvolvimento satisfatório, foi adicionado 0,5 mL de formol, retirado a lamínula e adicionado lactofenol azul de algodão para análise <sup>56</sup>.

#### **4.3.5.3 Identificação molecular pelo seqüenciamento de rDNA**

##### **4.3.5.3.1 Extração do DNA genômico**

O procedimento para extração de DNA seguiu os princípios básicos da lise alcalina e digestão protéica por proteínas e K <sup>57</sup>.



A extração de DNA genômico foi adaptada do protocolo descrito por McCullough *et al*<sup>57</sup>. As amostras foram transferidas para microtubos “safe lock” de 2 mL contendo 500 mg de “glass-beads” (“Glass-beads” acid washed, 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ , Sigma®) e adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução tampão (1 mL de sorbitol 1M e 125 mM de EDTA). As amostras foram agitadas no agitador de tubos Precellys 24®, sendo realizados 3 ciclos de 40 segundos a 5000rpm, com intervalos de descanso de 20 segundos.

Após a agitação, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5804 R, Eppendorf®) em temperatura ambiente por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução tampão de extração (Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 0,2%) e 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K gelada (20mg/mL).

As amostras foram incubadas a 54°C por 12 horas. Em seguida, acrescentou-se 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio a 3M e os microtubos foram mantidos por 60 minutos a -20°C.

Foi realizada centrifugação a 4°C por 10 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 2 mL, sendo adicionado 1 mL de etanol 100% gelado. As amostras foram homogeneizadas por inversão e foi realizada centrifugação a 4°C por 10 minutos a 13000 rpm, ocorrendo precipitação do DNA.

O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado, seguida de nova centrifugação a 4°C por 10 minutos a 13000 rpm. Após esta etapa os microtubos foram incubados a 50°C por 20 minutos. Em seguida o DNA seco foi ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água MiliQ estéril aquecida e mantidos a -20°C até a sua utilização.

Para a quantificação do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue®.

Para a confirmação da presença do DNA e tamanho dos fragmentos, foi preparado gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1x (Tris-base 24,5g, Ácido bórico 27,82 g, EDTA 4,66g, Água MiliQ 1000 mL) e brometo de etídio 0,5 µg/mL. O tempo de corrida foi de 77 minutos, sendo os primeiros 11 minutos processados a 65V (volts) e os 66 minutos restantes a 80V (volts). O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA Low Mass Ladder. Foram aplicados no gel 4µL do material genético extraído e após eletroforese, foi visualizado por meio de um fotodocumentador AlphaImager®EC.

#### 4.3.5.3.2 Amplificação do DNA

A região ITS dos isolados fúngicos foi amplificada pela técnica de PCR com o uso dos primers (iniciadores) ITS-4 (5'TCCTCCGCTTA TTGA TATGC-3') e ITS5 (5'GGAA GTAAAAGTCGTAACAA GG-3'), de acordo com a técnica descrita por Kemker *et al*<sup>58</sup>. Para cada reação em cadeia pela polimerase foi adicionado ao microtubo 2,5 µL de tampão da Taq polimerase, 0,5 µL de dNTP mix, 1 µL do primer forward, 1 µL do primer reverse, 0,2 µL de Taq polimerase (Taq Amersham Biosciences), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL da amostra de DNA (10 ng/ µL), e água MiliQ até o volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler gradient-ependorf) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 1 ciclo a 94°C por 1 minuto, 1 ciclo de 58°C por 1 minuto, 1 ciclo de 72°C por 2 minutos, e 34 ciclos de 94°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Para a confirmação da amplificação e quantificação do DNA, foi preparado gel de agarose 2% em tampão de corrida TBE 1x (Tris-base 24,5g, Ácido bórico 27,82 g, EDTA 4,66g, Água MiliQ 1000 mL) e brometo de etídio 0,5 µg/mL. O tempo de corrida foi de 70 minutos, processados a 80V (volts). O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA Low Mass Ladder. Foram

aplicados no gel 4µL do material genético extraído e após eletroforese, foi visualizado por meio de um fotodocumentador AlphaImager®EC.

#### 4.3.5.3.3 Purificação do DNA

Para degradar os iniciadores não incorporados e hidrolisar os nucleotídeos livres, os produtos de PCR (*amplicons*) com aproximadamente 600pb foram purificados utilizando o kit ExoSAP-IT™ (Amersham Biosciences).

Foram adicionados 5 µL de ExoSAP-IT™ aos microtubos contendo 2 µL dos produtos de PCR (*amplicons*). A amostra foi homogeneizada e o termociclador (Mastercycler gradient-epENDORF) foi programado para 1 ciclo de 37°C por 20 minutos e 1 ciclo de 80°C por 20 minutos. Após a purificação, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Para a quantificação do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue®.

#### 4.3.5.3.4 Seqüenciamento do DNA

Para o seqüenciamento, os *amplicons* de aproximadamente 600 pb foram enviados ao Laboratório de Seqüenciamento e Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit. As amostras foram precipitadas com etanol, EDTA e acetato de sódio e ressuspensas em formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems). A temperatura de anelamento foi de 55°C.

As amostras foram seqüenciadas utilizando-se o seqüenciador ABI 3500 DNA Analyser (Applied Biosystems). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm, utilizando-se o polímero POP 7.

#### 4.3.5.3.5 Análise das seqüências

As seqüências *sense* e *antisense* obtidas foram visualizadas por meio do software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma e alinhadas pelo programa MEGA 4.0. Para a identificação dos isolados fúngicos, as sequencias foram analisadas comparativamente via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor score de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. A identificação foi realizada em nível de espécie, a partir da classificação taxonômica de seqüências de linhagens bem caracterizadas que apresentam os valores mais altos de similaridade com as seqüências submetidas.

#### 4.3.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados de freqüência de bactérias isoladas nas amostras dos diferentes grupos, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA). A freqüência de bactérias nas duas espécies de serpentes mantidas nos diferentes regimes de cativeiro foi comparada utilizando-se os testes “t” de Student e o teste de Tukey-Kramer.

Os resultados do antibiograma foram analisados utilizando-se os testes “ $\chi^2$ ” (Qui-quadrado) e análise de variância (ANOVA).

Todos os testes foram realizados com o nível de significância de 5%, utilizando-se o programa JUMP/SAS (versão 8.02)<sup>60</sup>.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Análise Bacteriológica

#### 4.4.1.1 Grupos de Estudo

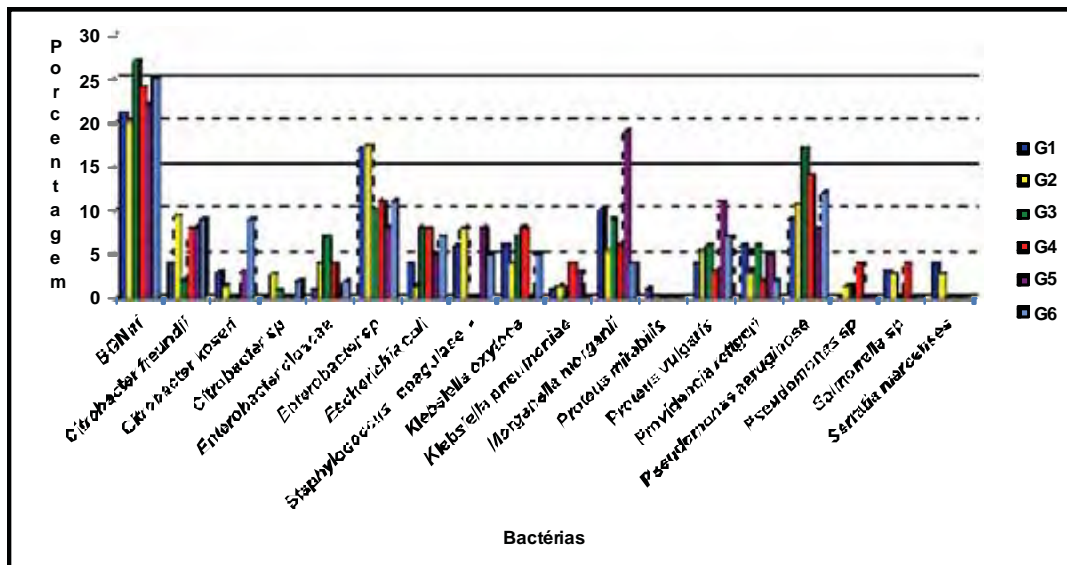
Foram avaliadas 30 serpentes *Caudisora durissa terrifica* e 26 serpentes *Bothropoides jararaca* num total de 56 animais divididos em seis grupos (G1 a G6). Foram obtidas 224 amostras, 426 isolados, 12 gêneros e um grupo (Bacilos gram negativos não fermentadores excluindo *Pseudomonas* spp).

As bactérias mais frequentemente isoladas foram Bacilos gram negativos não fermentadores (23,47%), *Enterobacter* sp (12,67%), *Pseudomonas aeruginosa* (12,4%) e *Morganella morganii* (8%) em diferentes frequências entre os grupos (Tabela 4.4 e Figura 4.6). As bactérias *P. aeruginosa* e *Pseudomonas* sp foram avaliadas isoladamente dos Bacilos gram negativos não fermentadores devido à relevância nos acidentes ofídicos e na clínica de répteis.

**Tabela 4.4.** Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das bactérias isoladas nos diferentes grupos de serpentes estudados.

Microorganismos		G1	G2	G3	G4	G5	G6	TOTAL
<b>BGNrf</b>	n	15	15	26	22	8	14	100
	%	21	20	27	24	22	25	23,47
<i>Citrobacter freundii</i>	n	3	7	2	7	3	5	27
	%	4	9,33	2	8	8	9	6,3
<i>Citrobacter diversus</i>	n	2	1	0	0	1	5	9
	%	3	1,33	0	0	3	9	2,1
<i>Citrobacter sp</i>	n	0	2	1	0	0	1	4
	%	0	2,66	1	0	0	2	0,94
<i>Enterobacter cloacae</i>	n	1	3	7	3	0	1	15
	%	1	4	7	4	0	2	3,5
<i>Enterobacter sp</i>	n	12	13	10	10	3	6	54
	%	17	17,33	10	11	8	11	12,67
<i>Escherichia coli</i>	n	3	1	7	7	2	4	24
	%	4	1,33	8	8	5	7	5,6
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	n	4	6	0	0	3	3	16
	%	6	8	0	0	8	5	3,75
<i>Klebsiella oxytoca</i>	n	4	3	7	7	0	3	24
	%	6	4	7	8	0	5	5,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n	1	1	0	4	1	0	7
	%	1	1,33	0	4	3	0	1,6
<i>Morganella morganii</i>	n	7	4	10	5	7	2	34
	%	10	5,33	9	6	19	4	8
<i>Proteus mirabilis</i>	n	1	0	0	0	0	0	1
	%	1	0	0	0	0	0	0,23
<i>Proteus vulgaris</i>	n	3	4	5	3	4	4	24
	%	4	5,33	6	3	11	7	5,87
<i>Providencia rettgeri</i>	n	4	2	6	2	2	1	17
	%	6	2,66	6	2	5	2	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n	6	8	17	13	3	6	53
	%	9	10,7	17	14	8	12	12,4
<i>Pseudomonas sp</i>	n	0	1	0	3	0	0	4
	%	0	1,35	0	4	0	0	0,94
<i>Salmonella sp</i>	n	2	2	0	4	0	0	8
	%	3	2,66	0	4	0	0	1,88
<i>Serratia marcescens</i>	n	3	2	0	0	0	0	5
	%	4	2,66	0	0	0	0	1,17

BGNrf: Bacilos gram-negativos não fermentadores excluindo *Pseudomonas* spp; G1: *B. jararaca* recém-capturadas; G2: *C.d. terrifica* recém-capturadas; G3: *B. jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G4: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *B. jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; G6: *C.d.terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo.

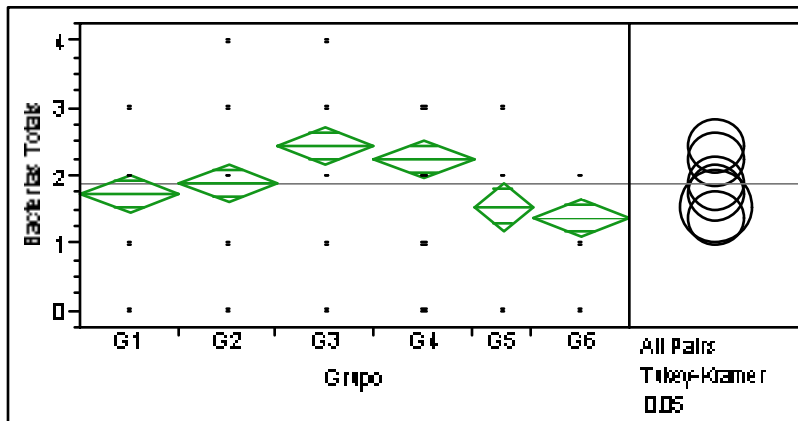


**Figura 4.6.** Frequência relativa (%) das bactérias isoladas nos diferentes grupos de estudo (G1 a G6).

BGNnf: Bacilo gram-negativo não fermentador; *Staphylococcus coagulase (-)*: *Staphylococcus coagulase* negativa; G1: *B. jararaca* recém-capturadas; G2: *C.d.terrifica* recém-capturadas; G3: *B. jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G4: *C.d.terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *B. jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; G6: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo.

O teste ANOVA (Análise de Variância) foi utilizado para verificar se ocorreram diferenças na frequência do isolamento das bactérias entre as variáveis estudadas (regime de cativeiro, espécie de serpente e tipo de amostra). O teste de Tukey-Kramer e o teste “t” de Student foram utilizados para verificar entre quais grupos houve diferença estatisticamente significativa na frequência de isolamento de bactérias.

A Figura 4.7 e Tabela 3 - Anexo II, apresentam resultados do teste de Tukey-Kramer e do teste ANOVA utilizados na comparação entre o número total de bactérias isoladas nas diferentes amostras e os grupos de estudo (G1 a G6). Foi observado similaridade no número total de bactérias isoladas nas amostras dos grupos G1 e G2, G3 e G4 e G5 e G6 e diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2 com G3, G4, G5 e G6 e grupos G3 e G4 com G5 e G6.



**Figura 4.7.** Análise comparativa da frequência de bactérias isoladas nos diferentes grupos de estudo (G1 a G6).

G1: *B. jararaca* recém-capturadas; G2: *C.d.terrifica* recém-capturadas; G3: *B. jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G4: *C.d.terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *B. jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; G6: *C.d.terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo.

#### 4.4.1.2 Amostras

Na análise da frequência de bactérias provenientes das amostras de peçonha, cavidade oral, cloacal e escamas, foi constatado que as amostras provenientes da cavidade cloacal e oral foram responsáveis pelo maior número de isolados, com 32,16% e 30,75% respectivamente (Tabela 4.6).

Os Bacilos gram negativos não fermentadores (incluindo *Pseudomonas aeruginosa*), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* foram encontrados em amostras de todos os grupos estudados. A bactéria *Proteus mirabilis* foi encontrada somente em amostras de cavidade oral do grupo G1, *Serratia marcescens* encontrada somente na cavidade oral dos grupos G1 e G2, e os *Staphylococcus coagulase* negativa somente nas escamas dos grupos G1, G2, G5 e G6. *Citrobacter diversus* foi isolada somente em amostras de cavidade cloacal e escamas dos grupos G1, G2, G5 e G6 (Tabela 4.7).



**Tabela 4.5.** Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das amostras isoladas nos diferentes grupos de estudo (G1 a G6).

GRUPO	VE (%)	CO (%)	CC (%)	ESC (%)	TOTAL (%)
G1	8 (11,27)	20 (28,17%)	25 (35,21)	18 (25,35)	71 (16,67)
G2	8 (10,67)	25 (33,33)	22 (29,33)	20 (26,67)	75 (17,61)
G3	12 (12,24)	30 (30,61)	29 (29,6)	27 (27,55)	98 (23)
G4	10 (11,11)	29 (32,22)	28 (31,11)	23 (25,56)	90 (21,13)
G5	0 (0)	12 (32,43)	13 (35,14)	12 (32,43)	37 (8,68)
G6	0 (0)	15 (27,28)	20 (36,36)	20 (36,36)	55 (12,91)
<b>TOTAL (%)</b>	<b>38 (8,92)</b>	<b>131 (30,75)</b>	<b>137 (32,16)</b>	<b>120 (28,17)</b>	<b>426 (100)</b>

VE: peçonha; CO: cavidade oral; CC: cavidade cloacal; ESC: escamas G1 e G2 *B. jararaca* e *C. d. terrifica* recém-capturadas; G3 e G4: *B. jararaca* e *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5 e G6: *B. jararaca* e *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo.

**Tabela 4.6.** Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das bactérias isoladas nas diferentes amostras dos grupos estudados.

Microorganismos	VE	CO	CC	ESC
BGN não fermentadores	G1, G2, G3, G4	T	T	T
<i>Citrobacter freundii</i>	G4	G4	T	G1, G2, G4, G5, G6
<i>Citrobacter diversus</i>	∅	∅	G1, G2, G5 e G6	G6
<i>Citrobacter</i> sp	∅	G3, G6	G2	∅
<i>Enterobacter cloacae</i>	∅	G3	G2, G3, G4, G6	G1, G3, G4
<i>Enterobacter</i> sp	G1, G2, G4	G1, G2, G3, G4, G5	T	G1, G2, G3, G4, G6
<i>Escherichia coli</i>	∅	G4	T	G1, G3
<i>Staphylococcus coagulase -</i>	∅	∅	∅	G1, G2, G5, G6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	G4	G3, G4	G1, G2, G3, G4, G6	G1, G2, G3, G4, G6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	∅	∅	G1, G2, G4, G5	G4
<i>Morganella morganii</i>	G1, G2, G3, G4	T	G5	G3, G5
<i>Proteus mirabilis</i>	∅	G1	∅	∅
<i>Proteus vulgaris</i>	G1, G3	G2, G3, G4, G5, G6	G1, G2	G2, G3, G4, G5
<i>Providencia rettgeri</i>	G1, G3, G4	T	∅	∅
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G2, G4	T	T	G4
<i>Pseudomonas</i> sp	∅	G4	G4	G1
<i>Salmonella</i> sp	G2	G1, G2, G4	G4	G1, G4
<i>Serratia marcenses</i>	∅	G1, G2	∅	∅

VE: peçonha; CO: cavidade oral; CC: cavidade cloacal; ESC: escamas; G1: *B. jararaca* recém-capturadas; G2: *C. d. terrifica* recém-capturadas; G3: *B. jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G4: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *B. jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; G6: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo; T: todos os grupos (G1 a G6), ∅: não isolado.

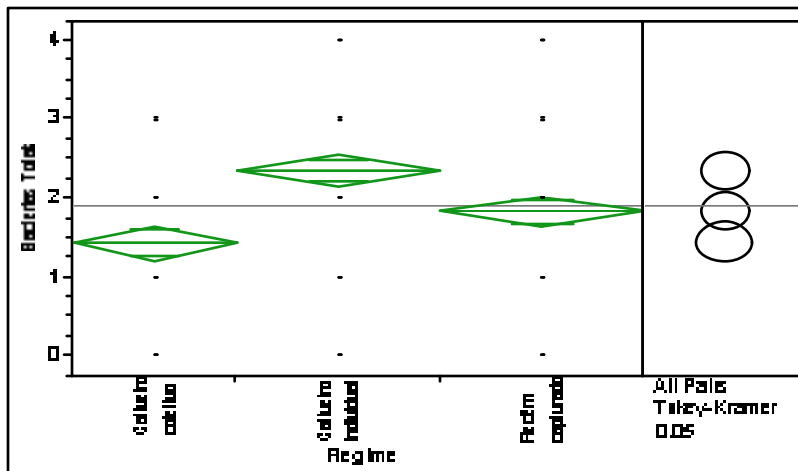
Os bacilos gram-negativos não fermentadores (39,47%), *Morganella morganii* (18,42%) e *Providencia rettgeri* (13,15%) foram os principais microorganismos isolados em amostras de peçonha. Em amostras de cavidade oral, os isolados mais freqüentes foram Bacilos gram-negativos não fermentadores (19,1%), *Morganella morganii* (18,33%) e *Pseudomonas aeruginosa*. Para as amostras de cavidade cloacal, *Pseudomonas aeruginosa* (16,05%), Bacilos gram negativos não fermentadores (14,6%), *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* sp (ambos com 12,4%) foram responsáveis pelo maior freqüência de isolados. Em amostras de escamas, os Bacilos gram negativos não fermentadores (33,35%), *Enterobacter* sp (17,5%) e *Staphylococcus coagulase negativa* (13,34%), foram os principais agentes isolados (Tabela 4.8).

**Tabela 4.7.** Distribuição das frequências absoluta (n) e relativa (%) das bactérias isoladas nas diferentes amostras analisadas.

Microorganismo	VE (%)	CO (%)	CC (%)	ESC (%)
<i>BGNnf</i>	15 (39,47)	25 (19,1)	20 (14,6)	40 (33,35)
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (2,64)	1 (0,76)	17 (12,4)	8 (6,67)
<i>Citrobacter koseri</i>	0 (0)	0 (0)	8 (5,84)	1 (0,83)
<i>Citrobacter sp</i>	0 (0)	3 (2,29)	1 (0,74)	0 (0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (0)	2 (1,52)	10 (7,29)	3 (2,5)
<i>Enterobacter sp</i>	3 (7,89)	13 (9,92)	17 (12,4)	21 (17,5)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0)	3 (2,29)	16 (11,67)	5 (4,16)
<i>Estafilo coag -</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16 (13,34)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (2,64)	3 (2,29)	15 (10,96)	5 (4,16)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 (0)	0 (0)	4 (2,92)	3 (2,5)
<i>Morganella morganii</i>	7 (18,42)	24 (18,33)	2 (1,45)	1 (0,83)
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (0)	1 (0,76)	0 (0)	0 (0)
<i>Proteus vulgaris</i>	3 (7,89)	11 (8,4)	1 (0,74)	9 (7,5)
<i>Providencia rettgeri</i>	5 (13,15)	11 (8,4)	1 (0,74)	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (5,26)	23 (17,55)	22 (16,05)	6 (5)
<i>Pseudomonas sp</i>	0 (0)	2 (1,52)	1 (0,74)	1 (0,83)
<i>Salmonella sp</i>	1 (2,64)	4 (3,05)	2 (1,46)	1 (0,83)
<i>Serratia marcescens</i>	0 (0)	5 (3,82)	0 (0)	0 (0)
<b>TOTAL</b>	<b>38 (8,92)</b>	<b>131 (30,75)</b>	<b>137 (32,16)</b>	<b>120 (28,17)</b>

VE: peçonha; CO: cavidade oral; CC: cavidade cloacal; ESC: escamas; BGNnf: Bacilos gram-negativos não fermentadores, excluindo *Pseudomonas spp*; *Staphylococcus coag (-)*: *Staphylococcus coagulase negativa*.

Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência de bactérias isoladas nas amostras das serpentes mantidas em cativeiro individual, coletivo e recém-capturado (Figura 4.8 e Tabela 4 - Anexo II).



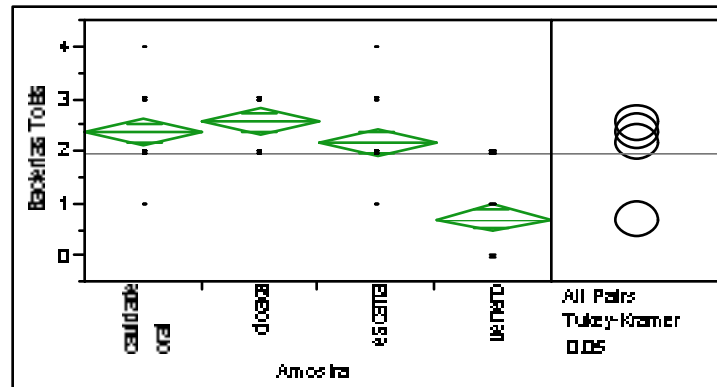
**Figura 4.8.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas nas amostras e o regime de cativeiro utilizado.

Cativeiro coletivo: cativeiro semi-extensivo; Cativeiro individual: cativeiro semi-extensivo.

A Figura 4.9 e a Tabela 5 – Anexo II, apresentam os resultados da frequência de bactérias isoladas nas diferentes amostras analisadas. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência de bactérias isoladas nas amostras de peçonha (veneno) em relação às demais amostras.



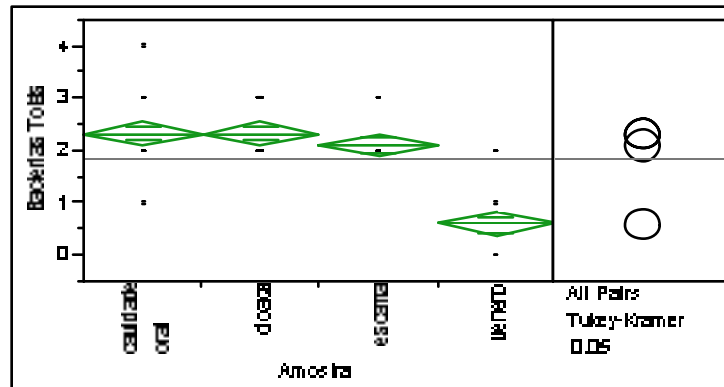
A Figura 4.11 e a Tabela 7 – Anexo II apresentam os resultados da frequência de bactérias isoladas nas diferentes amostras provenientes de *Bothropoides jararaca*. Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência de bactérias isoladas das amostras de peçonha (veneno) e as amostras de escamas, cavidade cloacal e cavidade oral.



**Figura 4.11.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas em amostras de *Bothropoides jararaca*.

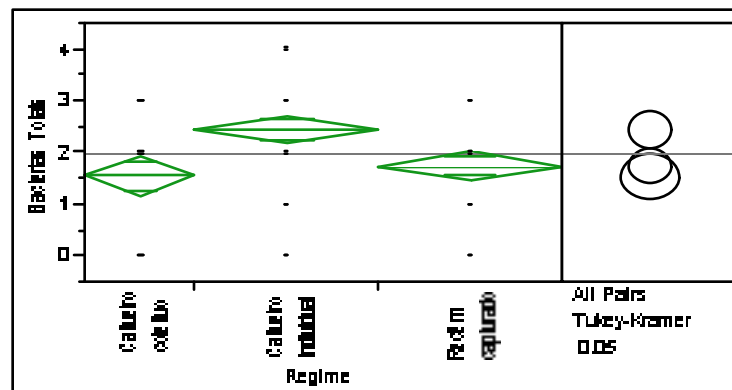
Veneno: peçonha.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência de bactérias isoladas das amostras de peçonha e as amostras de escamas, cavidade cloacal e cavidade oral de *Caudisona durissa terrifica* (Figura 4.12 e Tabela 8 – Anexo II).



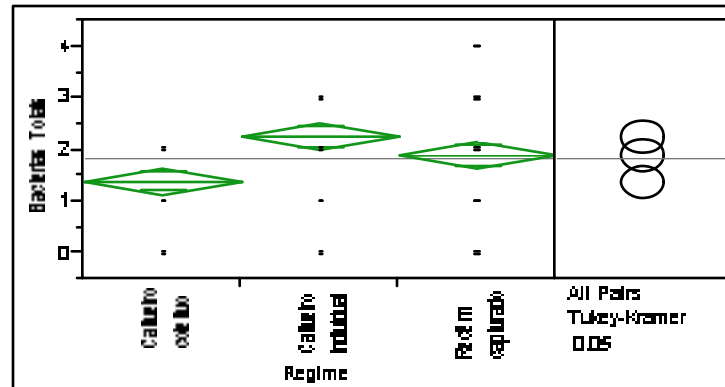
**Figura 4.12.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas em amostras de *Caudisora durissa terrifica*.

Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências das bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente *Bothropoides jararaca*. O cativeiro intensivo apresentou a maior frequência de isolados, seguido do recém-capturado e do cativeiro semi-extensivo (Figura 4.13 e Tabela 9 – Anexo II).



**Figura 4.13.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente *Bothropoides jararaca*.

Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências das bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente *Caudisona durissa terrifica*. O cativeiro intensivo apresentou a maior frequência de isolados, seguido do recém-capturado e do cativeiro semi-extensivo (Figura 4.14 e Tabela 10 – Anexo II).

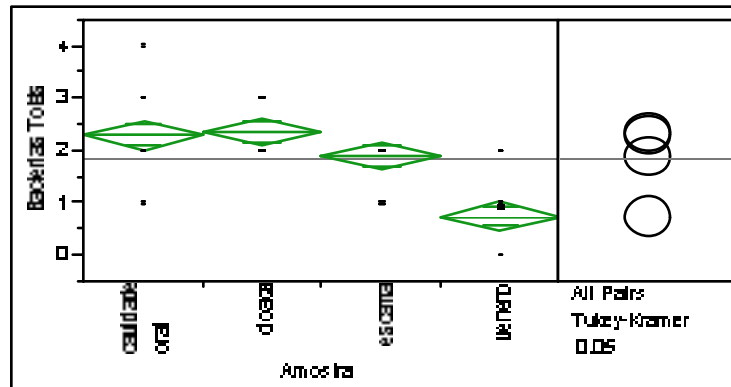


**Figura 4.14.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente *Caudisona durissa terrifica*.

Cativeiro coletivo: cativeiro semi-extensivo; Cativeiro individual: cativeiro semi-extensivo.

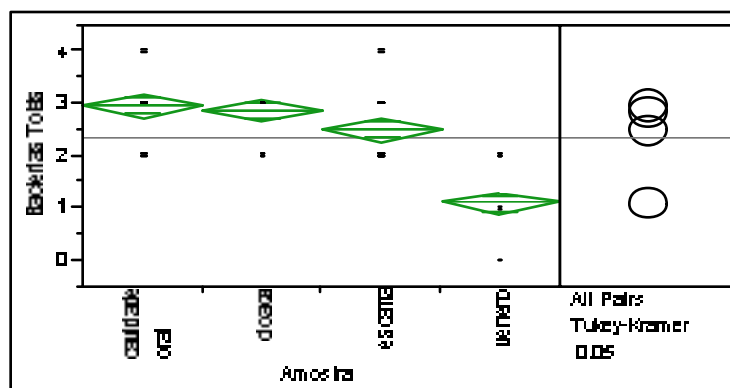
#### 4.4.1.4 Regimes de cativeiro

A Figura 4.15 e a Tabela 11 – Anexo II apresentam os resultados obtidos na frequência de bactérias isoladas nas amostras das serpentes recém-capturadas. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o número total de bactérias isoladas das amostras de peçonha (veneno) e escamas em relação às demais amostras (cavidade oral e cloaca).



**Figura 4.15.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas em amostras de serpentes recém-capturadas

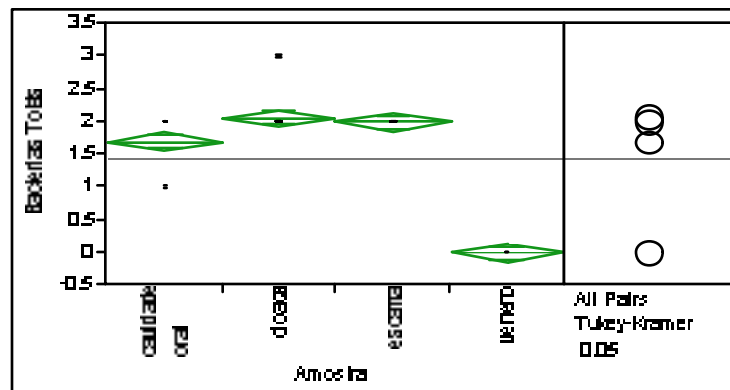
Na avaliação entre o número total de bactérias isoladas nas amostras das serpentes mantidas em cativeiro intensivo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência de bactérias isoladas e as amostras de peçonha (veneno) e amostras de escamas em relação às demais amostras (cavidade oral e cloaca) (Figura 4.16 e Tabela 12 – Anexo II).



**Figura 4.16.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas em amostras de serpentes mantidas em cativeiro intensivo.



Os resultados obtidos da comparação entre a frequência de bactérias isoladas e amostras das serpentes mantidas em cativeiro semi-extensivo mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência de bactérias isoladas nas amostras de peçonha (veneno) e amostras de cavidade oral em relação às demais amostras (cavidade cloacal e escama) (Figura 4.17 e Tabela 13 – Anexo II).



**Figura 4.17.** Análise comparativa entre a frequência de bactérias isoladas em amostras das serpentes mantidas em cativeiro semi-extensivo.

#### 4.4.2 Antibiograma

Foram realizados 129 antibiogramas dos isolados obtidos das amostras de cavidade oral e peçonha das serpentes estudadas. As amostras foram classificadas como “sensíveis”, “resistentes” e “intermediárias”. Os resultados dos antibiogramas estão representados nas Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10.

Os antimicrobianos que apresentaram altos índices de sensibilidade foram Amicacina, Norfloxacina e Tobramicina, com 98,45%. Entre os que apresentaram sensibilidade intermediária estão a Tigecilina (20,2%) e o Cloranfenicol (19,4%). A Amoxicilina (7,75%) e Ampicilina (37,21%) apresentaram os índices mais baixos de sensibilidade.

Os maiores índices de resistência frente aos 12 antimicrobianos testados foram observados para *Enterobacter* sp (50%) e *Pseudomonas aeruginosa* (41,67%). *Pseudomonas* sp foi o único agente sensível a todos os antimicrobianos utilizados.

Das 129 amostras testadas, somente 28 (21,70%) apresentaram resistência a um único antimicrobiano (96,43% para Amoxicilina e 3,57% para Ampicilina). Cento e vinte e sete amostras (98,45%) foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos, ocorrendo nove diferentes combinações entre eles. A resistência múltipla (estirpes resistentes a três ou mais antimicrobianos) foi observada em 36 amostras (27,90%), e a combinação mais freqüente ocorreu entre Amoxicilina, Ampicilina e Polimixina B (37%).

**Tabela 4.8.** Perfil de sensibilidade (%) dos 129 microorganismos isolados da cavidade oral e peçonha dos diferentes grupos estudados.

Isolados	N	AMI	AMO	AMP	CTF	CLO	ENO	GEN	NOR	POL	SUT	TIG	TOB
<i>Citrobacter</i> sp	4	100	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100
<i>Citrobacter freundii</i>	2	100	0	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter</i> sp	15	93,33	26,67	46,67	60	66,6	100	86,67	93,3	100	100	100	86,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	100	0	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	3	100	25	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Morganella morganii</i>	31	100	0	9,7	100	100	100	100	100	42	96,7	96,7	100
<i>Proteus mirabilis</i>	1	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Proteus vulgaris</i>	15	100	6,7	60	100	100	100	100	100	86,67	100	100	100
<i>Pseudomonas</i> sp	2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	100	0	0	16	16	80	100	100	100	40	0	100
<i>Providencia rettgeri</i>	16	100	0	100	100	100	100	100	100	62,5	100	100	100
<i>Salmonella</i> sp	4	75	50	50	100	100	75	100	75	100	100	100	100
<i>Serratia marcescens</i>	5	100	0	0	20	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>TOTAL</b>	<b>129</b>	<b>98,45</b>	<b>7,75</b>	<b>37,21</b>	<b>75,2</b>	<b>79,83</b>	<b>95,35</b>	<b>97,45</b>	<b>98,45</b>	<b>79,85</b>	<b>87,6</b>	<b>79,8</b>	<b>98,45</b>

N: frequência absoluta; AMI: Amicacina (30 µg); AMO: Amoxicilina (10 µg); AMP: Ampicilina (10 µg); CTF: Ceftidur (30 µg); CLO: Cloranfenicol (30 µg); ENO: Enrofloxacin (5µg); GEN: Gentamicina (10 µg); NOR: Norfloxacin (10 µg); POL: Polimixina B (300 µg); SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim (25 µg); TIG: Tigecilina (15 µg); TOB: Tobramicina (10µg).

**Tabela 4.9.** Perfil de resistência (%) dos 129 micro organismos isolados da cavidade oral e peçonha dos diferentes grupos estudados.

Isolados	N	AMI	AMO	AMP	CTF	CLO	ENO	GEN	NOR	POL	SUT	TIG	TOB
<i>Citrobacter</i> sp	4	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp	15	6,67	53,33	46,67	40	6,67	0	6,67	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	3	0	25	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiela oxytoca</i>	4	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>	31	0	87	87	0	0	0	0	0	51,6	3,3	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	15	0	93,33	20	0	0	0	0	0	13,33	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	0	100	100	44	0	8	0	0	0	32	0	0
<i>Providencia rettgeri</i>	16	0	93,75	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp	4	25	25	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	5	0	80	80	40	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>129</b>	<b>1,55</b>	<b>82,95</b>	<b>55,81</b>	<b>14,8</b>	<b>0,77</b>	<b>1,55</b>	<b>0</b>	<b>0,77</b>	<b>17,05</b>	<b>6,97</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

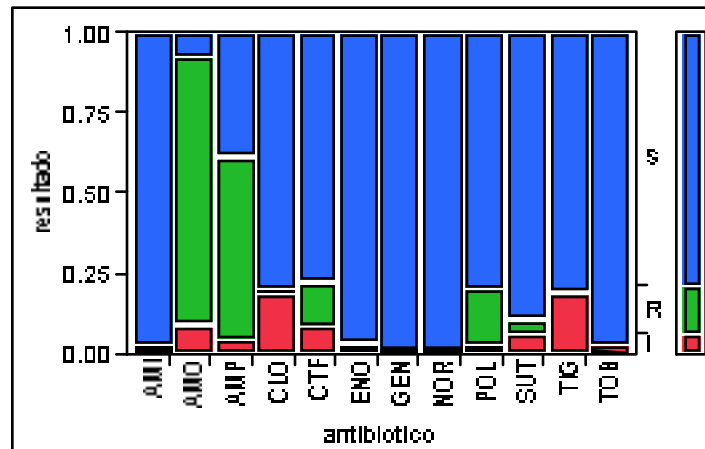
N: frequência absoluta; AMI: Amicacina (30 µg); AMO: Amoxicilina (10 µg); AMP: Ampicilina (10 µg); CTF: Cefotiofur (30 µg); CLO: Cloranfenicol (30 µg); ENO: Enrofloxacin (5µg); GEN: Gentamicina (10 µg); NOR: Norfloxacin (10 µg); POL: Polimixina B (300 µg); SUT: Sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg); TIG: Tigecilina (15 µg); TOB: Tobramicina (10 µg).

**Tabela 4.10.** Perfil de sensibilidade intermediária (%) dos 129 microorganismos isolados da cavidade oral e peçonha dos diferentes grupos estudados

Isolados	N	AMI	AMO	AMP	CTF	CLO	ENO	GEN	NOR	POL	SUT	TIG	TOB
<i>Citrobacter</i> sp	4	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp	15	0	20	6,66	0	26,67	0	13,3	0	0	0	0	13,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>	31	0	13	3,2	0	0	0	0	0	6,4	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	15	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	0	0	0	40	84	12	0	0	0	28	100	0
<i>Providencia rettgeri</i>	16	0	6,25	0	0	0	0	0	0	12,5	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp	4	0	25	0	0	0	25	0	25	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	5	0	20	20	40	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>129</b>	<b>0</b>	<b>9,3</b>	<b>6,98</b>	<b>10</b>	<b>19,4</b>	<b>3,1</b>	<b>2,55</b>	<b>0,78</b>	<b>3,1</b>	<b>5,43</b>	<b>20,2</b>	<b>1,55</b>

N: frequência absoluta; AMI: Amicacina (30 µg); AMO: Amoxicilina (10 µg); AMP: Ampicilina (10 µg); CTF: Ceftiofur (30 µg); CLO: Cloranfenicol (30 µg); ENO: Enrofloxacin (5 µg); GEN: Gentamicina (10 µg); NOR: Norfloxacin (10 µg); POL: Polimixina B (300 µg); SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim (25 µg); TIG: Tigecilina (15 µg); TOB: Tobramicina (10 µg).

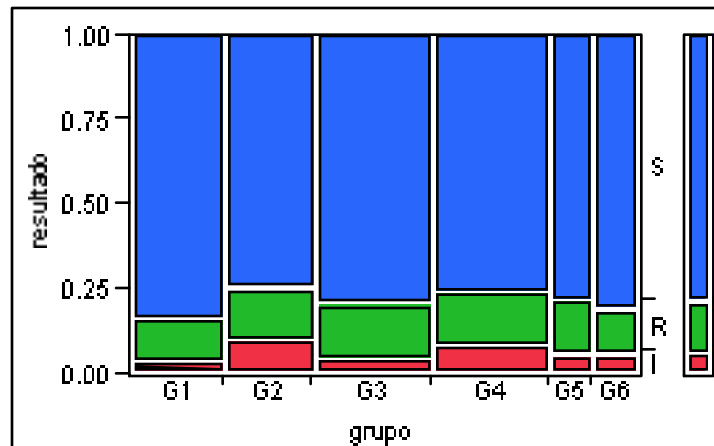
A análise do teste  $\chi^2$  (qui-quadrado) mostrou que cada uma das bactérias isoladas no experimento respondeu de forma diferenciada aos 12 antimicrobianos testados (Figura 4.18 e Tabela 12 – Anexo II).



**Figura 4.18.** Teste  $\chi^2$  (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário” (I) e “resistente” (R) frente aos 12 antimicrobianos testados.

AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Ceftiofur; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacina; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; POL: Polimixina B; SUT: Sulfametoxazol-trimetoprim; TIG: Tigecilina; TOB: Tobramicina.

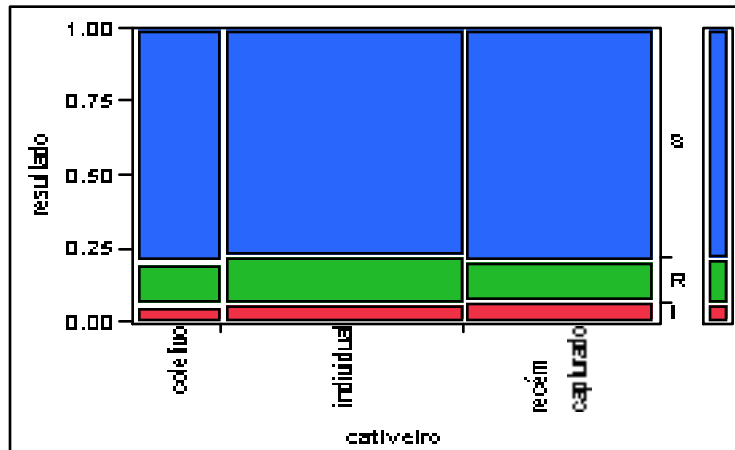
Na comparação dos antibiogramas entre os seis grupos estudados, foi constatado que houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos (Figura 4.19 e Tabela 14 – Anexo II).



**Figura 4.19.** Teste  $\chi^2$  (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário” (I) e “resistente” (R) dos isolados dos diferentes grupos analisados (G1 a G6).

G1: *B. jararaca* recém-capturadas; G2: *C.d.terrifica* recém-capturadas; G3: *B. jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G4: *C.d.terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *B. jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; G6: *C.d.terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo.

Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa na análise do antibiograma entre os isolados das serpentes recém capturadas, mantidas em cativeiro intensivo e semi-extensivo (Figura 4.20 e Tabela 15 – Anexo II).

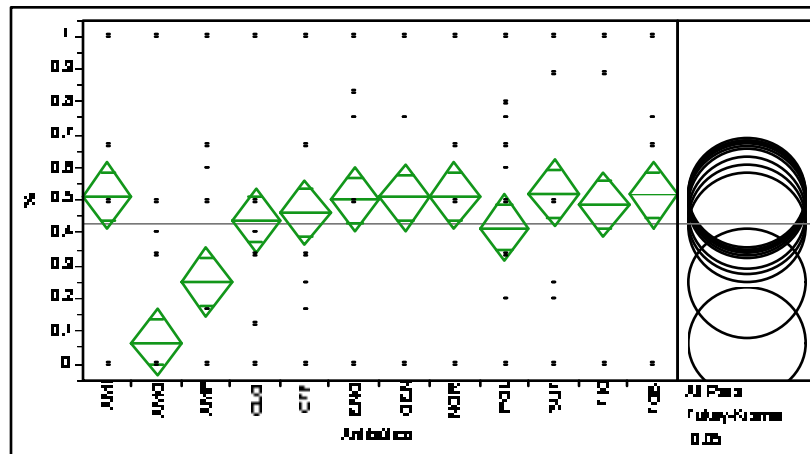


**Figura 4.20.** Teste  $\chi^2$  (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário” (I) e “resistente” (R) dos isolados nos diferentes regimes de cativeiro.

Cativeiro coletivo: cativeiro semi-extensivo; Cativeiro individual: cativeiro intensivo.

O teste de Tukey-Kramer e a análise de variância (ANOVA) indicaram que na comparação entre os resultados considerados “sensível” (S), houve diferença estatisticamente significativa entre a Amoxicilina e Ampicilina em relação aos demais antimicrobianos testados (Figura 4.21 e Tabela 16 – Anexo II).

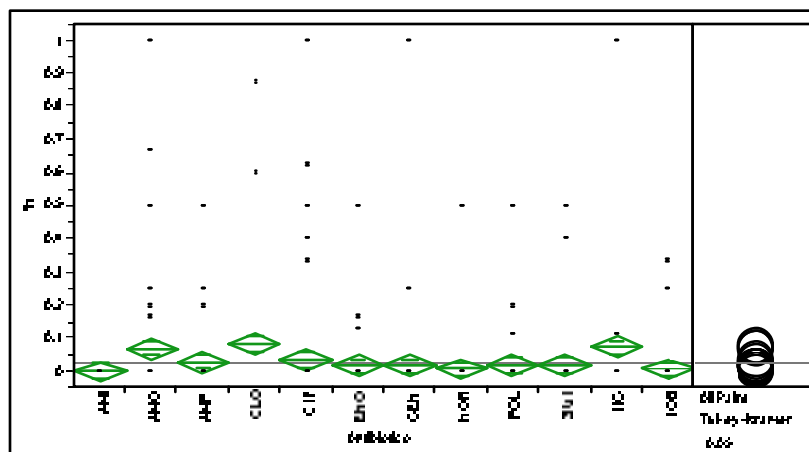




**Figura 4.21.** Análise da comparação entre os resultados “sensível” (S) obtidos frente aos 12 antimicrobianos e estados.

AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Cefotiofur; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacina (5 $\mu$ g); GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; POL: Polimixina B; SUT: Sulfametoxazol + trimetoprim; TIG: Tigecilina; TOB: Tobramicina.

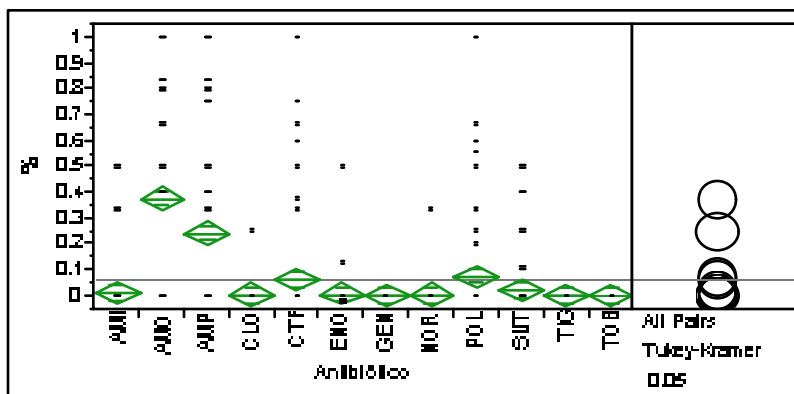
Na comparação dos resultados “intermediário” (I), foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre a Amoxicilina, Cloranfenicol e Tigecilina em relação aos demais antimicrobianos testados (Figura 4.22 e Tabela 17 – Anexo II).



**Figura 4.22.** Análise da comparação entre os resultados “intermediário” (I) obtidos frente aos 12 antimicrobianos testados

AM: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Cefotiofur; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacina; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; POL: Polimixina B; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim; TIG: Tigeciclina; TOB: Tobramicina.

Na comparação dos resultados “resistente” (R), houve diferença estatisticamente significativa entre a Amoxicilina e Ampicilina em relação aos demais antimicrobianos testados (Figura 4.23 e Tabela 18 – Anexo II).



**Figura 4.23.** Análise da comparação entre os resultados “resistente” (R) obtidos frente aos 12 antimicrobianos testados

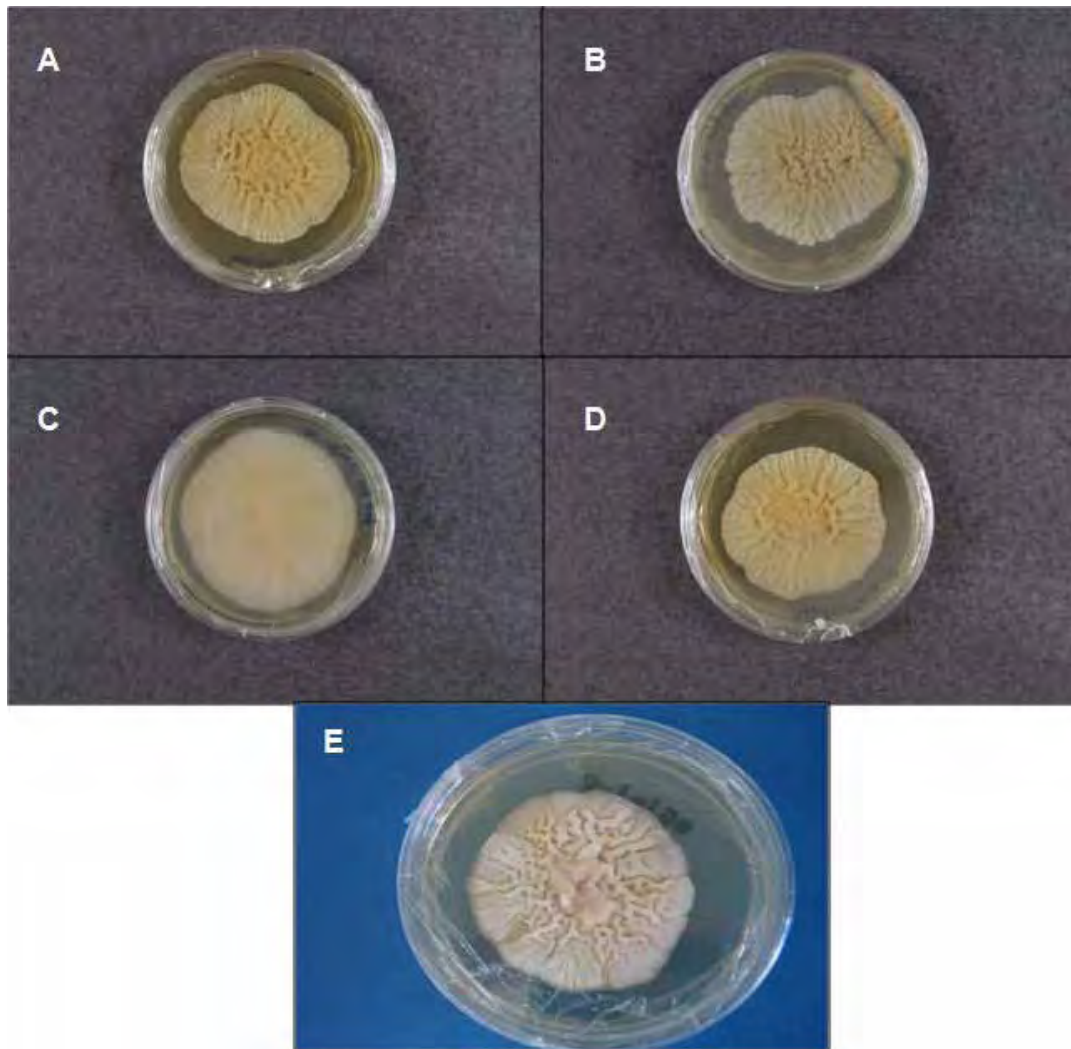
AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Cefotiofur; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacina; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; POL: Polimixina B; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim; TIG: Tigeciclina; TOB: Tobramicina.

#### 4.4.3 Análise micológica

Foram obtidos cinco isolados de fungos leveduriformes na análise micológica provenientes de três animais com lesões sugestivas de micose (*Bothrops moojeni*, *Bothropoides pauloensis* e *Caudisona durissa terrifica*), e duas *Bothropoides jararaca* mantidas em cativeiro intensivo.

##### 4.4.3.1 Macromorfologia

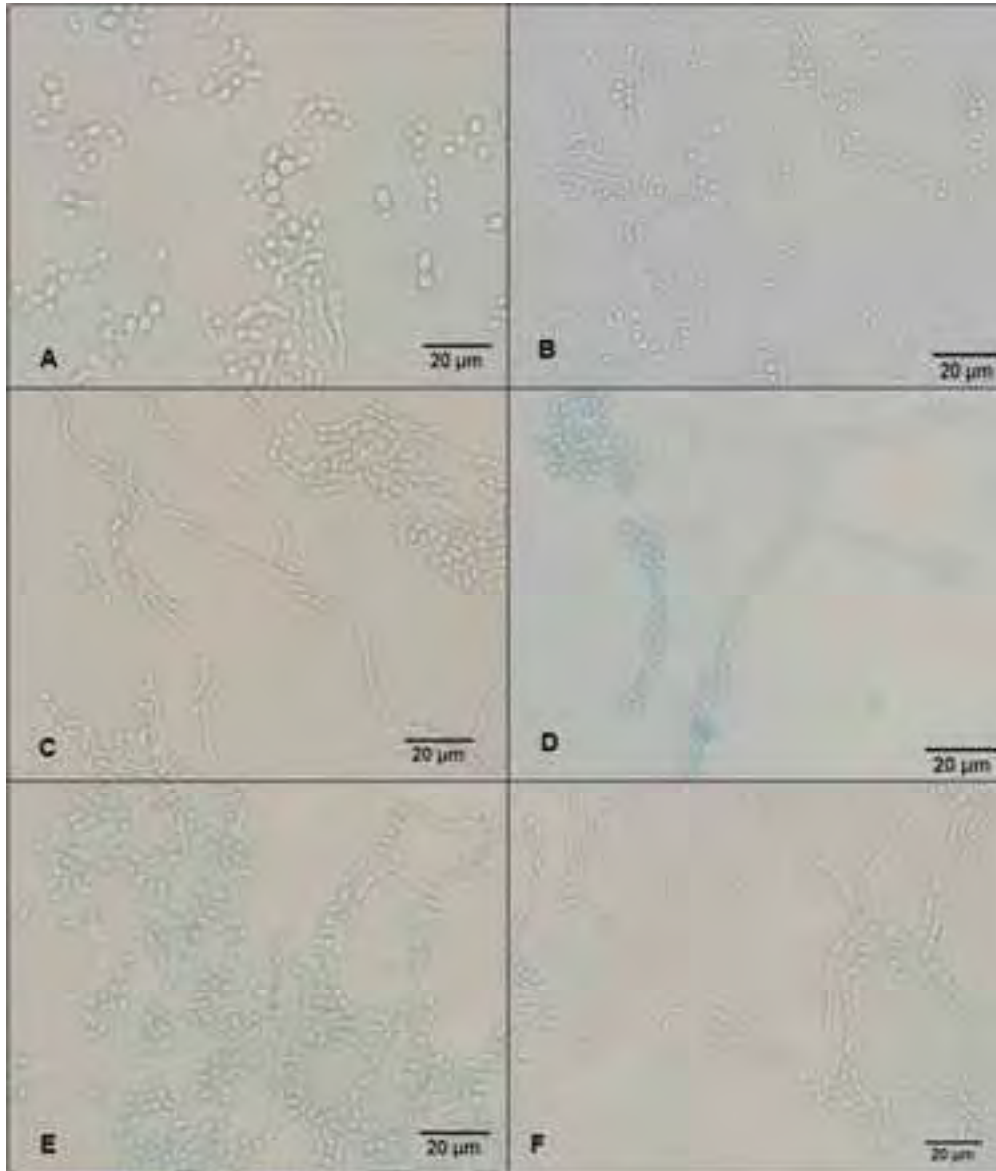
De maneira geral, os cultivos de leveduras mantidos em temperatura ambiente (25°C) apresentaram rápido crescimento, coloração creme, aspecto seco e opaco, textura membranosa, formato cerebriforme com superfície rugosa ou estriada, tornando-se com o tempo levemente penugentas e aderindo fortemente ao meio de cultura. Somente uma cultura (20%) apresentou textura lisa, mas com aspecto semelhante as demais leveduras. Todas as colônias foram identificadas fenotipicamente como *Trichosporon* sp (Figuras 4.24 A-E).



**Figuras 4.24 A-E.** Macromorfologia dos isolados de *Trichosporon* sp em escamas de serpentes. **A)** Amostra 5: *Bothrops moojeni* (RG 1350); **B)** Amostra 4: *Bothropoides jararaca* (RG 860); **C)** Amostra 3: *Bothropoides pauloensis* (RG 828); **D)** Amostra 2: *Bothropoides jararaca* (RG 564); **E)** Amostra 1: *Caudisona durissa terrifica* (RG 158).

#### 4.4.3.2 Micromorfologia

O exame microscópico de todos os isolados de *Trichosporon* sp revelou blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (Figuras 4.25 A-F).



**Figura 4.25 A-F.** Características morfológicas de *Trichosporon* sp em Agar Saboraud Dextrose (SAB). **A)** Bastoconídeos, artroconídeos e pseudo-hifas. **B)** Amostra 5: *Bothrops moojeni* (RG 1350); **C)** Amostra 4: *Bothropoides jararaca* (RG 860); **D)** Amostra 3: *Bothropoides pauloensis* (RG 828); **E)** Amostra 2: *Bothropoides jararaca* (RG 564); **F)** Amostra 1: *Caudisona durissa terrifica* (RG 158).

#### 4.4.3 Identificação molecular pelo sequenciamento de rDNA

As colônias fúngicas foram submetidas à extração do DNA genômico para a realização da reação em cadeia pela ação da polimerase (PCR). Duas amostras foram provenientes das serpentes envolvidas no estudo microbiológico (amostras 2 e 4) e três foram provenientes de animais com lesões sugestivas de micose (1,3 e 5) (Tabela 4.28).

**Tabela 4.11.** Amostras utilizadas para identificação molecular pelo sequenciamento de rDNA.

N	Amostra	Espécie	RG
1	Escamas	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	158
2	Escamas	<i>Bothrops jararaca</i>	564
3	Escamas	<i>Bothrops pauloensis</i>	828
4	Escamas	<i>Bothrops jararaca</i>	860
5	Escamas	<i>Bothrops moojeni</i>	1350

N: n<sup>o</sup> da amostra; RG: número de registro da serpente.

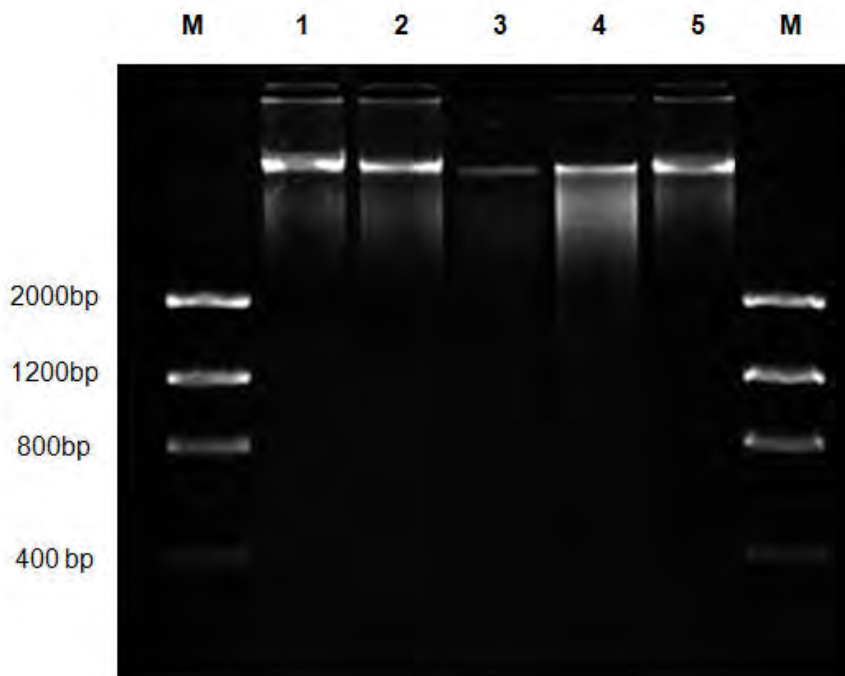
##### 4.4.3.1 Extração do DNA genômico

A Tabela 4.29 e a Figura 4.26 mostram respectivamente a determinação da concentração e a visualização do produto da extração das amostras identificadas como *Trichosporon* sp em escamas de serpentes.

**Tabela 4.12.** Quantificação do produto de extração analisado em espectrofotômetro NanoVue®.

N	RG	Ng/ $\mu$ g/ $\mu$ L	A <sub>280/260</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	158	549,5	1.761	1.407
2	564	579	1.773	1.385
3	828	560	1.769	1.418
4	860	586	1.762	1.139
5	1530	594.0	1.737	1.186

N: número da amostra; RG: número de registro da serpente; Ng: nanogramas; A: absorvância.

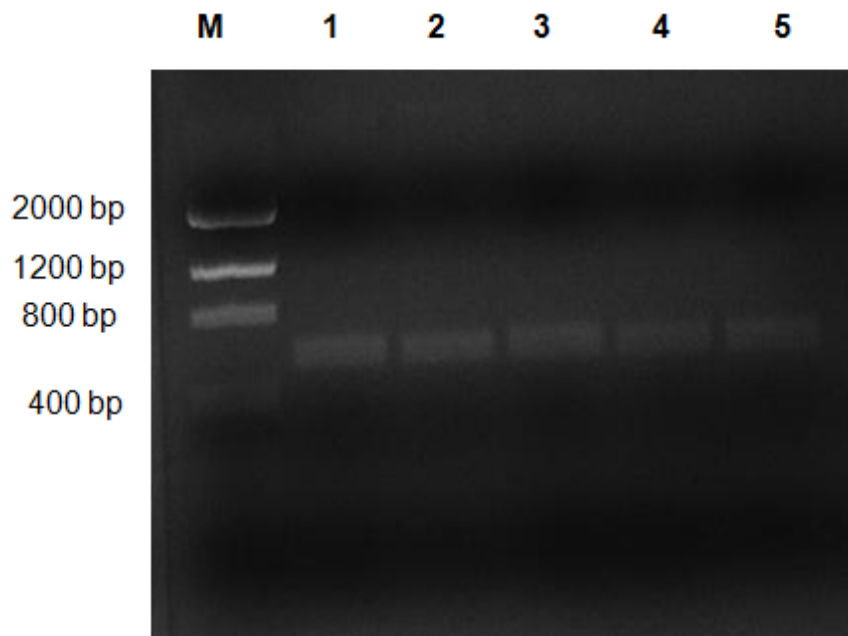


**Figura 4.26.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto da extração de DNA genômico bruto de cinco isolados de *Trichosporon* sp.

M: marcador (DNA Low Mass Ladder); 1: amostra 158 (*C.d.terrifica*); 2 amostra 564 (*B. jararaca*); 3: amostra 828 (*B. pauloensis*); 4: amostra 860 (*B. jararaca*); 5: amostra 1350 (*B. moojen*).

#### 4.4.3.2 Amplificação do DNA

O perfil eletroforético dos produtos da reação de amplificação revelou cinco bandas de aproximadamente 600pb (Figura 4.27).



**Figura 4.27.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do produto da amplificação do material genético das amostras de *Tichosporon* sp isolados em escamas de serpentes.

M: marcador (DNA Low Mass Ladder); 1: amostra 158 (*C.d.terrifica*); 2: amostra 564 (*B. jararaca*); 3: amostra 828 (*B. pauloensis*); 4: amostra 860 (*B. jararaca*); 5: amostra 1350 (*B. mojejni*).



#### 4.4.3.3 Seqüenciamento do DNA

Os iniciadores ITS4 e ITS5 foram eficientes para o seqüenciamento do gênero *Trichosporon*. Foram seqüenciadas em média 469 nucleotídios e obtida a identificação da espécie *Trichosporon asahii* para todos os isolados. A Tabela 4.13 mostram a homologia e o número de acesso no Gene Bank obtidos em cada amostra proveniente de escamas de serpentes.

**Tabela 4.13.** Identificação, espécie de serpente, número de acesso no Gene Bank e homologia dos cinco isolados seqüenciados.

Isolado	Serpente (RG)	Nº. Acesso Gene Bank	% Homologia
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Caudisona durissa terrifica</i> (158)	FJ94 3429.1	100%
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Bothropoides jararaca</i> (564)	FJ94 3429.1	99%
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Bothropoides pauloensis</i> (828)	FJ94 3429.1	100%
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Bothropoides jararaca</i> (860)	FJ94 3429.1	100%
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Bothrops moojeni</i> (1350)	FJ94 3429.1	100%

## 4.5 DISCUSSÃO

As doenças infecciosas são a maior causa imediata de morte de répteis em cativeiro<sup>9</sup>. Um estudo retrospectivo conduzido no Detroit Zoo (Estados Unidos) concluiu que dos 1300 óbitos ocorridos por um período de 10 anos, 36.6% foram causados por agentes microbianos<sup>61</sup>. Em um estudo semelhante realizado por Cowan no Philadelphia Zoo (Estados Unidos), a percentagem de óbitos entre os répteis chegou a 80%<sup>7</sup>.

A predominância de bactérias da família Enterobacteriaceae em isolados de répteis, é relatada em vários estudos realizados tanto com animais cativos<sup>14,38,62,63,64</sup>, quanto de vida livre<sup>35,65,66</sup>. Bactérias gram positivas e bacilos gram negativos não fermentadores, com exceção de *Pseudomonas* spp, são relatados com menor frequência e normalmente não são consideradas como patogênicas para as serpentes<sup>10</sup>.

A família Enterobacteriaceae, é formada por bastonetes gram-negativos móveis que fermentam e oxidam a glicose e não formam esporos<sup>51</sup>. Os micro organismos pertencentes a este grupo possuem uma grande heterogeneidade em relação a sua ecologia, seus hospedeiros e seu potencial patogênico<sup>51,67</sup>. São distribuídos mundialmente, podendo ser encontrados no trato intestinal de animais e humanos, contaminando a vegetação, o solo e a água<sup>67</sup>.

Nos répteis, as enterobactérias apesar de compor a flora normal desses animais<sup>68,69</sup>, são normalmente destacadas como agentes causadores de osteomielite<sup>70,71</sup>, sepsis<sup>72,73,74</sup>, estomatites<sup>19,75</sup>, gastroenterites<sup>11,10,76</sup> e infecções pulmonares<sup>11,75</sup>. Os principais micro organismos isolados em amostras provenientes de serpentes pertencem aos gêneros *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp<sup>20,23,37,38,77,78</sup>.

Os resultados obtidos nos estudos relacionados à investigação da microbiota ofídica são influenciados pelo tipo de amostra analisada<sup>17,63,79</sup>, metodologia aplicada<sup>80,81,82</sup>, espécies de serpentes<sup>33,36,80</sup>, condições nas quais as serpentes são mantidas (cativeiro ou vida livre)<sup>21,37</sup> e sanidade dos animais<sup>83</sup>.

Nesse estudo, o número de isolados bacterianos obtidos nas amostras de cavidade cloacal das serpentes foram inferiores aos encontrados por Bastos *et al*<sup>79</sup> para *Bothropoides jararaca* recém-capturadas e superiores aos obtidos por Ferreira-Junior *et al*<sup>37</sup> para *Caudisona durissa terrifica* mantidas tanto em cativeiro quanto recém-capturadas. Para amostras de escamas, os resultados obtidos nesse estudo corroboram os dados encontrados por Sheridan *et al*<sup>17</sup> em *Crotalus atrox* de vida livre e mantidas em cativeiro.

A carga bacteriana isolada nas amostras de cavidade oral e peçonha na presente investigação é semelhante à encontrada por Arroyo *et al*<sup>33</sup> para viperídeos costa-riquenhos mantidos em cativeiro e superiores aos resultados obtidos por Baylock<sup>63</sup> em amostras provenientes de serpentes africanas recém-capturadas, tanto peçonhentas quanto não peçonhentas. Alguns autores<sup>33,65,84</sup> destacam que em investigações onde a cavidade oral e a peçonha são analisadas separadamente, a carga bacteriana da cavidade oral é muito superior, fato também observado nesse estudo.

A identificação de agentes bacterianos em répteis tem focado principalmente micro organismos patogênicos da cavidade oral e cloacal de animais cativos e de vida livre<sup>63,66,79,83</sup>. Relatos sobre a microbiota bacteriana de escamas de serpentes são pouco comuns<sup>17,85</sup> e normalmente estão relacionados a doenças<sup>86</sup>.

No presente estudo, os micro organismos mais isolados em amostras de escamas foram Bacilos gram-negativos não fermentadores, *Enterobacter* sp e *Staphylococcus* coagulase negativa. Estes resultados diferem dos encontrados por Sheridan *et al*<sup>17</sup>, na qual foram isolados *Staphylococcus*

coagulase negativa, *Pseudomonas* spp e *Citrobacter freundii* das escamas de cascavéis norte-americanas cativas e de vida-livre.

Os Bacilos gram-negativos não fermentadores são micro organismos aeróbios estritos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados principalmente no solo e na água <sup>67,87</sup>. Geralmente saprofíticos, apresentam potencial patogênico em indivíduos imunodeprimidos <sup>88</sup>. Nos répteis, esses micro organismos fazem parte da microbiota normal <sup>21,89</sup>, mas há relatos de septicemia causada por *S. maltophilia* em crocodilianos <sup>90</sup> e estomatite ulcerativa em ofídios mantidos em cativeiro <sup>21</sup>.

As bactérias do gênero *Enterobacter* são encontradas na superfície do solo, plantas, água e colonizam superfícies de mucosas de mamíferos, sendo normalmente isoladas de indivíduos imunodeprimidos <sup>91,92</sup>. Apesar de não serem consideradas como flora normal de escamas de répteis, as bactérias desse gênero foram isoladas em quase todos os grupos de serpentes analisadas nesse estudo. Esse gênero é considerado oportunista e normalmente está associado a doenças em répteis <sup>10</sup>. Em quelônios cativos, há relatos de isolamento de *Enterobacter* em abscessos, dermatite ulcerativa e ulceração da carapaça <sup>66,93,94</sup>. Em crocodilianos foram considerados responsáveis por severas lesões de escamas <sup>11</sup>, e em serpentes, esses micro organismos estão associados a lesões orofaciais <sup>95</sup>.

Os *Staphylococcus* coagulase negativa são micro organismos normalmente encontrados na pele e membranas mucosas de humanos, e geralmente possuem um relacionamento benigno ou simbiótico com seu hospedeiro <sup>51,67</sup>. No entanto, adquirem potencial patogênico se penetrarem no tecido do hospedeiro por meio de trauma da barreira cutânea <sup>96</sup>. Em répteis, os *Staphylococcus* coagulase negativa também são considerados como flora normal das escamas e cavidade oral <sup>11,14</sup>. No entanto, há casos de estomatites e necroses de escamas em quelônios, mas sempre em associação com outras bactérias, principalmente gram-negativas <sup>10</sup>.

As escamas dos répteis, como a pele de outros animais, protegem estruturas internas de trauma, dissecação, invasão de bactérias, fungos, parasitas e temperaturas extremas, além de servir como alerta quando há problemas com o organismo <sup>86</sup>. Dessa maneira, o conhecimento da microbiota bacteriana das escamas dos répteis é necessário para que diagnósticos apropriados sejam estabelecidos em casos de enfermidades cutâneas <sup>17,86</sup>.

A microbiota gastrointestinal de répteis é geralmente composta de bactérias gram positivas e negativas, leveduras e protozoários <sup>97</sup>. Vários autores sugerem que os microorganismos geralmente considerados como flora normal do sistema digestório de répteis podem atuar como agentes etiológicos de doenças gastrointestinais <sup>79,97</sup>.

Os agentes bacterianos mais isolados da cavidade cloacal nesse estudo foram *Pseudomonas aeruginosa*, Bacilos gram negativos não fermentadores (excluindo *Pseudomonas* spp), *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* sp. Esses resultados diferem dos encontrados por Bastos *et al* <sup>79</sup>, onde os principais isolados de cloaca de jaracacas cativas foram *Salmonella* spp, *Citrobacter* sp e *Escherichia coli*, e concordam parcialmente com os achados de Ferreira-Junior *et al* <sup>37</sup>, na qual *Salmonella enterica* (IIIb), *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii* foram as principais bactérias isoladas em cascavéis recém-capturadas e mantidas em cativeiro.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são Bacilos gram negativos não fermentadores de maior importância médica, sendo a *P. aeruginosa* o microorganismo de maior destaque <sup>98</sup>. Esse agente pode ser encontrado no solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação, água e são muito frequentes em infecções hospitalares e infecções causadas por acidentes ofídicos <sup>99</sup>. Embora seja considerada como parte da flora normal da cavidade oral e trato intestinal dos répteis <sup>21,36</sup>, diversos relatos associam *P. aeruginosa* a gastroenterites em serpentes, lagartos, quelônios e crocodilianos <sup>76,97,100</sup>.

Os micro organismos pertencentes ao gênero *Citrobacter* são bacilos aeróbios gram negativos, normalmente encontrados na água, solo, alimentos e trato intestinal de animais e humanos<sup>101</sup>. Essa bactéria tem sido registrada como causadora de um amplo espectro de infecções em humanos, incluindo infecções do trato urinário, peritonites, endocardites, meningites e bacteremias<sup>102</sup>.

Nos répteis, esses micro organismos são relatados como microbiota cloacal normal<sup>103</sup>, mas foram relacionadas às infecções gastrointestinais em serpentes *Laticauda colubrina* mantidas em cativeiro<sup>73</sup>, conteúdo intestinal de necropsia de serpentes<sup>75</sup> e associados a diarreias em crocodilianos e serpentes<sup>104</sup>.

A espécie *E cloacae* é encontrada tanto em répteis sadios quanto doentes<sup>104</sup>. Normalmente é isolada em répteis mantidos em cativeiro como *pets* e pode estar associada a diarreias em crianças e infecções genito-urinárias em adultos<sup>10</sup>.

A microbiota da cavidade oral dos répteis é rica e apresenta micro organismos saprófitas e oportunistas<sup>36,66,105</sup>. Alguns autores consideram que a microbiota pertencente à cavidade oral das serpentes reflete a fibra fecal de suas presas<sup>84,106</sup>. Com relação às peçonhas ofídicas, Goldstein *et al*<sup>106</sup> sugerem que os micro organismos isolados nas peçonhas refletem a flora presente na cavidade oral desses animais, e alegam que a peçonha na realidade é um produto biológico estéril.

Dentre os micro organismos mais isolados na cavidade oral de serpentes desse estudo, destacam-se a bactéria *Morganella morganii* e novamente o bacilo gram-negativo não fermentador *Pseudomonas aeruginosa*. Estes resultados concordam parcialmente com os descritos por Ferreira-Junior *et al*<sup>37</sup>, na qual os principais isolados foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris* e os relatados por Mavridis *et al*<sup>75</sup>, na qual os principais

isolados da mucosa oral de *B. jararaca* foram *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp e *Aeromonas* sp.

Os resultados descritos nesse estudo indicaram que as amostras de peçonhas dos viperídeos analisados apresentam microbiota aeróbica abundante, constituída principalmente de Enterobacteriaceae, com destaque para *Morganella morganii* e *Providencia rettgeri*. Estes resultados diferem dos encontrados por Theakston *et al*<sup>75</sup> para *Calloselasma rhodostoma*.

Os acidentes ofídicos freqüentemente causam infecções bacterianas severas que requerem antibioticoterapia<sup>107</sup>. Os micro organismos causadores dessas infecções podem ser provenientes da microbiota natural da pele do acidentado, do ambiente, da mucosa oral, presas ou peçonha das serpentes<sup>108,109</sup>. Cultura das presas, bainhas das presas e peçonha de ofídios dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Naja* têm mostrado similaridade com os isolados de abscessos de pacientes acidentados<sup>80,107,110,111</sup>.

A enterobactéria *Morganella morganii* é amplamente encontrada no ambiente, no trato intestinal do homem e outros mamíferos, e como parte da flora normal da cavidade oral das serpentes<sup>107,108,110</sup>.

A *Morganella morganii* é freqüentemente identificada como um importante patógeno associado aos acidentes ofídicos, sendo isolado com freqüência em abscessos e áreas necróticas encontradas no local da picada<sup>110,112,113</sup>. Alguns autores sugerem que esse agente pode ser inoculado no momento do acidente ou infectar secundariamente o tecido necrosado pela peçonha<sup>107,113</sup>.

Em répteis, apesar de considerada como microbiota normal, há relatos de isolamentos de *M. morganii* em serpentes e crocodilianos com pneumonia<sup>14,114</sup> e estomatites ulcerativas<sup>104</sup>.

De maneira similar a *M. morganii*, a bactéria *P. aeruginosa* apesar de ser isolada na cavidade oral de serpentes sadias<sup>115,116</sup>, é amplamente associada a estomatites ulcerativas<sup>117-120</sup>.

Em humanos, os membros do gênero *Providencia* podem causar infecção do trato urinário, principalmente em pacientes imunodeprimidos<sup>91</sup>. Apesar de serem considerados como flora normal da cavidade oral de serpentes e outros répteis<sup>10</sup>, são agentes oportunistas causadores de inúmeras infecções, incluindo estomatites em serpentes<sup>65,106,116</sup>.

A estomatite ulcerativa infecciosa é uma infecção bacteriana relativamente comum em serpentes cativas<sup>121,122</sup>. Ocorre principalmente em animais depauperados, em consequência de condições adversas, proporcionadas pela vida em cativeiro<sup>123</sup>. Os ofídios utilizados nas extrações rotineiras de veneno constituem um grupo de destaque na predisposição ao desenvolvimento desta doença<sup>118,120</sup>, em virtude do manejo constante e sucessivos traumas na mucosa oral<sup>75</sup>.

Além da estomatite ulcerativa, problemas respiratórios como a pneumonia tem sido responsáveis por um grande número de óbitos registrados em grandes coleções de répteis<sup>20,124,125</sup>. O desequilíbrio de fatores microclimáticos do cativeiro, como aquecimento insuficiente e grau de umidade relativa incorreta contribuem para o desenvolvimento da doença<sup>126</sup>.

As informações baseadas na composição da microbiota presente nas peçonhas, associada à cavidade oral desses animais apresentam grande relevância não só na clínica dos acidentes<sup>80,84,110,127</sup>, mas também no efeito dessas bactérias como agentes causadoras de infecções em ofídios utilizados como matrizes produtoras de matéria-prima para fármacos e imunobiológicos<sup>118,120,38</sup>.

Os agentes microbianos pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Serratia* apesar da baixa frequência de



isolamento nesse estudo, são considerados oportunistas e apresentam grande relevância na clínica de répteis <sup>10,11,128</sup>.

A maioria das cepas de *Escherichia coli* vive simbioticamente no trato gastrointestinal do homem e outros animais <sup>51,67</sup>. Entretanto, algumas linhagens apresentam alta virulência, podendo causar uma variedade de doenças em animais, incluindo disenteria, síndrome da uremia hemorrágica, infecções de rins, septicemia, pneumonia e meningites <sup>67</sup>.

No presente estudo, *E. coli* foi isolada em amostras de cavidade oral, cloacal e escamas. A baixa frequência de isolamento de *E. coli* em répteis nesse estudo reflete a baixa incidência dessa bactéria em animais ectotermos <sup>129</sup>. Embora possa ser considerada como microbiota normal da cavidade oral de animais saudáveis mantidos em cativeiro, há relatos de isolamentos de *E. coli* de infecções respiratórias em serpentes <sup>103,128</sup>.

O gênero *Klebsiella* é frequentemente isolado de materiais biológicos humanos, sendo encontrado com frequência nas fezes e nasofaringe <sup>130</sup>. A espécie *K. pneumoniae* é considerada de maior importância devido ao grande número de infecções nosocomiais atribuídas a esse agente <sup>130</sup>.

Na presente investigação, *K. oxytoca* foi isolada em amostras de peçonha, escamas, cavidade oral e cloaca. *K. pneumoniae* foi isolada somente em cavidade cloacal e escamas. As espécies de bactérias do gênero *Klebsiella* apesar de serem consideradas por alguns autores <sup>10,33,67</sup> como microbiota normal de répteis, têm sido associadas a várias infecções nesse grupo de vertebrados, incluindo osteomielites <sup>131</sup> pneumonia <sup>73,127</sup> e gastroenterites <sup>97</sup>. A maioria das cepas causadoras de infecções, assim como em humanos, estão associadas a *K. pneumoniae* <sup>51,130</sup>.

O gênero *Proteus* é considerado microbiota intestinal de animais e humanos <sup>130</sup>. A espécie *Proteus mirabilis* tem sido implicada em uma

variedade de infecções em animais domésticos (cães e gatos) e de produção (aves, ovinos, bovinos) <sup>51</sup>.

Nesse estudo, o gênero *Proteus* foi encontrado na peçonha, cavidade oral, cloacal e escamas de serpentes. Nesses animais, as espécies do gênero *Proteus* também são consideradas como microbiota normal da cavidade oral <sup>21</sup>, peçonha <sup>33</sup> e cavidade cloacal <sup>132</sup>, mas normalmente são associadas a estomatites <sup>62,117</sup> infecções respiratórias <sup>35,128</sup> e lesões de escamas <sup>85</sup>.

O gênero *Salmonella* ocorre freqüentemente no trato intestinal de diversos vertebrados e sua excreção resulta em contaminação do ambiente, água e alimentos <sup>133,134</sup>. Diversos sorotipos pertencentes à espécie *Salmonella enterica* são identificados como principais agentes causadores de gastroenterite em humanos <sup>133</sup>. Além da gastroenterite, diversos sorotipos são associados à septicemia, bacteremias e febre tifóide <sup>130,135</sup>.

A salmonelose é considerada como um grave problema de saúde pública, e afeta milhões de pessoas em todo o mundo <sup>136</sup>. O número de casos de salmoneloses em humanos provenientes de répteis tem aumentado nos últimos 20 anos <sup>135,137,138,139</sup> e estima-se que de 5 a 11% de todos os casos de salmonelose humana que ocorrem na América do Norte são associados ao contato direto ou indireto com “pets exóticos” <sup>138,139</sup>, ocorrendo registro de óbitos <sup>140</sup>.

Na presente investigação, *Salmonella* sp foi isolada em amostras de peçonha, veneno, cavidade oral e cloacal. A baixa freqüência de isolados pode ser explicada pela eliminação intermitente desse microorganismo pelos répteis <sup>142,143</sup> e pelo tipo de metodologia utilizada <sup>144</sup>.

Pfleger *et al* <sup>145</sup>, em um estudo realizado por um período de três anos sobre o padrão de excreção do gênero *Salmonella* em anfíbios e répteis, constataram diferenças na distribuição desse agente entre os animais analisados. Foram observados episódios de apenas um isolamento, excreção

intermitente em períodos de tempo curto e prolongado, e não foi verificada excreção permanente de *Salmonella*. Resultados semelhantes foram encontrados por Goopee *et al*<sup>129</sup> em um estudo realizado em animais mantidos em zoológico.

As condições nas quais as amostras são transportadas, e a utilização dos meios de cultivo podem afetar drasticamente a recuperação de *Salmonella* nas amostras<sup>142-144</sup>. Para um eficiente isolamento de estipes do gênero *Salmonella*, é recomendado o uso de água peptonada tamponada como meio de transporte, caldos de pré-enriquecimento como o Tetrionato<sup>144</sup>, RV (Rappaport-Vassiliadis)<sup>143</sup> ou Selenito-cistina<sup>143,144</sup> e meios de cultura seletivos, como o XLT4 (Xilose-Tergitol 4)<sup>144</sup>, Ágar verde-brilhante<sup>141</sup>, SS (*Salmonella-Shigella*)<sup>144</sup>, Ágar HE (Entérico Hektoen)<sup>141,144</sup>, Rambach<sup>133</sup> e XLD (Xilose Lisina Desoxilato)<sup>129,133,145</sup>. Alguns autores recomendam a associação de diversos caldos de pré-enriquecimento e diferentes meios de cultura para recuperação segura desse agente<sup>144-146</sup>.

Embora seja considerada como microbiota normal de répteis, esse agente tem sido associado a inúmeras enfermidades nesses animais como pneumonias<sup>10,11,14</sup>, gastroenterites<sup>76,97</sup>, lesões cutâneas<sup>146,147</sup>, ostemiolites<sup>148</sup>, estomatites<sup>97</sup> e sepse<sup>73</sup>.

Os membros do gênero *Serratia* são enterobactérias encontradas na água e no solo<sup>51,130</sup>. A grande maioria das infecções respiratórias, urinárias e bacteremias causadas por esse gênero em humanos pertence à espécie *S. marcescens*<sup>130</sup>.

O gênero *Serratia* faz parte da microbiota de escamas, cavidade oral e cloacal de diversos répteis<sup>10,17,149</sup> e já foram isolados da cavidade oral e peçonha de serpentes saudáveis<sup>115</sup>. Nesse estudo, ocorreu isolamento de *S. marcescens* somente em amostras da cavidade oral. Como a grande maioria das bactérias descritas nesse estudo, o gênero é considerado como oportunista, sendo frequentemente isolado em lesões cutâneas presentes em

quelônios<sup>66</sup> e crocodilianos<sup>155</sup>. Em serpentes, são raramente associadas à pneumonia<sup>11</sup>.

Diversos estudos relacionados à microbiota de serpentes em cativeiro têm identificado a bactéria *Aeromonas hydrophila* em amostras de cavidade oral e cloacal<sup>18,106,118</sup>. A ausência de *Aeromonas hydrophila* nas amostras obtidas nesse estudo confirma o status desse micro organismo como agente de estomatite necrosante em ofídios mantidos em cativeiro utilizados para produção de peçonha<sup>118</sup>. Essa ausência também foi observada por outros autores em ofídios recém-capturados<sup>36,116,150</sup>.

Diversas doenças infecciosas que acometem répteis mantidos em cativeiro podem ser tratadas se diagnosticadas a tempo<sup>104</sup>. Normalmente essas enfermidades aparecem após imunossupressão associada ao estresse do ambiente cativo<sup>151-154</sup>.

Estudos sobre o estresse crônico em répteis demonstraram que ocorre elevação nos níveis de corticosterona sérico, podendo acarretar falência reprodutiva, supressão imunológica e uma redução ou ausência no crescimento<sup>155</sup>. Portanto, em indivíduos cronicamente estressados o risco de desenvolvimento de doenças aumenta<sup>153</sup>.

Em grandes coleções de serpentes, as maiorias das doenças que acometem estes animais estão relacionadas ao manejo inadequado<sup>156</sup>. Diversos autores alegam que agentes estressantes constantes como temperatura e umidade impróprias, superpopulação, péssimas condições de higiene e manipulação constante são os principais fatores catalisadores de doenças nessas coleções<sup>153, 156-159</sup>.

Os achados bacteriológicos do presente estudo não apresentaram diferença quanto à espécie de serpente analisada, situação também observada por outros autores<sup>33</sup>.

A diferença entre a frequência de bactérias encontradas em serpentes recém-capturadas e mantidas em cativeiro corrobora os dados encontrados por Theakston *et al*<sup>65</sup> para viperídeos tailandeses, e diferem dos achados encontrados por Arroyo *et al*<sup>33</sup> para viperídeos costa-riquenhos. Baylock<sup>63</sup> sugere que a discrepância dos achados entre flora de serpentes cativas e recém-capturadas está relacionada à carga bacteriana do ambiente e à habilidade que as serpentes possuem de limpar a cavidade oral.

Em relação ao número de bactérias isolado em cada grupo de estudo, foi observado que houve similaridade entre os grupos pertencentes ao mesmo regime de cativeiro utilizado. Portanto, a diferença encontrada no total de bactérias entre os sistemas de cativeiro adotados pelo CEVAP sugere que o tipo de manejo interfere na quantidade de bactérias presentes no ambiente, fato também observado por outros autores<sup>37,38,63</sup>.

No manejo semi-extensivo, as serpentes ficam em baias que possuem grama, aquecedores externos e água corrente. Nesse sistema as serpentes têm acesso a espaços amplos, ventilação, luz solar, e os animais podem explorar vários gradientes de temperatura. A manutenção desse ambiente é realizada em intervalos de tempo prolongados, e são adotados eficientes métodos de desinfecção como o vazio sanitário e a vassoura de fogo. Apesar do manejo semi-extensivo ser pouco utilizado entre os principais centros produtores de peçonha do Brasil<sup>1,158</sup>, alguns autores consideram esse sistema apropriado para o manejo de monoculturas de serpentes<sup>1,160</sup>.

No manejo intensivo, as serpentes são mantidas em caixas de polipropileno e acondicionadas em estantes. Apesar de permitir a rápida visualização do animal, a temperatura interna da caixa é permanentemente constante, a ventilação é inadequada e as serpentes ficam em contato com suas próprias fezes e fezes de suas presas. A manutenção dessas caixas é realizada frequentemente para proporcionar um ambiente adequado para o animal. Embora seja o sistema mais utilizado em grandes centros como o Instituto Butantan<sup>47,158</sup> e o Instituto Vital Brazil<sup>1</sup>, esse regime apresenta

inúmeros agentes estressantes que podem proporcionar supressão imunológica nas serpentes <sup>155,159</sup>.

Vale lembrar que o isolamento de potencial patógenos nas amostras das serpentes estudadas não é sinônimo de doença <sup>10,104</sup>. O uso da microbiologia como uma ferramenta para avaliar as condições proporcionadas por cada regime de cativeiro adotado foi extremamente importante no processo de avaliação do manejo utilizado, considerando as numerosas condições estressantes proporcionadas pelo ambiente do cativeiro e o caráter oportunista dos agentes isolados.

Com base nos resultados apresentados, podemos sugerir que a quantidade de bactérias isoladas está relacionada ao tipo de cativeiro utilizado e não à espécie de serpente analisada. Além disso, os resultados indicam que apesar de o sistema intensivo ser o método tradicionalmente utilizado na manutenção de ofídios destinados a produção de peçonha, o sistema semi-extensivo pode ser mais apropriado para este fim.

O tratamento das infecções causadas por agentes bacterianos é realizado com uso de antimicrobianos específicos <sup>161</sup>. Além do uso na clínica de répteis, os antimicrobianos são utilizados no tratamento de acidentes ofídicos que causam complicações locais como abscessos, celulite, erisipela e necrose <sup>162</sup>.

A resistência antimicrobiana é um grave problema enfrentado pela medicina humana e veterinária <sup>163,164</sup>. Um fator que contribuiu para o desenvolvimento dessa resistência foi o uso indevido de antibióticos em diversos setores, entre eles, a medicina humana, veterinária, pecuária, agricultura e aquicultura <sup>139,163,165</sup>. O uso inadequado de antimicrobianos tem proporcionado a seleção de bactérias resistentes a diversos tipos de antibióticos, causando falhas nos tratamentos e impondo limitações na escolha de drogas para terapia <sup>165,166</sup>.

A resistência a antibióticos já foi encontrada em animais considerados exóticos<sup>142,167</sup>. Headrick *et al*<sup>167</sup> relatou resistência a estreptomicina, tetraciclina e ao ácido nalidixico em cepas de *Salmonella* isoladas de serpentes e resistência a ampicilina, kanamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina e ácido nalidixico em *Salmonella* isoladas de lagartos<sup>142,167</sup>. Apesar do percentual de resistência adquirida de cepas isoladas em répteis ser considerado baixo, o aumento da popularidade de répteis como *pets* pode contribuir para esse aumento<sup>168</sup>.

Nesse estudo, os antimicrobianos mais eficientes foram os aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina) e as quinolonas (norfloxacina e enrofloxacina). Esses achados diferem de Foti *et al*<sup>169</sup> e corroboram os encontrados por Ferreira *et al*<sup>37</sup>.

Os aminoglicosídeos são bactericidas efetivos sobre bactérias gram-negativas aeróbias, alguns *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*<sup>130</sup>. Os aminoglicosídeos são considerados a melhor opção para sepse causada por gram-negativos e são geralmente indicados para casos de infecções em répteis incluindo *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, *Salmonella* sp e *Serratia* sp<sup>170</sup>. Nesse estudo, todos os micro organismos mostraram alta sensibilidade a esse grupo de antimicrobianos.

As fluorquinolonas como a enrofloxacina e a norfloxacina são bactericidas e apresentam alta atividade antibacteriana em baixas concentrações, quando comparadas a outras classes de agentes antimicrobianos<sup>85</sup>.

A enrofloxacina é amplamente usada na medicina de répteis, pois é ativa contra a maioria dos gram-negativos e gram-positivos que normalmente causam doenças nesses animais<sup>85,171</sup>. As fluorquinolonas são normalmente indicadas no tratamento de bactérias gram-negativas, especialmente

*Pseudomonas*<sup>67</sup>. Todos os agentes microbianos analisados apresentaram alta sensibilidade às fluorquinolonas.

As cefalosporinas são uma importante classe de antibióticos de amplo espectro usada em medicina veterinária e humana, e geralmente são representadas por quatro classes de gerações<sup>171</sup>. Na medicina veterinária, as classes de um a três são rotineiramente utilizadas, sendo a classe quatro usada com frequência na medicina humana<sup>170</sup>.

Nesse estudo, a cefalosporina de terceira geração utilizada (ceftiofur), apesar de ser recomendada em infecções causadas por gram-negativos<sup>170</sup>, não foi efetiva sobre *Enterobacter* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Segundo Pare *et al*<sup>171</sup>, o uso contínuo dessas cefalosporinas na medicina veterinária tem contribuído para o aumento de resistência.

O cloranfenicol é um antimicrobiano bactericida e bacteriostático de amplo espectro. É recomendado no tratamento de infecções causadas por micro organismos gram-negativos e gram-positivos, tanto aeróbios quanto anaeróbios<sup>51,67</sup>.

Na presente investigação, o cloranfenicol não foi eficaz sobre *Citrobacter* sp, *Enterobacter* sp e *P. aeruginosa*. Há registros do uso de cloranfenicol associado com ampicilina para eliminar *Salmonella* em lagartos e quelônios, mas a prática é considerada inadequada, pois os animais podem ser carreadores latentes e não eliminar a bactéria ativamente<sup>79,143</sup>. Além disso, pode ocorrer seleção de linhagens resistentes de *Salmonella*<sup>171</sup>.

A tigeciclina é um antimicrobiano derivado das tetraciclinas<sup>172</sup> utilizado em medicina humana<sup>67,130</sup>. Tem amplo espectro de atividade contra enterococcus resistentes a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina e bacilos gram-negativos aeróbios e anaeróbios multirresistentes<sup>173,174</sup>.



A FDA (Food and Drug Administration) <sup>175</sup> aprovou o uso da tigeciclina para o tratamento de adultos com severas infecções de pele e tecidos moles, bem como para infecções intra-abdominais, tanto hospitalares quanto adquiridas na comunidade <sup>173,176</sup>. Seu uso tem sido indicado principalmente nas infecções causadas por micro organismos multirresistentes confirmados <sup>176</sup>.

Infecções de tecidos moles pode ser uma importante complicação no acidente por serpentes peçonhentas com envenenamento local <sup>162</sup>. O tratamento dessas infecções tem sido baseado no isolamento bacteriano do material drenado do abscesso presente no local da picada <sup>177,178</sup>.

Nesse estudo, a tigeciclina foi eficiente sobre a grande maioria dos micro organismos analisados, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*. A baixa atividade “in vitro” sobre esse agente já foi observada por outros autores <sup>172,174,176</sup>.

A polimixina B é um antimicrobiano do grupo dos polipeptídeos e apresenta ação bactericida sobre quase todos os bacilos gram-negativos <sup>130</sup>. Nesse estudo, a polimixina B apresentou baixa atividade sobre a *P. rettgeri* e *M. morgani*. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Bastos *et al* para bactérias isoladas de amostras de cloaca de *B. jararaca* <sup>79</sup> e Coutinho *et al* <sup>179</sup> para bactérias isoladas de abscessos de escamas e órgãos de *Helicops modestus*.

A associação de sulfametoxazol/trimetoprim é uma combinação quimioterápica de importante ação bacteriana <sup>67,130</sup>. Possui atividade de amplo espectro contra gram-positivos e gram-negativos aeróbios <sup>51</sup>, mas com baixa efetividade para *Pseudomonas* spp.

A associação destes dois antibióticos é rotineiramente usada na clínica de répteis, mas alguns autores não recomendam o uso em quelônios ou serpentes de áreas desérticas, pois normalmente causam diarreia logo após a administração <sup>170</sup>.

Nessa investigação, como esperado, a sulfa potencializada apresentou baixa efetividade para *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados concordam com os apresentados por Ferreira *et al*<sup>37</sup> para amostras de cavidade oral e cloacal de *C. d. terrifica* e Foti *et al*<sup>169</sup> para amostras de cavidade oral e cloacal de *Caretta caretta*.

As penicilinas semi-sintéticas como a ampicilina e amoxicilina são antimicrobianos de espectro moderado que possuem atividade sobre bactérias gram-negativas<sup>51</sup>.

Apesar de serem recomendadas para o uso na medicina de répteis, nesse estudo foi observado alta resistência bacteriana, principalmente para *P. aeruginosa*, *Koxytoca*, *M. morganii* e *S. marcenses*. Estes achados corroboram os encontrados por Arroyo *et al*<sup>33</sup> para amostras de mucosa oral e peçonha de *Bothrops asper*, *Lachesis muta* e *Crotalus durissus*.

Os isolados bacterianos examinados nesse estudo mostraram baixa resistência a diversos antimicrobianos testados. Isso permite o uso desses antibióticos com segurança em processos infecciosos e aumentam as chances de sucesso no tratamento de doenças que afligem estas serpentes<sup>73</sup>. Adicionalmente o conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos de isolados de répteis é de extrema importância para o tratamento de acidentes ofídicos e zoonoses causadas por esses animais<sup>11,107,170</sup>.

Além das doenças bacterianas, as enfermidades causadas por fungos têm sido relatadas em todas as ordens e subordens de Reptilia, com exceção da ordem Rhynchocephala (tuataras)<sup>180</sup>. Tanto leveduras quanto fungos filamentosos têm sido incriminados em micoses cutâneas e sistêmicas em répteis<sup>40</sup>.

A infecção por fungos em répteis é considerada por muitos autores como oportunista, pois são causadas por agentes saprófitas que invadem o organismo sobre determinadas circunstâncias favoráveis<sup>180,181</sup>. Normalmente

esses fungos são considerados como causadores de infecções secundárias correlacionadas com alguma forma de imunossupressão, normalmente associada ao manejo inadequado, lesões, má nutrição ou debilidade por outras doenças<sup>40,157</sup>.

Em ofídios mantidos em cativeiro, as doenças cutâneas estão entre as principais enfermidades causadas por fungos<sup>27,43,182,183</sup>. Um estudo realizado por Pare *et al*<sup>41</sup> sobre a microbiota fúngica em escamas de Squamatas saudáveis mostrou que há mais de 50 diferentes gêneros de fungos que podem ser encontrados nas escamas de squamatas saudáveis, e normalmente, os fungos oportunistas incluem as leveduras dos gêneros *Candida*, *Geotrichum* e *Trichosporon*. Um organismo que tem sido descrito como patógeno primário e é raramente isolado da flora normal da pele é o CANV (*Chryso sporium anamorph Nannizzopsis vriesii*)<sup>184</sup>. O CANV atualmente é descrito como o maior causador de micoses hialinas em répteis, proporcionando dúvidas na autenticidade de relatos de micoses causadas por *Trichophyton*, *Geotrichum*, *Chryso sporium*, *Malbranchea*, e alguns relatos de *Trichosporon*, devido a características morfológicas semelhantes<sup>10,180</sup>.

Um número progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas às espécies de leveduras tem sido descrito em répteis<sup>39,40,180</sup> e envolvem isolamentos de *Candida* spp em quelônios<sup>30,31</sup>, *Geotrichum* spp em serpentes<sup>27,43</sup>, CANV (*Chryso sporium anamorph Nannizzopsis vriesii*) em crocodilianos<sup>185</sup> lagartos<sup>184,186</sup> e serpentes<sup>27,187,188</sup> e *Trichosporon*, *Trycophyton* e *Chryso sporium ophioidicola* em serpentes<sup>25,189,190</sup>. O diagnóstico normalmente é confirmado por meio de técnicas histopatológicas aliadas à obtenção de culturas<sup>189,190</sup>.

De acordo com Flamant *et al*<sup>191</sup>, como os répteis são animais pecilotérmicos, a temperatura corporal não tem papel determinante na flora fúngica externa e interna desses animais. Alguns autores sugerem que as diferenças na prevalência destes agentes podem ser atribuídas a diferentes

métodos amostrais, protocolos de estudo, espécies e número de animais examinados, e localização geográfica<sup>41,42</sup>.

O baixo número de isolados micológicos obtido no presente estudo também foi observado por Kotska *et al*<sup>39</sup>, na qual relataram que espécies herbívoras pertencentes às famílias Testudinidae (quelônios terrestres) e Iguanidae (lagartos) apresentaram maior número de isolados leveduriformes do que qualquer réptil carnívoro pertencente às famílias Boidae ou Emydidae (serpentes). Estes resultados também foram observados por Nardoni *et al*<sup>42</sup> em amostras de cavidade cloacal de répteis mantidos como *pets*. Provavelmente o tipo de ambiente e os componentes da dieta utilizados por esses diferentes répteis influenciam na microbiota fúngica desses animais<sup>39,42</sup>.

A técnica padrão para identificação de espécies de leveduras é baseada em características fenotípicas, incluindo assimilação de 50 compostos de carbono e 10 compostos com nitrogênio<sup>192</sup>. A maior dificuldade para se obter uma identificação adequada em determinadas leveduras está no fato de diferentes cepas dentro de uma espécie responderem diferentemente a muitos dos testes<sup>192</sup>. Conseqüentemente, estas podem ser identificadas erroneamente, e a existência de espécies geneticamente distintas pode ser omitida<sup>193</sup>. Esta dificuldade pode ser resolvida atualmente por técnicas moleculares, envolvendo o seqüenciamento do DNA, técnica adotada por esse estudo para a identificação das leveduras isoladas em escamas de serpentes<sup>192</sup>.

As leveduras do gênero *Trichosporon* habitam nichos ecológicos naturais diversificados, podendo ser encontrados tanto no meio ambiente, como na superfície corpórea de seres humanos e animais<sup>195</sup>.

As espécies de *Trichosporon* são tratadas como leveduras e a caracterização do gênero é baseada nas estruturas das hifas, pseudo-hifas, blastoconídios e atroconídios com características variáveis, dependendo da espécie<sup>195,196</sup>.

O gênero foi submetido a uma extensa revisão que resultou na invalidação da espécie *Trichosporon beigeli*, sendo assumida por novas espécies<sup>192,195</sup>. Atualmente esse gênero inclui 25 espécies de leveduras, sendo oito relacionadas a infecções ou doenças alérgicas em humanos<sup>197</sup>. *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* estão envolvidas em infecções profundas e superficiais. Doenças alérgicas e pneumonias são associadas às espécies *T. asahii*, *T. domesticum*, *T. montevideens* e *T. mucoides*<sup>197,198</sup>.

As espécies de *Trichosporon* podem causar fungemia e infecção disseminada semelhantes àquelas produzidas por *Candida* spp. Causa comum de piedra branca, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, as espécies de *Trichosporon* podem ser agentes de infecções graves e fatais em pacientes transplantados ou com leucemia<sup>194,196,197</sup>.

Nos répteis, as espécies de *Trichosporon* são normalmente isoladas em escamas e cavidade cloacal de animais saudáveis<sup>41,42</sup>, sendo as espécies *Trichosporon beigeli* e *Trichosporon asahii* normalmente mencionadas<sup>198</sup>. No entanto, tricosporonosis tem sido relatada como infecção oportunista em cavidade oral e carapaça de quelônios<sup>199</sup>, lesões da mucosa oral e escamas em crocodilianos<sup>200</sup>, dermatites severas em lagartos<sup>201,202</sup> e doenças sistêmicas em serpentes<sup>25,200</sup>.

Nesse estudo, os isolados identificados como *T. asahii* foram provenientes de serpentes com lesões sugestivas de micose e animais saudáveis mantidos em cativeiro intensivo. Em estudo sobre a investigação da microbiota fúngica em quelônios, lagartos e serpentes saudáveis provenientes de diferentes instituições, observou-se que animais da mesma instituição apresentavam os mesmos resultados, sugerindo que o uso dos mesmos tipos de substratos e caixas para acondicionamento dos animais, além do uso de instrumentos de manipulação e coleta, pode atuar como fonte de contaminação para esses animais<sup>42</sup>.

Dermatites causadas por fungos são normalmente encontradas em serpentes mantidas em ambientes úmidos com ventilação pobre<sup>170</sup>. No cativeiro intensivo do CEVAP, os animais não têm acesso ao sol ou ventilação, além da temperatura da caixa ser constante. Como os resultados sugerem que o *Trichosporon asahii* pode participar da microbiota normal das escamas das serpentes analisadas, as condições proporcionadas pelo cativeiro intensivo podem causar imunossupressão nos animais e conseqüentemente a atuação desse fungo considerado como oportunista<sup>203</sup>.

A investigação da microbiota bacteriana e fúngica das serpentes mantidas em cativeiro são indispensáveis para que medidas apropriadas de manejo sejam estabelecidas com o intuito de diminuir a incidência dessas infecções nesses animais. Dessa maneira, as melhorias estabelecidas permitem a manutenção de um plantel sadio e com constante produção de matéria-prima.

#### 4.6 REFERÊNCIAS\*

1. Melgarejo-Gimenez AR. Criação e manejo de serpentes. In: Andrade A, Pinto SR, Oliveira RS, editores. Animais de laboratório - criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p.175-200.
2. Belluomini HE, Saliba AM, Abe AS. Inquérito anátomo patológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*. Mem Inst Butantan. 1976/77; 40/4:123-8.
3. Vieira EGJ, Rolim-Rosa R, Iizuka H, Furtado MFD, Fernandes W. Influências sazonal do processo de extração sobre a produção, toxicidade do veneno e sobrevivência de *Bothrops jararaca* (Wied 1824). Mem Inst Butantan. 1988; 50(1):29-35.
4. Rameh-de-Albuquerque LC. Aspectos hematológicos, bioquímicos, morfológicos e citoquímicos de células sanguíneas em viperídeos neotropicais dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidos em cativeiro [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007.
5. Costa ACOR, Almeida-Santos SM, Germano JV, Oliveira L, Scattozoni RR, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I. A longevidade dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Publ Avul Inst Pau Brasil. 2005; 8:63-9.
6. Leinz FF, Janeiro-Cinquini TRF, Ishizuka MM, Lang LV. Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) mantidas em cativeiro. Mem Inst Butantan. 1989; 51(Suppl 1):33-8.
7. Cowan DF. Diseases of captive reptiles. J American Vet Med Assoc. 1968; 153: 848-59.
8. Serapicos EO, Casagrande RA, Matushima ER, Merusse JLB. Alterações macro e microscópicas observadas em serpentes *Micrurus corallinus* mantidas em biotério (Reptilia – Ophidia – Elapidae). Rev Port Cienc Vet. 2005; 100(554):71-4.
9. Marcus LC. Infectious diseases of reptiles. J Am Vet Med Assoc. 1971; 159:1626-31.
10. Rosenthal LM, Mader DR. Microbiology. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Saunders Co.; 2006. p.217-38.
11. Jacobson ER. Infectious diseases of reptiles. In: Infectious diseases and pathology of reptiles. Color atlas and text. Florida: CRC Press; 2007. p.461-526.
12. Furtado MFD, Colletto GMDD, Dias da Silva W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos e de algumas espécies dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. Mem Inst Butantan. 1991; 53(Suppl 2):149-59.

---

\* Segundo normas de Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

13. Junge RE, Miller RE. Reptile respiratory diseases. In: Kirk RW, Bonagura JD, editors. Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p.210-3.
14. Hilf M, Wagner RA, Yu VLA. A prospective study of upper airway flora in healthy boid snakes and snakes with pneumonia. J Zoo Wildl Med. 1990;21: 318-25.
15. Gray CW, Davis J, McCarten WG. Treatment of *Pseudomonas* infections in the snake and lizard collection at Washington Zoo. Int Zoo Yearb. 1966;6:278.
16. Esterabadi AH, Entessas F, Khan MA. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from an outbreak of hemorrhagic septicemia in snakes. Can J Comp Med. 1973;37(Suppl 4):418-20.
17. Sheridan BS, Wilson GR, Weldon PJ. Aerobic bacteria from the skin of the rattlesnake *Crotalus atrox*. J Herpetol. 1989;23(Suppl 2):200-2.
18. Zwart P. Infectious diseases of reptiles. In: Fowler ME, editor. Zoo and wildlife medicine. Philadelphia: Saunders; 1991. p. 155-62.
19. Calixto S, Baldassi L, Moulin AAP, Hipdito M. *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abscesso em serpente (*Bothrops neuwiedi*). Rev Microbiol. 1986;17(Suppl 1):28-30.
20. Aleksandrov M, Petkov A. A case of *Pseudomonas aeruginosa* infection in tropical snakes. Vet Med Nauki. 1985;22(Suppl 7):53-61.
21. Drapper CS, Walker RD, Lawler HE. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. J Am Vet Med Assoc. 1981;179:1223-6.
22. Cooper JE. Veterinary aspects of recently captured snakes. British J Herpetol. 1973;5(1):368-74.
23. Bemis PA, Grupka LM, Sumalee L, Folland DW, Sykes IV JM, Ramsay EC. Clonal relatedness of *Salmonella* isolates associated infections in captive and wild caught rattlesnakes. Vet Microbiol. 2007;120: 300-7.
24. Corrente M, Madro A, Friedrich KG, Greco G, Desario C, Tagliaube S, et al. Isolation of *Salmonella* strains from reptiles faeces and comparison of different culture media. J Appl Microbiol. 2004;96:709-15.
25. Reddadiff GL, Cunningham M, Hartley WJ. Systemic infection with a yeast-like organism in captive banded rock rattlesnakes (*Crotalus lepidus klauberi*). J Wildl Dis. 1993;29(1):145-9.
26. Vissienon T, Schuppel KF, Ullrich E, Kujpers AFA. Case report. A disseminated infection due to *Chrysosporium queenslandicum* in a garter snake (*Thamnophis*). Mycoses. 1999;42:107-10.
27. Nichols DK, Robin SW, Lamirande EW, Sigler L, Mason RT. Fatal mycotic dermatitis in captive brown tree snake (*Boiga irregularis*). J Zoo Wildl Med. 1999;30(1):111-8.



28. Cheatwood JL, Jacobson ER, May PG, Farrel TM, Homer BL, Kimbrough JW. An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. *J Zoo Wildl Med.* 2004;35(4):557-61.
29. Bertelsen MF, Crawshaw GJ, Sigler L, Smith DA. Fatal cutaneous mycosis in tentacle snakes (*Erpeton tentaculatum*) caused by the *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. *J Zoo Wildl Med.* 2005;36(1):82-7.
30. Oros J, Arencibia A, Fernandez L, Jensen HE. Intestinal candidiasis in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*): an immunohistochemical study. *Vet J.* 2004;167:202-7.
31. Stephen J, Hernandez-Divers. Pulmonary candidiasis caused by *Candida albicans* in a greek tortoise (*Testudo graeca*) and treatment with intrapulmonary amphotericin B. *J Zoo Wildl Med.* 2001;32(3):352-9.
32. Abou-Gabal M, Zenoble R. Subcutaneous mycotic infection of a burmese python snake. *Mycoses.* 2009;23(11):627-31.
33. Arroyo O, Bolaños R, Mufioz G. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rica snakes. *Bull Pan Am Health Organ.* 1980;14(3):280-5.
34. Iveson JB, Mackay-Scodlay EM, Bamford V. *Salmonella* and *Arizonae* in reptiles and man in Western Australia. *J Hyg (London).* 1969;67(Suppl 1):135-45.
35. Mavridis SC, Hipolito M, Baldassi L, Moulini AAP, Calil EMB, Barbosa ML. Estudo da microbiota aeróbica de serpentes, *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae), recém-capturadas. *Mem Inst Butantan.* 1993;55(Suppl 2):59-94.
36. Jorge T, Mendonça JS, Ribeiro LA, Silva ML, Kusano EJ, Codeiro CL. Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venoms of *Bothrops jararaca*: possible source of infection at the site of bite. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1990;32(1):6-10.
37. Ferreira Junior RS, Siqueira AK, Campagner MV, Salerno T, Soares TCS, Lucheis SB, et al. Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesq Vet Bras* 2009;12:999-3.
38. Ferreira Junior RS, Biscola NP, Campagner MV, Barraviera B. How to raise snakes in captivity? *Vet Microbiol.* 2009;141(2):189.
39. Kostka VM, Hoffmann L, Balks E, Eskens U, Wimmershof N. Review of the literature and investigations on the prevalence and consequences of yeasts in reptiles. *Vet Rec.* 1997;140:282-7.
40. Paré JA, Jacobson E. Mycotic diseases of reptiles. In: Jacobson E, editor. *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text.* Florida: CRC Press; 2007. p.527-70.

41. Paré JA, Sigler L, Rypien KL, Gibas CF. Cutaneous mycobiota of captive squamate reptiles with notes on the scarcity of *Chryso sporium anamorph of Nannizziopsis vriesii*. J Herpetol Med Surg. 2003;13:10-5.
42. Nardoni S, Papini R, Marcucci GM, Mancianti F. Survey on the fungal flora of the cloaca of healthy pet reptiles. Revue Méd Vét. 2008;159(3):159-65.
43. McKenzie RA, Green PE. Mycotic dermatitis in captive carpet snakes (*Morelia spilotes variegata*). J Wildl Dis. 1976;12:405-8.
44. Cheatwood JL, Jacobson ER, May PG, Farrell TM. An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a wild population of pigmy rattlesnakes, *Sistrurus miliarius barbouri*, in Volusia County, Florida. J Wildl Dis. 2003;39:329-37.
45. McAllister CT, Goldberg SR, Holsuh HJ, Trauth SE. Disseminated mycotic dermatitis in a wild-caught timber rattlesnake, *Crotalus horridus* (Serpentes: Viperidae), from Arkansas. Texas J Sci. 1993;45:279-81.
46. Porto E, Milanez AI. *Basidiobolus* isolado de répteis e anfíbios no Brasil. Rev Inst Med Trop. 1979;21(5):237-45.
47. Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP. Herpetology. San Diego: Academic Press; 2001. p.503-31.
48. Costa ACOR, Almeida-Santos SM, Germano JV, Oliveira L, Scartozzoni RR, Salomão MG. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I. A longevidade dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Publ Avulsas Inst Pau Brasil. 2005;8:63-9.
49. McCoy RH, Seidler RJ. Potential pathogens in the environment: isolation, enumeration, and identification of seven genera of intestinal bacteria associated with small green pet turtles. Appl Microbiol. 1973;25(4):534-8.
50. Biasi P, Belluomini EH, Hoge AR, Puerto G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. Mem Inst Butantan. 1977;41:167-72.
51. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. Spain: Wolfe; 1994. p.237-42.
52. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Detecção e Identificação de bactérias de importância médica. Módulo V. [s.d] 93 p.
53. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington. 1985.
54. Clinical and Laboratory Standards Institute (US). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement V. CLSI document M100-S15. Wayne (PA); 2005.
55. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. São Paulo: Sarvier, 1991. p.233-47.

56. Ridell RW. Permanent stained mycological preparations obtained slide culture. *Mycologia*. 1950;42:265-70.
57. McCullough MJ, DiSalvo AF, Clemons KV, Park P, Stevens DA. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatidis*. *Clin Infect Dis*. 2000;30:328-35.
58. Kemker BJ, Lehmann PF, Lee JW, Walsh TJ. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigeli* by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(8):1677-83.
59. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000;7(1-2):203-14.
60. Statistical analysis system. Jump. Versão 8.02. Cary: SAS. 2009.
61. Kaneene JB, Taylor RF, Sikarskie JG, Meyer TJ, Richter NA. Disease patterns in the Detroit Zoo: a study of reptilian and amphibian populations from 1973 through 1983. *J Am Vet Med Assoc*. 1985;187:1132-3.
62. Williams FE, Freeman M, Kennedy E. The bacterial flora of the mouths of Australian venomous snakes in captivity. *Med J Aust*. 1934;11:190-3.
63. Baylock RSM. Normal oral bacteria flora some southern African snakes. *Ond J Vet Res*. 2001;68:175-82.
64. Silva JSA, Mota RA, Pinheiro Junior JW, Almeida MCS, Silva DR, Ferreira DRA, *et al*. Aerobic bacterial microflora of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) oral cavity and cloaca, originating from Parque Zoológico Arruda Câmara, Paraíba, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2009;40:194-8.
65. Theakston RDG, Phillips RE, Looareesuwan S, Echeverria P, Makin T, Warrell DA. Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild malayan pitvipers (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 1990;84: 875-9
66. Santoro M, Hernández G, Caballero M, Garcia F. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *J Zoo Wildl Med*. 2006;37(4):549-52
67. Wise DJ, Carter JR. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Enterobacteriaceae I. Iowa: State Press; 2004. P. 129-37.
68. Bastos EJ, Mathewson JJ. Enterobacteriaceae isolated from iguanid lizards of west-central Texas. *Appl Envir Microbiol*. 1979;38(3):402-5.
69. Moreno G, Lopes CAM, Belluomini HE, Pessoa GVA, Biasi P, Andrade JCR. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev Inst Med Trop*. 1973;15:122-6.
70. Boumler AJ, Tsdis RM, Ficht TA, Adms LG. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun*. 1988;66:4579-87.

71. Jacobson ER, Millichamp NI, Gaskin JM. Use of a polyvalent autogenous bacterin for treatment of mixed gram-negative bacteria osteomyelitis in a rhinoceros viper (*Bitis nasicornis*). JAVMA. 1985;187(11):1224-5.
72. Cooper JE, Leakey JHEA. A septicæmic disease of East African snakes associated with Enterobacteriaceae. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1976;70:80-4.
73. Chimadurai SK, Brown DL, Wettère AV, Tuttle AD, Fatzinger MH, Linder KE, et al. Mortalities associated with sepsis, parasitism, and disseminated round cell neoplasia in yellow-lipped sea kraits (*Laticauda cdubrina*). J Zoo Wild Med. 2008;39(4):626-30.
74. Novak SS, Seigel RA. Gram-negative septicemia in American alligators (*Alligator mississippiensis*). J Wildl Dis. 1986;22(4):484-7.
75. Mavridis SC, Hipolito M, Baldassi L, Moulini AAP, Calil EMB, Barbosa ML. Inquérito bacteriológico de serpentes doentes mantidas em cativeiro. Mem Inst Butantan. 1993;55 (Suppl 2):59-94.
76. Furk RS. Diarrhea. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Florida: Elsevier, 2006. p.772-3.
77. Millichamp NI, Gaskin JM. Use of a polyvalent autogenous bacterin for treatment of mixed gram-negative bacteria osteomyelitis in a rhinoceros viper (*Bitis nasicornis*). JAVMA. 1985;187(11):1224-5.
78. Huchzermeyer FW. Diseases of famed crocodiles and ostriches. Rev Sci Tech Epiz. 2002;21(2):265-276.
79. Bastos HM, Lopes LFL, Gattamorta MA, Matushima ER. Prevalence of enterobacteria in *Bothrops jararaca* São Paulo state: microbiological survey and antimicrobial resistance standards. Acta Sci Biol Sci. 2008;30(3):321-6.
80. Shek KC, Tsui KL, Lam KK, Crow P, Kenneth HL, Ades G, et al. Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albdabris*) in Hong Kong SAR, China. Hong Kong Med J. 2009;15:183-90.
81. Hejnar P, Bardon J, Sauer P, Kólar M. *Stenotrophomonas maltophilia* as a part of normal oral bacterial flora in captive snakes and its susceptibility to antibiotics. Vet Microbid. 2007;121:357-62.
82. Corrente M, Madro A, Friedrich KG, Greco G, Desario C, Tagliaube S, et al. Isolation of *Salmonella* strains from reptiles faeces and comparison of different culture media. J Appl Microbiol. 2004;96:709-15.
83. Soveri T, Seuna ER. Aerobic oral bacteria in healthy captive snakes. Acta Vet Scand. 1986; 27:172-81.
84. Goldstein EJC, Citron DM, Gonzalez H, Russel FE, Finegold SM. Bacteriology of rattlesnake venom and implications for therapy. J Infect Dis. 1979;140:818-21.

85. Jacobson ER. Use of Antimicrobial Drugs in Reptiles. In: Fowler ME, Miller RE, editors. Zoo and Wild Animal Medicine – Current Therapy. Philadelphia: Saunders; 1999. p.190-9.
86. Rossi JV. Dermatology. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Saunders Company; 1996 p.104-17.
87. Mary P, Défives C, Hornez JP. Occurrence and multiple antibiotic resistance profiles of non-fermentative Gram-negative microflora in five brands of non-carbonated French bottled spring water. Microbiol Ecol. 2000;39:322–9.
88. Wilkinson FH, Kerr KG. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. Eur J Cancer Care. 1998;7:12-4.
89. Bardon PHJ, Sauer P, Kola M. *Stenotrophomonas maltophilia* as a part of normal oral bacterial flora in captive snakes and its susceptibility to antibiotics. Vet Microbiol. 2007; 121:357-62.
90. Harris NB, Rogers DG. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis tetraspis*). J Vet Diagn Invest. 2001; 13:255-8.
91. Galli D, Donitza A, Garfunkel A, Sela MN. Gram-negative enteric bacteria in the oral cavity of leukemia patients. Surg Oral Med Pathol. 1992;74(4):459-62.
92. Gonçalves CR, Vaz TM, Leite D, Marise S, Prandi MAM, Rocha A, et al. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop. 2000;42(1): 1-7.
93. Glazebrook JS, Campbell RSF. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. Farmed turtles. Dis Aquat Organ. 1990;9:83–95.
94. Glazebrook JSRSF, Campbell AT. Studies on an ulcerative stomatitis-obstructive rhinitis-pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles, *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. Dis Aquat Organ. 1993; 16: 133-47.
95. Cheatwood JL. An outbreak of fungal dermatitis in a wild population of pigmy rattlesnakes, *Sistrurus miliarius barbouri*, in Florida: Description, factors, ciclicity and prevention [Thesis]. University of Florida. 2000.
96. Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2005;43(5):2286-90.
97. Diaz-Figueroa O, Mitchell MA. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006. p. 145-62.
98. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, editor. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press; 2003. 1212 p.

99. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Int Care Med*. 2007;33:1155-61.
100. Murphy JB, Armstrong BL. Diseases, infections and treatments. In: Maintenance of rattlesnakes in captivity. Lawrence: University of Kansas Printing Service; 1978. p.6-24.
101. Lipsky BA, Hook W E, Smith AA, Florde JJ. *Citrobacter* infection in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. *Rev Infect Dis*. 1980;2:746-60.
102. Wang JT, Chang SC, Chen YC, Luh KT. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. *J Microbiol Immunol Infect*. 2000;33:258-62.
103. Graves SR, Rawlinson PA, McLaren KMDA, Harvey KJ, Thornton IWB. Enteric bacteria of reptiles on Java and the Krakatau Islands. *Trans Royal Soc London*. 1988;322(1211):355-61.
104. Jacobson ER. Bacterial diseases of reptiles. In: Mader DR, editor. Infectious diseases and pathology of reptiles. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006. p.462-523.
105. Lane TJ. Crocodylians. In: Mader DR, editor. Infectious diseases and pathology of reptiles. Philadelphia: Saunders; 1996. p.78-94.
106. Ellie JC, Goldstein EO, Agyare AE, Vagvolgyi M. Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. *J Clin Microbiol*. 1981;13(5):954-6.
107. Valsan C, Rao T, Sathivathy A. A case of snakebite complicated by *Morganella morganii* subspecies *morganii* Biogroup I infection. *Int J Infect Dis*. 2008;6(2):2-5.
108. Jorge MT, Nishioka SA, Ribeiro LA, Oliveira RB, Silveira PVP. *Aeromonas hydrophila* soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998;92:213-7.
109. Jorge MT, Ribeiro LA, Silva MLR, Kusano EJU, Mendonça JS. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. *Toxicon*. 1994;32:743-8.
110. Rafael Otero-Patiño. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*. 2009;54:998-1011.
111. Andrade JGD, Pinto RNL, Andrade ALSSD, Martelli CMT, Zicker F. Estudo bacteriológico de abscessos causados por picada de serpentes do gênero *Bothrops*. *Rev Inst Med Trop*. 1989;31:363-7.
112. Jorge MT, Ribeiro LA. Infections in the bite site after envenoming by snakes of *Bothrops* genus. *J Ven Anim Toxins*. 1997;3(2):212-5.

113. Baylock RS. Antibiotic use and infection in snakebite victims. *South African Med J.* 1999;89:874-6.
114. Flandry F, Lisecki EJ, Domingue GJ, Nichols RL, Greer DL, Haddad RJ. Initial antibiotic therapy for alligator bites: characterization of the oral flora of *Alligator mississippiensis*. *South Med J.* 1989;82(2):262-6.
115. Parrish HM, MacLaurin M, Tuttle RL. North American pit vipers: bacterial flora of the mouths and venom glands. *Virg Med.* 1956;83:383-5.
116. Ledbetter EO, Kutscher AE. The aerobic flora of rattlesnake fangs and venom. *Arch Environ Health.* 1969;19:770-8.
117. Cooper JE, Leakey JHEA. A septicaemic disease of East African snakes associated with Enterobacteriaceae. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976;70:80-4.
118. Mavridis SC, Hipolito M, Baldassi L, Moulini AAP, Calil EMB, Barbosa ML. *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de caso de estomatite em *Bothrops alternatus* (serpentes, Viperidae). *Rev Microbiol.* 1987;18:224-8.
119. Iizuka H, Canter HM, Oliveira EPT, Higashi HG, Rolim Rosa R. Estomatite infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantida em cativeiro. *Mem Inst Butantan.* 1983;48:113-20.
120. Mavridis SC, Baldassi L, Moulini AAP, Hipolito M. *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abscesso em serpentes (*Bothrops neuwiedi*) *Rev Microbiol.* 1986;17:28-30.
121. Addison JB, Jacobson ER. Use of an autogenous bacterin to treat a chronic mouth infection in a reticulated python. *J Zoo Anim Med.* 1974;5(1):10-1.
122. Wagner CE. Mouth rot, a common disease of snakes. *Bull Nat Hist Soc.* 1934;5:20-3.
123. Furlanetto RS, Belluomini HE, Iizuka H, Rolim RR. Epizootia provocada por um bacilo difteróide em serpentes mantidas em biotério. *Rev Microbiol.* 1979;10(4):139-43.
124. MacCallum GA. Epidemic pneumonia in reptiles. *Science.* 1921;54(1395):279-81.
125. Jacobson ER, Samuelson DA. Identifying reptile pathogens using electron microscopy. In: Jacobson ER, editor. *Infectious diseases and pathology of reptiles: color and atlas.* Florida: CRC Press; 2007. p.299-350.
126. Chimaduray SK, DeVoe RS. Select infectious diseases of reptiles. *Vet Clin Exot Anim.* 2009;12:583-96.
127. Gutierrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. Em: Cardoso JLC, França FOS, Fan H, Malaque, CMSA, Haddad Jr V, editores. *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* Sarvier/FAPESP: São Paulo; 2003. p.310-23.
128. Junge RE, Miller RE. Reptile respiratory diseases. In: Kirk RW, Bonagura JD. Editors. *Current Veterinary Therapy XI.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 210-3.

129. Gopee NV, Abiodun AA, Caesar K. Longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds and reptiles in Trinidad. *J Zoo Wildl Med.* 2000;31(3):353-60.
130. Martinez MB, Trabulsi LR. Enterobacteriaceae. Em: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2008. p.271-88.
131. Mader DR. Metabolic bone diseases. In: *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: Saunders; 2006. p.841-51.
132. Moreno G, Lopes CAM, Belluomini HE, Pessoa GVA, Biasi P, Andrade JCR. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev Inst Med Trop.* 1973;15(3):122-6.
133. Bemis DA, Michael A, Owston ALA, Stephen AK, Paul E, Barton WR, et al. Comparison of phenotypic traits and genetic relatedness of *Salmonella enteric* subspecies *arizonae* isolates from a colony of ridgenose rattlesnakes with osteomyelitis. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:382-7.
134. Carter GR, Wise DJ. Enterobacteriaceae II. *Salmonella* and *Yersinia*. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. Iowa State Press; 2004. P. 137-42.
135. Sanyal D, Douglas T, Roberts R. *Salmonella* infection acquired from reptilian pets. *Arch Dis Child.* 1997;77:345-6.
136. Geue L, Loschner U. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Vet Microbiol.* 2002;84:79-91.
137. Johnson-Delaney CA. Reptile Zoonoses and Threats to Public Health. In: Mader DR, editor. *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders; 1996. p.20-33.
138. Mermin J, Hoar B, Angulo FJ. Iguanas and *Salmonella marina* infection in children: a reflection on the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics.* 1997;99(3):399-402.
139. Woodward DL, Khakhria R, Johnson WM. Human salmonellosis associated with exotic pets. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2786-90.
140. Mahajan RK, Khan SA, Chandel DS, Kumar N, Hans C, Chaudhry R. Fatal case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in an infant with Microcephaly. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5830-2.
141. Strohl P, Tilly B, Freymy S, Brisabois A, Guerin-Fauble. Prevalence of *Salmonella* shedding in faeces by captive chelonians. *Vet Rec.* 2004;154:56-8.
142. Argôlo Filho, RC. Identificação, serotipagem e diferenciação pela PCR-DGGE de sorotipos de *Salmonella* isolados de teiús criados em cativeiro. [Dissertação]. Instituto de Biociências. Universidade Estadual de Santa Cruz 2007.
143. Lopes LFL. *Salmonella* sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as conseqüências para o



- manejo em cativeiro e reintrodução [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2008.
144. Harvey RWS, Price TH. *Salmonella* isolation from reptilian faeces: A discussion of appropriate cultural techniques. J Hyg. 1983;91(1):25-32.
145. Pflieger S, Benyr G, Sommer R, Hassl A. Pattern of *Salmonella* excretion in amphibians and reptiles in a vivarium. Int J Hyg Environ Health. 2003;206:53-9.
146. Bauwers L, Vercammen F, Bertrand S, Collard JM, Ceuster S. Isolation of *Salmonella* from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different selective methods. J Appl Microbiol. 2006;101:284-9.
147. Barks CB. Management of fully aquatic snakes. Int Zoo Yearb. 1989;28: 155-63.
148. Grupka LM, Ramsay EC, Bemis DA. *Salmonella* surveillance in a collection of rattlesnakes (*Crotalus* spp.). J Zoo Wildl Med. 2006;37(3):306-12.
149. Hsieh S, Babi F. *Serratia marcescens* cellulitis following an iguana bite. Clin Infect Dis. 1999;28:1181-2.
150. Garcia ME, Lanzarot P, Costas E, Rodas VL, Marin M, Blanco JL. Isolation of *Serratia fonticola* from skin lesions in a Nile Crocodile (*Crocodylus niloticus*) with an associated septicaemia. Vet J. 2008;176:254-6.
151. Garcia-Lima E, Laure CJ. A study of bacterial contamination of rattlesnake venom. Rev Soc Bras Med Trop. 1987;20:19-21.
152. Rossi JV. General husbandry and management. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Saunders; 2006. p.25-42.
153. Grego KF. Ophidia – Restraint, Anesthesia, Medicine. In: Fowler, ME. editor. Biology, medicine, and surgery of south american wild animals. Iowa: State University Press; 2001. p.43-50.
154. Morici LA, Eisey RM, Lance VA. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. J Exp Zool. 1997;279:156-62.
155. Guillette MT, Felix TA, Lance A. Effects of trapping and subsequent short-term confinement stress on plasma corticosterone in the brown treesnake (*Boiga irregularis*) on Guam. Gen Comp Endocr. 2001; 124:106-14.
156. Mader DR. Management of large reptile collections. In: Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Saunders; 1996. p.459-63.
157. Denardo D. Stress in captive reptiles. In: Mader DR. Editor. Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Saunders. 2006.p.119-123.
158. Grego KF. Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e extração de veneno, em *Batrachoseps*

- jararaca* (Ophidia: Viperidae) [Tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2006.
- 159.** Guillette LJ, Cree A, Rooney AA. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: Warwick C, Frye FL, Murphy JB, editors. Health and welfare of captive reptiles. London: Chapman and Hall; 1995. p.32-81.
- 160.** Leloup P. Essais de rationalisation dans le maintien d'un serpentarium a but industriel. *Acta Tropica*.1973;30:281-311.
- 161.** Gales AC, Pignatari AC, Jones RN, Baretta M, Sader HS. Avaliação da atividade in vitro dos novos antimicrobianos da classe das fluorquinolonas, cefalosporinas e carbapenems contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. *Rev Ass Méd Brasil*. 1997;43(2): 137-44.
- 162.** França FOS, Mälaque CMS. Acidente Botrópico. Em: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Mälaque CMS, Haddad Junior V, editores. Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia clinica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier. 2003. p.72-86.
- 163.** Ishida Y, Ahamed AM, Mahfouz NB, Kimura T, El-khodery AA, Shimamoto T. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J Vet Med Sci*. 2010. 72(6):727-34.
- 164.** Mader DR. Antibiotic therapy in reptile medicine. In Frye FL, editor. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. Florida: Krieger Publishing; 1991. p.212-8
- 165.** Williams RJ. Globalization of antimicrobial resistance: epidemiological challenges. *Clin Infect Dis*. 2001;33: 116-7.
- 166.** Velonaskis EN, Markogannakis A, Kond L, Varjoti E, Mahera Z, Dedouli E, *et al*. Evolution of antibiotic resistance of non-typhoidal Salmonella in Greece during 1990-97. *Eurosurveillance*. 2001;6(8):117-22.
- 167.** Headrick ML, Walker LA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial resistance in Salmonella isolates from exotic animals. *FDA Vet News*. 2001;16(4):1-3.
- 168.** Pasmans F, Martel A, Boyen F, Vanderkechove D, Wybo I, Immerseel FV, *et al*. Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. *Vet Microbiol*. 2005;110(3):285-91.
- 169.** Foti M, Giacopello C, Bottari T, Fisichella V, Rinaldo D, Mammina C. Antibiotic resistance of gram negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull*. 2009;58:1363-6.
- 170.** Mitchell MA. Therapeutics. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006. p.631-64.
- 171.** Pare JA, Sigler L, Rosenthal KL, Mader DR. Microbiology: Fungal and bacterial diseases of reptiles. In: Mader DR. Editor. Reptile Medicine and surgery. 2006. p.217-38.
- 172.** Parkey GA. Tigecycline. *J Antim Chemoth*. 2005;56:470-80.

173. Entenza JM, Moreillon P. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies. *Int J Antim Agents*. 2009;34:1-9.
174. Garrison MW, Neumiller JJ, Setter SM. Tigecycline: an investigational glycolcycline antimicrobial with activity against resistant gram-positive organisms. *Clin Therap*. 2005;7(1):12-22.
175. Food and Drug Administration (FDA). 2005.19:219.
176. Bencke A, Heineck I. Eficácia e Segurança da Tigecidina, o Primeiro Antibiótico da Classe das Gliciliclinas. *Lat Am J Pharm*. 2008;27(6):928-37.
177. Nishioka SA, Siveira PVP. Bacteriology of abscesses complicating bites of the lance-headed vipers. *Ann Trop Med Parasitol*. 1992;86:89-91.
178. Albuquerque MJ, Pires de Campos VA, Katz G, Takaoka NY, Lebrão ML, Jorge MT. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988-1993. *Rev Assoc Med Bras*. 1998;44:312-8.
179. Coutinho SDA, Carvalho VM, Ramos MCC, Costa EO, Dinis LS, Guimarães MABV, et al. Bacterial septicemia in water snakes (*Helicops modestus*) in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001;53(4):1-2.
180. Jacobson ER, Cheatwood JL. Mycotic Diseases of Reptiles. *Sem Avian Exot Pet Med*. 2000;9(2):94-101.
181. Pappagianis D. Epidemiology of coccidioidomycosis. *Cur Top Med Mycol*. 1968;2:199-238.
182. Wellehan JF, Turenne C, Heard DJ. *Dermatophilus chelonae* in a king cobra (*Ophiophagus hannah*). *J Zoo Wildl Med*. 2004;35:553-6.
183. Werner R, Balady MA, Kolaja GJ. Phycomycotic dermatitis in an eastern indigo snake. *Vet Med Small Animal Clin*. 1978;73:362-3.
184. Bowman MR, Pare JA, Sigler L. Deep fungal dermatitis in three inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) caused by the *Chrysosporium anamorph* of *Nannizziopsis vriesii*. *Med Mycol*. 2007;45:371-6.
185. Thomas AD, Sigler S, Peucker S, Norton JH, Nielan A. *Chrysosporium anamorph* of *Nannizziopsis vriesii* associated with fatal cutaneous mycoses in the saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). *Med Mycol*. 2002;40:143-51.
186. Paré JA, Sigler L, Hunter DB. Cutaneous mycoses in chameleons caused by the *Chrysosporium anamorph* of *Nannizziopsis vriesii*. *J Zoo and Wildl Med*. 1997;28:443-53.
187. Abarca ML, Martorell J, Castellá G. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by a *Chrysosporium* species related to *Nannizziopsis vriesii* in two green iguanas (*Iguana iguana*). *Med Mycol*. 2008;46:349-54.

188. Bertelsen MF, Crawshaw GJ, Sigler L. Fatal cutaneous mycosis in tentacled snakes (*Eryon tentaculatum*) caused by the *Chrysosporium anamorph of Nannizziopsis vriesii*. J Zoo Wildl Med. 2005;36:82-7.
189. Miller DL, Radi ZA, Stiver SL, Thornhill TD. Cutaneous and pulmonary mycosis in green anacondas (*Eunectes murinus*). J Zoo Wildl Dis. 2004;35(4):557-61.
190. Rajeev S, Sutton DA, Wickes BL, Miller DL, Giri D, Meter MV, et al. Isolation and characterization of a new fungal species, *Chrysosporium ophiodicida*, from a mycotic granuloma of a black rat snake (*Elaphe obsoleta obsoleta*). J Clin Microbiol. 2009;47(4):1264-8.
191. Flamant F, Gentile L, Chermette R, Chabasse D, Bouchara JP. Flore fongique des lésions de la carapace des tortues terrestres de compagnie dans l'ouest de la France. J Mycol Med. 2003;13:67-72.
192. Middelhoven WJ, Scorzetti G, Fell JW. Systematic of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54:975-86.
193. Sampaio JP. Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. Can J Microbiol. 1999;45:491-512.
194. Maenza JR, Merz WG. Infection caused by non-Candida, non-Cryptococcus yeasts. In: Clinical Mycology. Anaissie E J, McGinnis MR, Pfaller MA, editores. Philadelphia: Elsevier Science; 2003. p.260-72.
195. Herbrecht R, Koenig H, Waller J, Liu KL, Ghého E. *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. J Mycol Med. 1993;3:129-36.
196. Correa B, Paula CR, Gambale W, Gompertz OF. Micoses oportunisticas e outras micoses. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. Microbiologia. São Paulo: Atheneu; 2008. p.525-32.
197. Hou-Min L, Hong-Tao D, Liu W, Wan Z, Ruo-Yu L. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. Mycopathol. 2005;160:217-25.
198. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 regions of *Trichosporon* species. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1826-30.
199. Austwick PKC, Keymer IF. Fungi and actinomycetes. In: Cooper JE, Jackson OF. Editors. Diseases of the Reptilia. New York: Academic Press. 1984. p.193-231.
200. Migaki G, Jacobson ER, Casey HW. Fungal diseases in reptiles. In: Hoff GL, Frye FL, Jacobson ER, editors. Diseases of amphibians and reptiles. New York: Plenum Press; 1984. p.183-204.

- 201.** Schildger BJ, Frank H, Göbel THY, Weiss R. Mycotic infections of the integument and inner organs in reptiles. *Herpetopathol.* 1991;281-97.
- 202.** Jacobson ER. Diseases of the integumentary system of reptiles. In: Nesbitt GH, Ackerman LJ, editors. *Dermatology for the Small Animal Practitioner.* New York: Veterinary Learning Systems; 1991. p.225-39.
- 203.** Gugagni HC, Okafor JI. Mycotic flora of the intestine and other internal organs of certain reptiles and amphibians with special reference to characterization of *Basidiobdus* isolates. *Mykosen.* 1980;23:260-8.

CONCLUSÕES e SUGESTÕES

---

CAPÍTULO 5

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com base nas análises realizadas, foi possível chegar às seguintes conclusões e sugestões:

- O sistema de cadastro elaborado possibilita a rastreabilidade da peçonha produzida e a análise da população de serpentes mantidas no plantel;
- Apesar dos animais que ocupam áreas abertas apresentarem maior tolerância as alterações ambientais, a umidade mantida no serpentário intensivo merece ser reavaliada, pois parece favorecer a longevidade de serpentes encontradas em áreas mais florestadas;
- É imprescindível a implantação de uma rotina envolvendo exames clínicos em serpentes recém-capturadas para evitar a introdução de doenças no plantel;
- O cativeiro intensivo apresenta diversos agentes estressantes, expondo as serpentes em constante estresse crônico, aumentando a mortalidade dos animais nesse sistema;
- A implantação de sistemas mais efetivos de controle de temperatura e umidade no quarentenário e no cativeiro intensivo é recomendada para que cada sala tenha temperatura e umidade adequada para a espécie alojada;
- O sistema aplicado no cativeiro semi-extensivo no CEVAP é mais indicado para a manutenção de serpentes *Caudisona durissa terrifica*;
- A modificação do sistema de aquecimento no cativeiro semi-extensivo é recomendada para que o fotoperíodo seja semelhante ao do ambiente natural;

- A metodologia atualmente utilizada na extração de peçonha é segura tanto para o extrator quanto para a serpente, prevenindo-se prejuízos para os animais;
- A instalação de sistemas de controle de temperatura, umidade e instalação de trocas de ar no Biotério de Roedores é necessária para que o alimento fornecido para as serpentes seja de boa qualidade;
- É recomendável a implantação do uso de maravalha, ração autoclavada e água filtrada para se evitar o contato dos animais com microorganismos patogênicos;
- A higienização das caixas das serpentes e dos roedores deve ser realizada em diferentes setores para que não ocorra contaminação entre os materiais;
- A implantação de um Sistema de Gestão Ambiental (SGA) deve ser considerada para minimizar os impactos ambientais decorrentes da manutenção de serpentes em cativeiro;
- O isolamento de patógenos potenciais nas amostras das serpentes estudadas pode ser considerado importante no processo de avaliação do tipo de manejo utilizado, considerando as numerosas condições estressantes proporcionadas pelo ambiente do cativeiro e o caráter oportunista desses agentes;
- Os resultados sugerem que o tipo de manejo adotado influencia na contaminação do ambiente utilizado pelos animais.
- Apesar de o sistema intensivo ser o método tradicionalmente utilizado na manutenção de ofídios destinados a produção de peçonha, o sistema semi-extensivo pode ser mais apropriado para este fim.

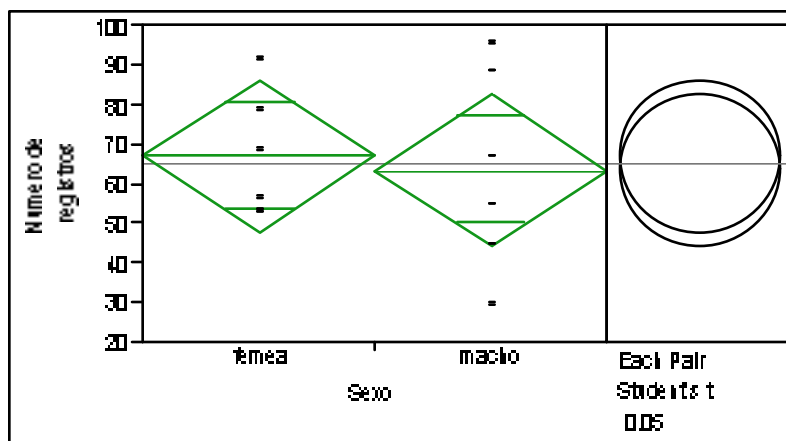


ANEXOS

---

## Anexo I

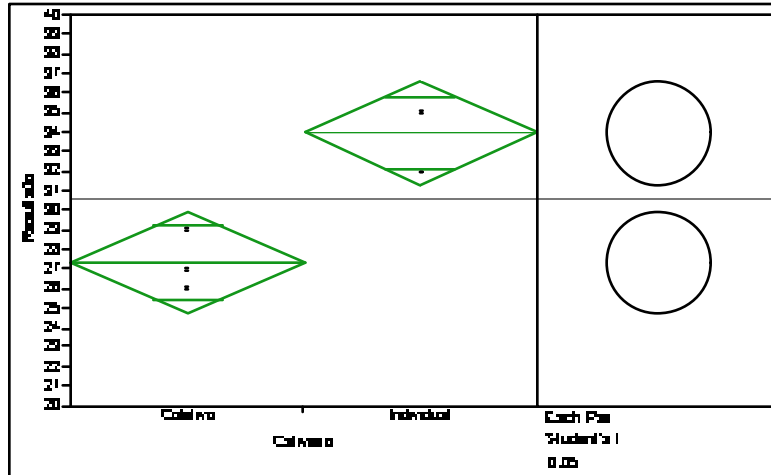
### Capítulo 2 – Elaboração de um sistema de cadastro de serpentes – Banco de Dados *online*



**Figura 1.** Frequência de fêmeas e machos de serpentes registradas no Banco de Dados no período de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2009.

**Tabela 1.** Análise de variância da frequência de fêmeas e machos de serpentes registradas no Banco de Dados no período de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2009.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Fêmeas	6	6.73333	8.6532	4.8053	8.6614
Machos	6	6.36667	8.6532	4.4386	8.2947



**Figura 2.** Análise do número de óbitos de *C. d. terrifica* em cativeiro intensivo (individual) e semi-extensivo (coletivo).

**Tabela 2.** Análise de variância do número de óbitos de *C. d. terrifica* em cativeiro intensivo (individual) e semi-extensivo (coletivo).

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Coletivo	3	2.73333	0.94281	2.4716	2.9951
Individual	3	3.40000	0.94281	3.1382	3.6618

## Anexo II

### Capítulo 4: Análise microbiológica dos diferentes regimes de cativeiro adotados pelo CEVAP

**Tabela 1.** Grupo 1: *Bothropoides jararaca* recém capturadas

<i>Bothropoides jararaca</i> recém-capturadas								
Grupo	RG	Microchip	Sexo	CRC(cm)	CC (cm)	Peso	Data	Procedência
G1-01	1397	Ø	♀	87	10,5	100	29/02/2008	Botucatu
G1-02	1423	Ø	♀	135	17	370	15/12/2008	Botucatu
G1-03	1458	Ø	♀	60	7,5	40	28/02/2009	Sorocaba
G1-04	1525	Ø	♀	84	11,5	95	16/03/2009	Pardinho
G1-05	1653	Ø	♀	78	10	210	23/09/2009	Laranjal Paulista
G1-06	1655	Ø	♀	90	11	200	25/09/2009	Botucatu
G1-07	1670	Ø	♀	93,5	13	150	26/11/2009	Botucatu
G1-08	1695	Ø	♀	72	9,5	80	26/11/2009	Botucatu
G1-09	1696	Ø	♀	82	10	110	03/12/2009	Botucatu
G1-10	1697	Ø	♀	123	17,5	510	03/01/2010	Botucatu

**Tabela 2.** Grupo 2: *Caudisona durissa terrifica* recém capturadas

<i>Caudisona durissa terrifica</i> recém-capturadas								
Grupo	RG	Microchip	Sexo	CRC(cm)	CC (cm)	Peso	Data	Procedência
G2-01	1482	Ø	♀	99	5,5	680	22/12/2008	Botucatu
G2-02	1488	Ø	♀	94	6	850	22/01/2009	Laranjal Paulista
G2-03	1530	Ø	♀	76	5	300	18/03/2009	Botucatu
G2-04	1531	Ø	♂	95	9,5	730	31/03/2009	Botucatu
G2-05	1535	Ø	♂	75	7	300	15/04/2009	Botucatu
G2-06	1542	Ø	♂	97	11	660	08/04/2009	Dois Córregos
G2-07	1544	Ø	♂	87	7	480	15/05/2009	Anhembi
G2-08	1545	Ø	♀	74	7	320	18/05/2009	Botucatu
G2-09	1546	Ø	♂	86	8	500	20/05/2009	Botucatu
G2-10	1547	Ø	♀	77	7	450	23/04/2009	Botucatu

Tabela 3. Grupo 3: *Bothropoides jararaca* mantidas em cativeiro individual

<b><i>Bothropoides jararaca</i> mantidas em cativeiro individual</b>								
<b>Grupo</b>	<b>RG</b>	<b>Microchip</b>	<b>Sexo</b>	<b>CRC(cm)</b>	<b>CC (cm)</b>	<b>Peso</b>	<b>Data</b>	<b>Procedência</b>
G3-01	219	303115	♂	95,5	13,5	110	04/11/2005	Itatinga
G3-02	535	339162	♀	111	13	350	05/03/2004	Cerqueira César
G3-03	541	363261	♂	77	13	100	19/02/2004	Botucatu
G3-04	564	308050	♂	70	8,5	50	16/03/2004	Tejupá
G3-05	603	340335	♀	79	10,5	250	23/04/2004	Botucatu
G3-06	675	305893	♂	81,5	11	80	05/07/2004	Cerqueira César
G3-07	809	346211	♂	75	10	110	04/02/2005	Itatinga
G3-08	860	313471	♀	84	10	250	11/04/2005	Itatinga
G3-09	861	331069	♀	76	9,5	90	11/04/2005	Itatinga
G3-10	1364	346464	♀	81	12	130	17/12/2004	Sorocaba

Tabela 4. Grupo 4: *Caudisona durissa terrifica* mantidas em cativeiro individual

<b><i>Caudisona durissa terrifica</i> mantidas em cativeiro individual</b>								
<b>Grupo</b>	<b>RG</b>	<b>Microchip</b>	<b>Sexo</b>	<b>CRC(cm)</b>	<b>CC (cm)</b>	<b>Peso</b>	<b>Data</b>	<b>Procedência</b>
G4-01	606	306026	♀	94	8	390	26/04/2004	Santa Maria da Serra
G4-02	837	368447	♂	93	9,5	450	06/04/2005	Botucatu
G4-03	843	328484	♂	95	9,5	470	04/04/2005	Piraju
G4-04	870	369585	♂	97	11	680	02/05/2005	Botucatu
G4-05	884	305445	♂	93	9	450	30/05/2005	Conchas
G4-06	885	337892	♀	104,5	8	660	26/06/2005	Botucatu
G4-07	886	306059	♀	90	7	500	13/06/2005	Pardinho
G4-08	891	304123	♀	84	7,5	350	13/06/2005	Bofete
G4-09	901	363167	♂	104	10	640	08/01/2005	Avaré
G4-10	904	315509	♀	101	8,5	760	13/05/2005	Bofete

Tabela 5. Grupo 5: *Bothropoides jararaca* mantidas em cativeiro coletivo

<i>Bothropoides jararaca</i> mantidas em cativeiro coletivo								
Grupo	RG	Microchip	Sexo	CRC(cm)	CC (cm)	Peso	Data	Procedência
G5-01	558	305191	♀	90	15	180	12/03/2004	Tejupá
G5-02	565	366986	♀	63	8,5	100	16/03/2004	Tejupá
G5-03	632	368199	♀	111	13	650	14/05/2004	Cerqueira César
G5-04	646	320505	♀	93	11	160	15/06/2004	Cerqueira César
G5-05	751	330884	♂	98	12,5	250	03/01/2005	Botucatu
G5-06	777	319399	♀	82	10	120	18/01/2005	Botucatu

Tabela 6. Grupo 6: *Caudisona durissa terrifica* mantidas em cativeiro coletivo

<i>Caudisona durissa terrifica</i> mantidas em cativeiro coletivo								
Grupo	RG	Microchip	Sexo	CRC(cm)	CC (cm)	Peso	Data	Procedência
G6-01	623	340738	♀	65	4,5	200	05/05/2004	Santa Maria da Serra
G6-02	637	307398	♀	95	7	510	31/05/2004	Itatinga
G6-03	639	334920	♂	73	7,5	300	25/04/2004	Santa Maria da Serra
G6-04	640	346382	♂	84	8	380	31/05/2004	Cerqueira César
G6-05	810	329102	♂	92	8,5	520	04/02/2005	Pardinho
G6-06	815	326418	♀	98	7,5	580	04/03/2005	Pardinho
G6-07	831	330981	♀	95	7	340	29/03/2005	Botucatu
G6-08	862	343177	♀	94	7	470	01/03/2005	Anhemi
G6-09	890	325614	♂	93	9	410	20/05/2005	Itatinga
G6-10	941	369107	♂	110	11	630	31/10/2005	Conchas

Tabela 3. Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas nas amostras dos diferentes grupos de estudo (G1 a G6).

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
G1	40	1.75000	0.14038	1.4733	2.0267
G2	40	1.90000	0.14038	1.6233	2.1767
G3	40	2.45000	0.14038	2.1733	2.7267
G4	40	2.25000	0.14038	1.9733	2.5267
G5	24	1.54167	0.18123	1.1845	1.8988
G6	40	1.37500	0.14038	1.0983	1.6517

G1: *B. jararaca* recém-capturadas; G2: *C. d. terrifica* recém-capturadas; G3: *B. jararaca* mantidas em cativeiro intensivo; G4: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro intensivo; G5: *B. jararaca* mantidas em cativeiro semi-extensivo; G6: *C. d. terrifica* mantidas em cativeiro semi-extensivo.

**Tabela 4.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas nas amostras e o regime de cativeiro utilizado.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cativeiro coletivo	64	1.43750	0.11076	1.2192	1.6558
Cativeiro individual	80	2.35000	0.09906	2.1548	2.5452
Recém-capturado	80	1.82500	0.09906	1.6298	2.0202

Cativeiro coletivo: cativeiro semi-extensivo; Cativeiro individual: cativeiro semi-extensivo.

**Tabela 5.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas nas diferentes amostras analisadas

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cavidade oral	56	2.35714	0.08360	2.1924	2.5219
Cloaca	56	2.44643	0.08360	2.2817	2.6112
Escama	56	2.14286	0.08360	1.9781	2.3076
Peçonha(veneno)	56	0.66071	0.08360	0.4960	0.8255

**Tabela 6.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas nas amostras e a espécie de serpente analisada.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
<i>B. jararaca</i>	104	1.97115	0.09375	1.7864	2.1559
<i>C. d. terrifica</i>	120	1.84167	0.08727	1.6697	2.0137

**Tabela 7.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas em amostras de *Bothropoides jararaca*.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cavidade oral	26	2.38462	0.12958	2.1275	2.6417
Cloaca	26	2.57692	0.12958	2.3198	2.8340
Escama	26	2.19231	0.12958	1.9352	2.4494
Peçonha(veneno)	26	0.73077	0.12958	0.4737	0.9878

**Tabela 8.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas em amostras de *Caudisona durissa terrifica*.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cavidade oral	30	2.33333	0.10885	2.1177	2.5489
Cloaca	30	2.33333	0.10885	2.1177	2.5489
Escama	30	2.10000	0.10885	1.8844	2.3156
Peçonha(veneno)	30	0.60000	0.10885	0.3844	0.8156



**Tabela 9.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente *Bothropoides jararaca*.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cativeiro coletivo	24	1.54167	0.18544	1.1738	1.9095
Cativeiro individual	40	2.45000	0.14364	2.1651	2.7349
Recém-capturado	40	1.75000	0.14364	1.4651	2.0349

Cativeiro coletivo: cativeiro semi-extensivo; Cativeiro individual: cativeiro semi-extensivo.

**Tabela 10.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas e o tipo de cativeiro utilizado pela serpente *Caudisona durissa terrifica*.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cativeiro coletivo	40	1.37500	0.13750	1.1027	1.6473
Cativeiro individual	40	2.25000	0.13750	1.9777	2.5223
Recém-capturado	40	1.90000	0.13750	1.6277	2.1723

Cativeiro coletivo: cativeiro semi-extensivo; Cativeiro individual: cativeiro semi-extensivo.

**Tabela 11.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da frequência de bactérias isoladas em amostras de serpentes recém-capturadas.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cavidade oral	20	2.30000	0.13645	2.0282	2.5718
Cloaca	20	2.35000	0.13645	2.0782	2.6218
Escama	20	1.90000	0.13645	1.6282	2.1718
Peçonha(veneno)	20	0.75000	0.13645	0.4782	1.0218

**Tabela 12.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da freqüência de bactérias isoladas nas amostras das serpentes mantidas em cativeiro intensivo.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cavidade oral	20	2.95000	0.10972	2.7315	3.1685
Cloaca	20	2.85000	0.10972	2.6315	3.0685
Escama	20	2.50000	0.10972	2.2815	2.7185
Peçonha(veneno)	20	1.10000	0.10972	0.8815	1.3185

**Tabela 13.** Média, erro padrão, limite inferior e superior da freqüência de bactérias isoladas nas amostras das serpentes mantidas em cativeiro semi-extensivo.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Cavidade oral	16	1.68750	0.06751	1.552	1.8225
Cloaca	16	2.06250	0.06751	1.927	2.1975
Escama	16	2.00000	0.06751	1.865	2.1350
Peçonha(veneno)	16	0.00000	0.06751	-0.135	0.1350

**Tabela 14.** Análise  $\chi^2$  (qui-quadrado) dos resultados "Sensível" (S), "Intermediário" (I) e "Resistente" (R) obtidos com os 12 antimicrobianos testados.

Teste	$\chi^2$	p<0,05
Qui-quadrado	806.555	0.001

**Tabela 15.** Análise  $\chi^2$  (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário” (I) e “resistente” (R) dos isolados dos diferentes grupos analisados

Teste	$\chi^2$	p<0,05
Qui-quadrado	19.743	0.0347

**Tabela 16.** Análise  $\chi^2$  (qui-quadrado) dos resultados “sensível” (S), “intermediário” (I) e “resistente” (R) dos isolados nos diferentes regimes de cativeiro

Teste	$\chi^2$	p<0,05
Qui-quadrado	1.410	0.8424

**Tabela 16.** Média, erro padrão, limite inferior e superior na análise da comparação entre os resultados “sensível” (S) obtidos com os 12 antimicrobianos testados.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
AMI	84	0.009921	0.02133	-0.0319	0.05179
AMO	84	0.377381	0.02133	0.3355	0.41925
AMP	84	0.244378	0.02146	0.2023	0.28649
CLO	84	0.002976	0.02133	-0.0389	0.04484
CTF	84	0.064187	0.02133	0.0223	0.10605
ENO	84	0.007440	0.02133	-0.0344	0.04931
GEN	84	0.000000	0.02133	-0.0419	0.04187
NOR	84	0.003968	0.02133	-0.0379	0.04583
POL	84	0.075066	0.02133	0.0332	0.11693
SUT	84	0.020966	0.02133	-0.0209	0.06283
TIG	84	0.000000	0.02133	-0.0419	0.04187
TOB	84	0.000000	0.02146	-0.0421	0.04212

AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Cefotiofur; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacina; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacina; POL: Polimixina B; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim; TIG: Tigecilina; TOB: Tobramicina.

**Tabela 17.** Média, erro padrão, limite inferior e superior na análise da comparação entre os resultados “intermediário” (I) obtidos com os 12 antimicrobianos testados.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
AMI	84	0.000000	0.01578	-0.0310	0.03097
AMO	84	0.068849	0.01578	0.0379	0.09982
AMP	84	0.029167	0.01578	-0.0018	0.06014
CLO	84	0.082044	0.01578	0.0511	0.11302
CTF	84	0.034028	0.01578	0.0031	0.06500
ENO	84	0.015377	0.01578	-0.0156	0.04635
GEN	84	0.014881	0.01578	-0.0161	0.04585
NOR	84	0.005952	0.01578	-0.0250	0.03693
POL	84	0.017989	0.01578	-0.0130	0.04896
SUT	84	0.016667	0.01578	-0.0143	0.04764
TIG	84	0.072751	0.01578	0.0418	0.10372
TOB	84	0.006944	0.01578	-0.0240	0.03792

AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Ceftriaxona; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacinã; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacinã; POL: Pdimixina B; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim; TIG: Tigecilina; TOB: Tobramicina.

**Tabela 18.** Média, erro padrão, limite inferior e superior na análise da comparação entre os resultados “resistente” (R) obtidos com os 12 antimicrobianos testados.

Nível	Número	Média	Erro padrão	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
AMI	84	0.009921	0.02133	-0.0319	0.05179
AMO	84	0.377381	0.02133	0.3355	0.41925
AMP	84	0.244378	0.02146	0.2023	0.28649
CLO	84	0.002976	0.02133	-0.0389	0.04484
CTF	84	0.064187	0.02133	0.0223	0.10605
ENO	84	0.007440	0.02133	-0.0344	0.04931
GEN	84	0.000000	0.02133	-0.0419	0.04187
NOR	84	0.003968	0.02133	-0.0379	0.04583
POL	84	0.075066	0.02133	0.0332	0.11693
SUT	84	0.020966	0.02133	-0.0209	0.06283
TIG	84	0.000000	0.02133	-0.0419	0.04187
TOB	84	0.000000	0.02146	-0.0421	0.04212

AMI: Amicacina; AMO: Amoxicilina; AMP: Ampicilina; CTF: Ceftriaxona; CLO: Cloranfenicol; ENO: Enrofloxacinã; GEN: Gentamicina; NOR: Norfloxacinã; POL: Pdimixina B; SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim; TIG: Tigecilina; TOB: Tobramicina.